



**HEMIJSKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU**

Boris M. Mandić

**Optimizacija postupka za izolovanje i
određivanje pirolizidinskih alkaloida u
biljnom materijalu**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.



**FACULTY OF CHEMISTRY
UNIVERSITY OF BELGRADE**

Boris M. Mandić

**Optimization of Procedure for Isolation
and Determination of Pyrrolizidine
Alkaloids from Plant Material**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTORI:

Dr Snežana Nikolić-Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Vele Tešević,
vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU:

Dr Snežana Nikolić-Mandić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Vele Tešević,
vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Vlatka Vajs,
naučni savetnik Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu
i redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Odeljenja za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju IHTM Univerziteta u Beogradu.

Mentorima dr Snežani Nikolić-Mandić i dr Veletu Teševiću, kao i dr Vlatki Vajs, zahvaljujem se na poverenju, prilici da učim i pomoći tokom izrade disertacije. Profesoru dr Slobodanu Milosavljeviću se zahvaljujem što me je usmerio ka izučavanju pirolizidinskih alkaloida.

Zahvaljujem se dr Snežani Trifunović na nesebičnoj pomoći u svim fazama rada. Sa kolegama dr Ljubodrgom Vujsićem, dr Milenom Simić, dr Ivanom Vučkovićem, dr Milkom Jadranin, dr Dejanom Gođevcem i dr Miroslavom Novaković sam zajedno učio i puno od njih naučio. Takođe se zahvaljujem Dejanu Vučetiću, Marini Todosijević, Danici Bajić i Bobanu Anđelkoviću na stručnoj pomoći, pruženoj tokom rada. Na podršci i korisnim savetima zahvaljujem se dr Borisu Pejnu, dr Nini Todorović, dr Neni Bajc i dr Iris Đorđević. Rad svih nas je bio lakši i lepši zahvaljujući Dragici Pavličević i njenom načinu rada.

Mr Dejanu Đokoviću, jednom od mojih učitelja, zahvaljujem se na svemu što me je naučio.

Diplomcima Marini Vlajić, Vesni Veselčić, Sanji Milošević, Jeleni Dragojlović i Jeleni Lekić zahvaljujem se na njihovom doprinosu u eksperimentalnom radu. Mladim kolegamicama Jovani Stanković, Gordani Krstić i Mirjani Cvetković se zahvaljujem na podršci.

Majci i ocu, za sve što su me naučili i dali, veliko hvala.

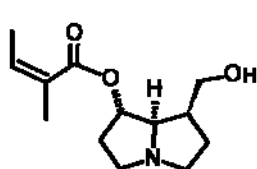
Boris Mandić

Optimizacija postupka za izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida u biljnom materijalu

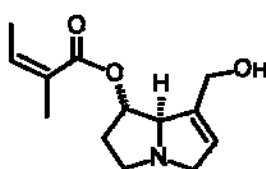
IZVOD

Pirolizidinski alkaloidi (PA) su velika grupa sekundarnih metabolita veoma rasprostranjenih u biljnom svetu. Više stotina PA i njihovih derivata N-oksida identifikovano je u preko 6000 biljaka, koje pripadaju različitim biljnim familijama. Mnoge biljke bogate PA koriste se u tradicionalnoj medicini u Aziji i Africi, što ih čini interesantnim za fitohemijska istraživanja. Sa druge strane, neki PA su veoma toksični za ljude i životinje. Akutno trovanje PA dovodi do oštećenja jetre, dok dugotrajna izloženost subletalnim dozama dovodi do kumulativnih oštećenja, ispoljavanja neurotoksičnih, mutagenih i karcinogenih efekata. Zbog svega ovog je naučno istraživanje PA značajno, pa je neophodan razvoj analitičkih metoda za određivanje pojedinačnih i ukupnih pirolizidinskih alkaloida u biljnom materijalu. Uprkos brojnim predloženim postupcima za izolovanje i prečišćavanje pirolizidinskih alkaloida, zbog raznolikosti njihovih struktura i hemijskih svojstava, ni jedan od njih nije našao široku primenu u praksi. Stoga je cilj ove doktorske teze optimizacija svih faza postupka za izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, tako da se ova strukturno različita jedinjenja mogu izolovati sa maksimalnim prinosima. Kao model-sistem upotrebljena je biljna vrsta *Rindera umbellata* Bunge. Pored toga, cilj teze je i izolovanje pojedinačnih alkaloida iz pomenute biljne vrste, njihova karakterizacija, odnosno određivanje struktura.

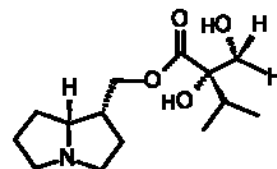
Izolovano je i strukturno okarakterisano šest PA (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktancin i heliosupin, PA1 – PA6, redom).



PA1



PA2



PA3

različitih vremena trajanja ekstrakcije utvrđeno je da je optimalno vreme ekstrakcije za svih šest praćenih alkaloida četiri dana za maceraciju biljnog materijala, tri dana za ultrazvučnu ekstrakciju i za ekstrakciju pomoću rotacionog miksera. Poređenjem prinosa svih šest alkaloida (PA1- PA6), koji su dobiveni pri optimalnim vremenima ekstrakcija, nađeno je da je ekstrakcija pomoću rotacionog miksera najefikasnija. Prinosi alkaloida dobijeni ovom tehnikom su 1,5 do 3 puta veći u odnosu na prinose dobivene ultrazvučnom ekstrakcijom, odnosno 3 do 20 puta veći u odnosu na maceraciju biljnog materijala. Kada se polazi od 1,00 g suvog, sprašenog i homogenizovanog biljnog materijala, za ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida optimalno je upotrebiti 30 ml rastvora sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L (uz primenu rotacionog miksera, u trajanju tri dana).

Posle ekstrakcije biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L, odvajanja kiselog ekstrakta od ostatka biljnog materijala, uklanjanja jedinjenja koja su nepolarnija od alkaloida metilen-hloridom, prečišćeni kiseli rastvori se zaalkališu i alkaloidi ekstrahuju metilen-hloridom. Optimalna pH vrednost baznog rastvora za izolovanje većine strukturno različitih PA sa maksimalnim prinosom je 9, a optimalni broj ponovljenih ekstrakcija sa 30 ml metilen-hlorida je četiri.

Optimizovani postupak omogućava da se u svakoj fazi izolovanja za većinu okarakterisanih pirolizidinskih alkaloida (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktanečin i heliosupin) iz *R. umbellate* Bunge (model-sistem biljnog materijala) postignu maksimalni prinosi, što je veoma važno za izolovanje i karakterizaciju pirolizidinskih alkaloida, za ispitivanje njihove biološke aktivnosti, kao i za pripremu uzoraka biljnog materijala u cilju pouzdanog određivanja njihovog sadržaja.

Ključne reči: pirolizidinski alkaloidi, identifikacija, izolovanje - optimizacija uslova, GC-MS, *Rindera umellata* Bunge

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

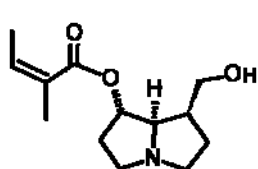
UDK broj: 543

Optimization of Procedure for Isolation and Determination of Pyrrolizidine Alkaloids from Plant Material

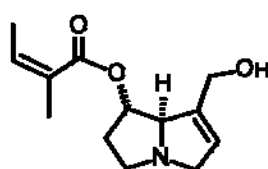
ABSTRACT

The pyrrolizidine alkaloids (PAs) are a large group of secondary metabolites, very widespread in the plant world. Several hundred PAs and their N-oxides have now been described in over than 6 000 plants, which belong to unrelated botanical families. Many plants rich in PAs have been used in traditional medicine in Asia and Africa, which makes them interesting for phytochemical research. On the other hand, some PAs are very toxic to humans and animals. Acute PA poisoning causes severe damage to the liver and long-term, sub-lethal doses may cause cumulative damage, and manifestation of neurotoxic, mutagenic and carcinogenic effects. Because of this the importance of scientific research of PAs, as well as the necessity of the development of analytical methods for determination of individual and total PAs in plant material is highlighted. Many methods for isolation and purification of PAs are proposed, but due to the diversity of PAs structure and chemical properties, none of them has found wide application in practice. Therefore, the goal of this doctoral thesis was the optimization of all phases of the procedure for isolation of pyrrolizidine alkaloids from plant material so that these structurally different compounds can be isolated with a maximum yields. The plant *Rindera umbellata* Bunge was used as a model system. In addition, the goal of this thesis was the isolation of individual alkaloids from the afore mentioned plant species, their characterization, i.e. structure determination.

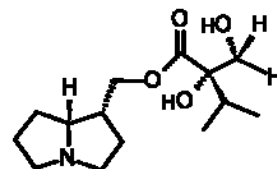
Six PAs (7-angeloyl heliotridane, 7-angeloyl heliotridine, lindelofine, 7-angeloyl rinderine, punctanecine and heliosupine, PA1 – PA6, respectively) were isolated and structurally characterized:



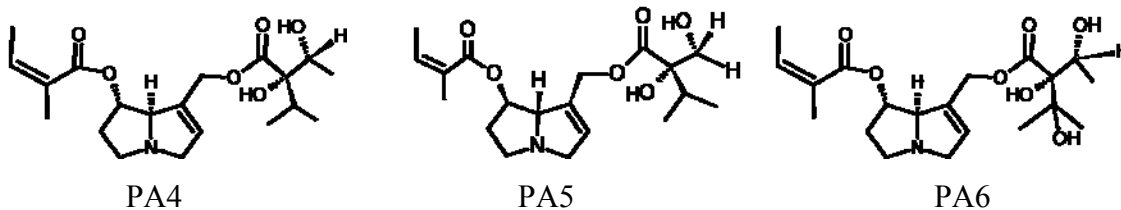
PA1



PA2



PA3



During the optimization of each step of PAs isolation from plant material the yields of all of six characterized PAs were monitored. Different conditions and techniques for PAs isolation were tested and compared: the extraction time for plant material maceration in the methanol, the efficiency of extraction with different media (methanol, ethanol and sulfuric acid), the extraction with sulfuric acid (concentration and volume), the extraction techniques (maceration at room temperature, ultrasonic and overhead rotary mixer assisted extraction), the duration of the extraction, pH of PAs solution for alkaline extraction with methylene chloride, the number of the re-extraction with methylene chloride. The contents and yields of PA in isolated and purified mixtures were monitored by GC-MS/FID using pentacosane as the inert standard.

When the extraction of PAs was performed by maceration of dried, powdered and homogenized plant material in methanol the maximal yields for all of six monitored alkaloids were obtained after four days of maceration.

The efficiency of extraction of all six PAs with methanol, ethanol and sulphuric acid solution was investigated by maceration during four days at room temperature and dark place. It was found that the amounts of alkaloids extracted with ethanol and sulphuric acid were considerably alike. In PAs isolation the extraction with ethanol included three steps (maceration, removing of the ethanol and dissolution of residue in sulphuric acid), but with sulphuric acid only one, which is very important for laboratory practice. Beside that, the extraction with sulfuric acid allows the isolation of a number of pyrrolizidine alkaloids compared to extractions with methanol and ethanol. Therefore, the use of sulfuric acid for PA extraction from plant material is suggested.

The concentration of sulfuric acid of 1 mol/L was recognized as optimal for extraction of the most structurally different PAs from plant material. By applying of various extraction techniques [maceration on dark place, an ultrasonic bath (lasted ten hours per day) and an overhead rotary mixer assisted extractions] and various extraction times it was found that the optimum extraction time for all six followed alkaloids is four

days for the maceration of plant material, three days for the extraction in an ultrasonic bath and by overhead rotary mixer. When the yields of six alkaloids (PA1- PA6), achieved over optimal time of extraction, are compared it was found that the extraction by an overhead rotary mixer is the most efficient. The yields accomplished by overhead rotary mixer were 1.5 to 3 times higher than those obtained by extraction in ultrasonic bath, i.e. 3-20 times higher comparing to maceration of plant material. When starting from 1.00 g of dry, powdered and homogenized plant material, it is optimal to use the volume of 30 ml of 1 mol/L sulfuric acid for the extraction of pyrrolizidine alkaloids (by overhead rotary mixer for three days).

After the extraction of plant material with sulfuric acid solution ($C=1\text{mol/L}$), separation of the extract from the rest of plant material, and removing of the compounds which are more non-polar than alkaloids with methylene chloride, the purified acid solution were then made alkaline and alkaloids were extracted with methylene chloride. For the isolation of the most structurally diverse PA with maximal yields the optimal pH value of alkaline solution was 9, and the optimal number of the re-extraction with 30 ml of methylene chloride was four.

Applying of described procedure for isolation of characterized PAs (7-angeloyl heliotridane, 7-angeloyl heliotridine, lindelofine, 7-angeloyl rinderine, punctanecine and heliosupine) from *Rindera umbellata* Bunge (model-sistem for plant material) under conditions which are underlined as optimal allows the achievement of the highest yields for the most PAs. That is very important for isolation and characterization of pyrrolizidine alkaloids, for investigation of their biological activity, but also for plant sample preparation for the purpose of reliable analyses of their content.

Keywords: Pyrrolizidine alkaloids, identification, isolation - optimization of pocedure, GC-MS, *Rindera umellata* Bunge

Academic Expertise: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analitical Chemistry

UDK number: 543

SADRŽAJ

Spisak simbola i skraćenica.....	xii
1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	4
2.1. Struktura pirolizidinskih alkaloida.....	4
2.2. Podela pirolizidinskih alkaloida prema strukturi	9
2.3. Biosinteza pirolizidinskih alkaloida.....	12
2.3.1. Biosinteza necinskih baza.....	12
2.3.2. Biosinteza necinskih kiselina.....	14
2.4. Toksičnost pirolizidinskih alkaloida.....	17
2.4.1. Genotoksičnost pirolizidinskih alkaloida.....	20
2.5. Biotransformacija (metabolizam) pirolizidinskih alkaloida	22
2.5.1. Metabolizam 1,2-nezasićenih pirolizidinskih alkaloida – reakcije I faze biotransformacije	22
2.5.2. Metabolizam 1,2-nezasićenih pirolizidinskih alkaloida – reakcije II faze biotransformacije	28
2.5.3. Ispoljavanje toksičnog efekta 1,2-nezasićenih pirolizidinskih alkaloida kod različitih vrsta.....	28
2.5.4. Metabolizam zasićenih pirolizidinskih alkaloida.....	29
2.6. Prisustvo i rasprostranjenost pirolizidinskih alkaloida u biljnim vrstama.....	30
2.7. Biljna vrsta <i>Rindera umbellata</i> Bunge.....	33
2.8. Izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala.....	34
2.8.1. Priprema uzorka biljnog materijala.....	34
2.8.2. Ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala.....	35
2.8.3. Prečišćavanje početnog ekstrakta pirolizidinskih alkaloida.....	36
2.8.4. Izolovanje čistih pirolizidinskih alkaloida iz prečišćene smeše.....	38
2.8.5. Hromatografske metode u identifikaciji i određivanju izolovanih pirolizidinskih alkaloida.....	38
2.8.6. Nuklearna magnetna rezonanca.....	41
2.8.7. Ostale metode za određivanje pirolizidinskih alkaloida.....	42

3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	43
3.1. Aparati i hemikalije.....	43
3.2. Biljni materijal	44
3.3. Izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala <i>R. umbellata</i> Bunge	44
3.4. Spektralni podaci izolovanih pirolizidinskih alkaloida.....	45
3.5. Maceracija biljnog materijala u metanolu.....	47
3.6. Maceracija biljnog materijala u etanolu.....	47
3.7. Maceracija biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline (C=1 mol/L).....	48
3.8. Optimizacija koncentracije rastvora sumporne kiseline za ekstrakciju biljnog materijala.....	48
3.9. Izbor tehnike za efikasnu ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida. Određivanje optimalnog vremena trajanja ekstrakcije sumpornom kiselinom..	49
3.10. Optimizacija zapremine rastvora sumporne kiseline.....	49
3.11. Optimizacija uslova za alkalnu ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida.....	50
3.12. Broj ponovljenih ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida metilen-hloridom.....	50
3.13. Prinos pirolizidinskih alkaloida.....	51
4. REZULTATI I DISKUSIJA	52
4.1. Izolovanje i određivanje strukture pirolizidinskih alkaloida iz <i>R. umbellata</i> Bunge	53
4.2. Praćenje sadržaja pirolizidinskih alkaloida tokom optimizacije postupka za izolovanje, pomoću GC-MS/FID.....	67
4.3. Optimizacija postupka za izolovanje pirolizidinskih alkaloida.....	69
4.3.1. Maceracija u metanolu.....	70
4.3.2. Efikasnost ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida metanolom, etanolom i sumpornom kiselnom.....	72
4.3.3. Ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida sumpornom kiselinom.....	76
4.3.3.1. Koncentracija rastvora sumporne kiseline.....	76
4.3.3.2. Primena različitih tehnika za ekstrakciju. Vreme trajanja ekstrakcije rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L.....	78
4.3.3.2.1. Maceracija biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L.....	78

4.3.3.2.2. Ultrazvučna ekstrakcija biljnog materijala.....	80
4.3.3.2.3. Ekstrakcija biljnog materijala pomoću rotacionog miksera....	82
4.3.3.2.4. Poređenje efikasnosti različitih tehnika ekstrakcije.....	84
4.3.3.3. Zapremina rastvora sumporne kiseline.....	86
4.3.4. Ekstrakcija alkaloida iz alkalnog rastvora metilen-hloridom.....	88
4.3.5. Broj ponovljenih ekstrakcija alkaloida iz alkalnog rastvora metilen- hloridom.....	90
5. ZAKLJUČAK.....	92
6. LITERATURA.....	95
BIOGRAFIJA.....	114

Spisak simbola i skraćenica

PA	pirolizidinski alkaloidi
PA1-PA6	oznake za izolovane PA (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktanečin i heliosupin, redom)
TLC	tankoslojna hromatografija (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
^1H NMR	^1H nuklearno magnetno rezonantna (spektroskopija)
^{13}C NMR	^{13}C nuklearno magnetno rezonantna (spektroskopija)
δ_{H}	hemijsko pomeranje u ^1H NMR spektru
δ_{C}	hemijsko pomeranje u ^{13}C NMR spektru
$\Delta\delta_{\text{H}}$	razlika u hemijskim pomeranjima u ^1H NMR spektru
$\Delta\delta_{\text{C}}$	razlika u hemijskim pomeranjima u ^{13}C NMR spektru
[M-H] ⁻	kvazimolekularni jon nastao gubitkom atoma vodonika
$J_{x,y}$	konstanta sprežanja protona X i Y (u Hz)
GC-MS/FID	gasna hromatografija sa masenim i plameno-jonizujućim detektorom
HPLC	tačna hromatografija visokog razlaganja
UV	ultraljubičasta spektroskopija
RIA	Radioimuno-esej
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
RSD	relativna standardna devijacija
CDCl_3	deuterisani hloroform
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
DHP	dehidropirolizidinski derivat
DHPA	dehidropirolizidinski alkaloid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
Cyt P450	citohrom P450

1. UVOD

Izolovanje, karakterizacija strukture i određivanje sadržaja pirolizidinskih alkaloida (PA) predstavlja značajan deo istraživanja u različitim naučnim disciplinama kao što su: fitohemija, farmacija, toksikologija, botanika, taksonomija, ekologija i entomologija.

PA su velika grupa sekundarnih metabolita veoma rasprostranjenih u biljnom svetu. Oko 3 % biljaka cvetnica sadrže PA. Više stotina PA i njihovih derivata N-oksida identifikovano je u više od 6000 biljaka, koje pripadaju nepovezanim botaničkim familijama: Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Apiaceae, Convolvulaceae, Celestraceae, Proteaceae, Santalaceae, Sapotaceae, Ranunculaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Scrophulariaceae i Poaceae. Najviše su zastupljeni u biljnim vrstama iz familija Asteraceae (*Tussilago farfara*, *Petasites sp.*, *Senecio sp.*, *Adenostyles alliariae*, *Eupatorium sp.*), Boraginaceae (*Symphytum sp.*, *Borago officinalis*, *Anchusa officinalis*, *Cynoglossum officinale*, *Echium sp.*, *Heliotropium sp.*, *Lithospermum sp.*) i Fabaceae (*Crotalaria sp.*).

PA su veoma toksični za ljude i životinje. Brojne intoksikacije ljudi do kojih dolazi pri konzumaciji navedenih biljaka pripisane su PA. Oni se mogu naći kao kontaminanti žitarica, mleka, meda, suplemenata u ishrani, pa njihov unos može da dovede do velikih problema po zdravlje ljudi. Zabeležena su trovanja i životinja, uključujući domaće (konje, krave, ovce, piliće...), što je dovodilo do gubitaka stočnog fonda. Nakon unošenja hranom, pirolizidinski alkaloidi se apsorbuju u tankom crevu. Manji udeo alkaloida se pomoću nespecifičnih esteraza u krvi hidrolizuje do necina i necinskih kiselina. Necini su netoksični i ekskretuju se kao konjugati preko bubrega i urina. Najveći udeo alkaloida se transportuje u jetru gde se biotransformišu. U biotransformaciji neki PA se aktiviraju. Oko polovina ispitivanih PA ispoljava različite toksične efekte: genotoksičnost (dovode do kroslinkinga DNK lanaca, povezivanja proteina i DNK, hromozomskih aberacija, mutageneze, teratogeneze i karcinogeneze), neurotoksičnost, dovode do pulmonarnih lezija, utiču na metabolizam bakra, gvožđa, vitamina A i E, koji se nagomilavaju u jetri. U nekim slučajevima PA ispoljavaju i antitumorno dejstvo.

Zbog ispoljenih toksičnih dejstava PA na ljude i životinje, „**United Nations Enviroment Programme**“, „**International Labor Organization**“ i „**World Health**

Organization“ ističu značaj naučnog istraživanja PA, a „**European Food Safety Authority**“ neophodnost razvoja analitičkih metoda za određivanje pojedinačnih i ukupnih pirolizidinskih alkaloida u biljnom materijalu. Dakle, uprkos tome što su PA bili cilj naučnog istraživanja već mnogo godina, interes za novim analitičkim metodama za njihovo izolovanje, karakterizaciju i određivanje iz biljnog materijala i dalje postoji. Zbog različitosti u strukturi PA još uvek nije ustanovljena metoda kojom bi se svi tipovi alkaloida tačno, reproduktivno i brzo određivali. Najčešće primenjene metode za identifikaciju i određivanje pirolizidinskih alkaloida su GC-MS i HPLC-MS, ali svaka od njih ima prednosti i ograničenja koja su uzrokovana različitom prirodom strukturno različitih alkaloida.

Izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, sa ciljem dobivanja prečišćene smeše alkaloida, čiji se sadržaj dalje može određivati nekom od instrumentalnih metoda, ili sa ciljem izolovanja čistih alkaloida kako bi se odredila njihova struktura ili biološka aktivnost, je najbitniji korak. Za ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala u literaturi su upotrebljavani različiti rastvarači (metanol, etanol, kiselina/metanol, hloroform/metanol, voda i rastvori sumporne, hlorovodonične i limunske kiseline) kao i različite tehnike (maceracija, ultrazvučna ekstrakcija, Soxhlet-ova ekstrakcija, super-kritična ekstrakcija sa ugljen-dioksidom i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera).

Cilj ovog rada je optimizacija uslova za izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala. Različiti uslovi i tehnike izolovanja ispitane su i upoređene sa ciljem utvrđivanja postupka za izolovanje iz biljnog materijala koji bi omogućio dobivanje smeše PA sa maksimalnim prinosom prečišćenih pirolizidinskih alkaloida. Utvrđeni postupak može se primenjivati za pripremu uzoraka biljnog materijala prilikom određivanja pirolizidinskih alkaloida GC-MS-om i HPLC-MS-om ili za dobivanje prečišćene smeše alkaloida, koja može biti dalje razdvajana radi utvrđivanja strukture i biološke aktivnosti pojedinačnih alkaloida.

U **OPŠTEM DELU** ovog rada prikazana su strukturna svojstva, podela i biosinteza pirolizidinskih alkaloida. Posebna pažnja posvećena je toksičnosti pirolizidinskih alkaloida (genotoksičnosti, mutagenosti i tumorogenosti), njihovom metabolizmu, odnosno reakcijama biotransformacije koje dovode do bioaktivacije i

detoksifikacije ovih jedinjenja. Dat je pregled prisustva i rasprostranjenosti pirolizidinskih alkaloida u biljnim vrstama i opis biljne vrste *R. umbellata* Bunge sa kojom su optimizacije postupka rađene. Pored toga, dat je kratak pregled analitičkih metoda i tehnika za izolovanje, razdvajanje, određivanje i karakterizaciju pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala.

U delu **REZULTATI I DISKUSIJA** prikazani su postupci izolovanja i određivanja strukture pirolizidinskih alkaloida iz biljne vrste *R. umbellata* Bunge. Struktura izolovanih alkaloda je određena primenom savremenih spektrometrijskih i spektroskopskih metoda: masene spektrometrije i NMR spektroskopije. Prikazani su i upoređivani rezultati dobiveni pri optimizaciji pojedinačnih koraka izolovanja PA iz biljnog materijala, odnosno rezultati dobiveni ispitivanjem različitih uslova i tehnika izolovanja:

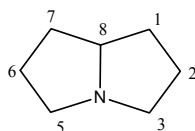
- Vreme ekstrakcije maceracijom biljnog materijala u metanolu,
- Efikasnost ekstrakcija sa metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline,
- Ekstrakcija sa sumpornom kiselinom:
 - Koncentracija i zapremina sumporne kiseline
 - Vreme i tehnike ekstrakcije:
 - Maceracija na sobnoj temperaturi,
 - Ultrazvučna ekstrakcija,
 - Ekstrakcija pomoću rotacionog miksera,
- pH alkalne ekstrakcije PA iz vodenog rastvora sa metilen-hloridom,
- Broj ponovljenih ekstrakcija PA sa metilen-hloridom iz alkalnog rastvora na pH 9.

U **EKSPERIMENTALNOM DELU** dati su podaci o instrumentima, hemikalijama i eksperimentalnim tehnikama primenjenim tokom izolovanja pirolizidinskih alkaloida, podaci o biljnom materijalu, kao i spektroskopski podaci za izolovana jedinjenja.

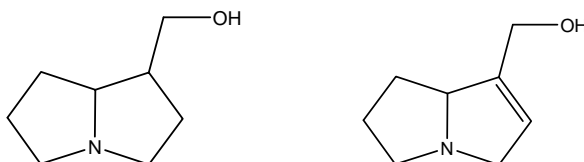
2. OPŠTI DEO

1.1. Struktura pirolizidinskih alkaloida

Strukturna osnova pirolizidinskih alkaloida (PA) je pirolizidinski prsten, azabiciklo [3,3,0]oktan.



Kada bicikličan sistem sadrži jednu ili više hidroksilnih grupa (aminoalkohol) naziva se necin ili necinska baza.



Uobičajene strukturne karakteristike pirolizidinskih alkaloida su:

- C-1 supstituisan hidroksimetil-grupom,
- C-7 supstituisan hidroksilnom grupom,
- 1,2-dvostruka veza.

Na osnovu stepena hidroksilovanja prstena može se razlikovati nekoliko tipova necinskih baza (izoretronecanol, supinidin, platinecin, hastanecin, heliotridin, retronecin, rozmarinecin, krotanecin) (Tabela 1).

Postoje i alkaloidi koji ne sadrže bicikličan sistem, već *N*-metilovani azaciklooktan-4-onski prsten, ali se svrstavaju u ovu grupu alkaloida. To je otonecinski tip alkaloida.

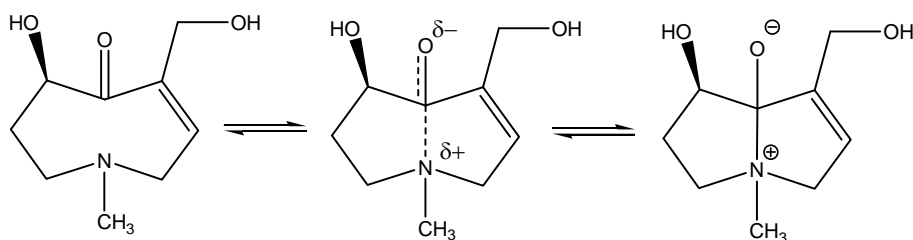
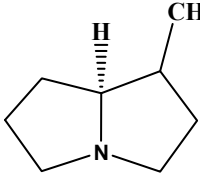
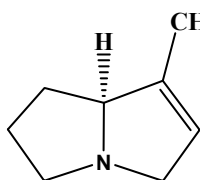
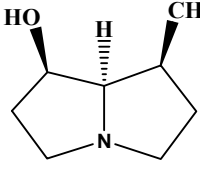
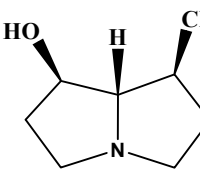
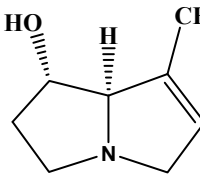
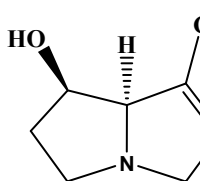
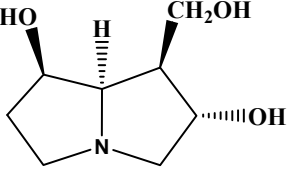
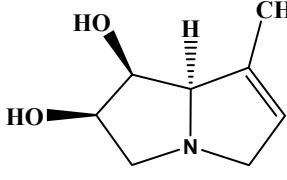
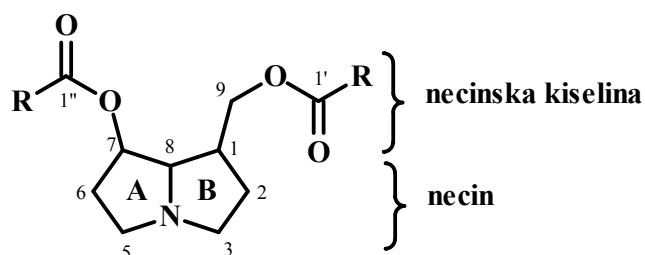


Tabela 1. Tipovi necinskih baza prema stepenu hidroksilovanja prstena

Stepen hidroksilovanja	Tipovi necinskih baza
<p>Jedna primarna alkoholna grupa (na C-9)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Izoretronecanol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Supinidin</p> </div> </div>
<p>Jedna primarna (na C-9) i jedna sekundarna alkoholna grupa (na C-7)</p>	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;">  <p>Platinecin</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Hastanecin</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Heliotridin</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Retronecin</p> </div> </div> </div>
<p>Jedna primarna (na C-9) i dve sekundarne alkoholne grupe (na C-7, na C-2 ili C-6)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Rozmarinecin</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Krotanecin</p> </div> </div>

Hidroksilne grupe necina mogu biti esterifikovane kiselinama koje se nazivaju necinske kiseline. Necinske kiseline obično sadrže pet do deset ugljenikovih atoma. Mogu biti mono- i dikarboksilne kiseline. Neke od monokarboksilnih necinskih kiselina

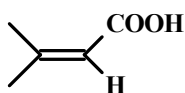
koje sadrže dva do sedam C-atoma i koje često ulaze u sastav acikličnih mono- i diestarskih pirolizidinskih alkaloida, date su na slici 1.



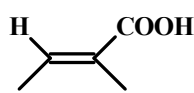
C₂ – kiseline

CH₃COOH, sirćetna kiselina

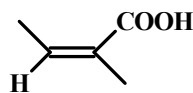
C₅ – kiseline



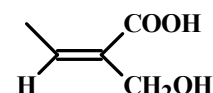
Senecioninska kiselina
(Sen)



Tiglična kiselina
(Tig)

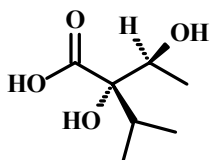


Angelična kiselina
(Ang)

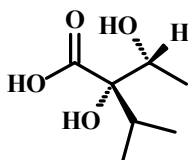


Saracinska kiselina
(Sar)

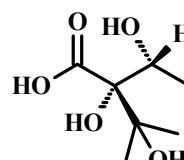
C₇ – kiseline



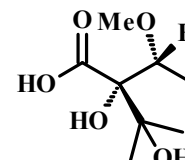
(-) -Viridiflorinska kiselina



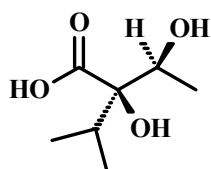
(+) -Trahelantna kiselina



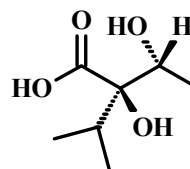
Ehimidinska kiselina



Laziokarpna kiselina



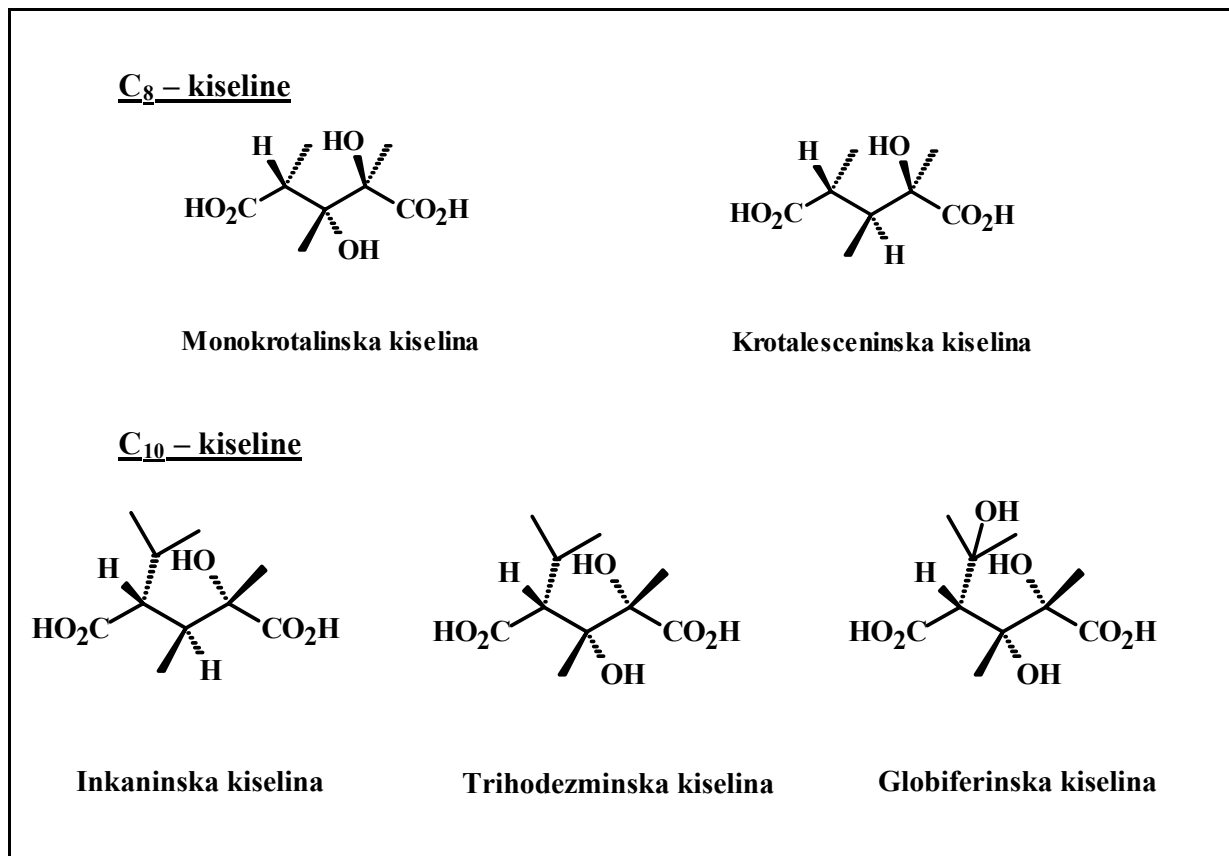
(-) -Trahelantna kiselina



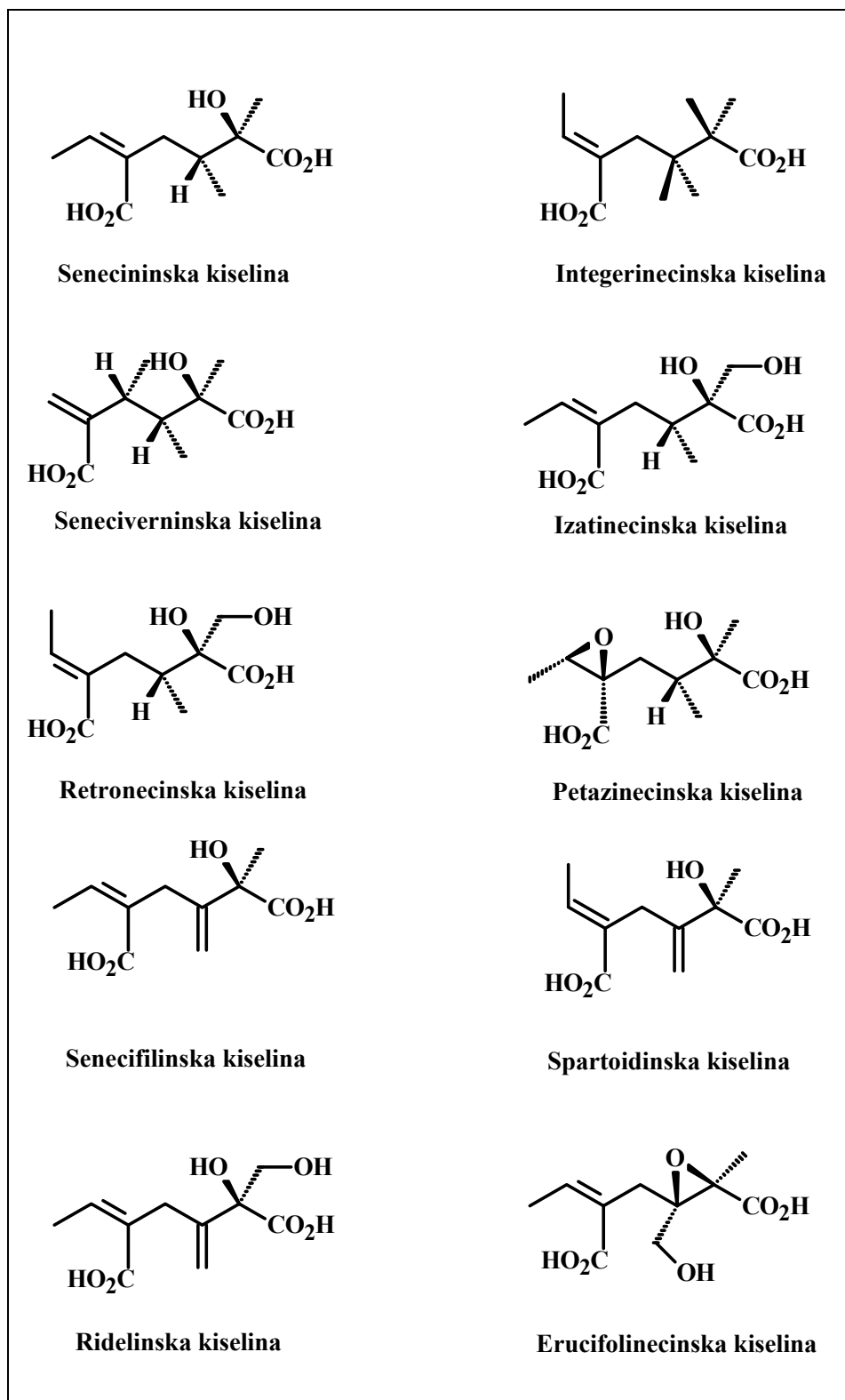
(+) -Viridiflorinska kiselina

Slika 1. Monokarboksilne necinske kiseline koje ulaze u sastav acikličnih mono- i diestarskih pirolizidinskih alkaloida

Dikarboksilne necinske kiseline, koje sadrže osam i deset C-atoma, grade makrociklične estre sa 11 (slika 2) i 12 (slika 3) članova.



Slika 2. Dikarboksilne necinske kiseline koje grade makrociklične estre sa 11 članova

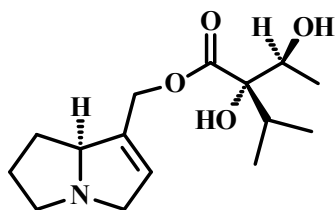


Slika 3. Dikarboksilne (C_{10}) necinske kiseline koje grade makrociklične estre sa 12 članova

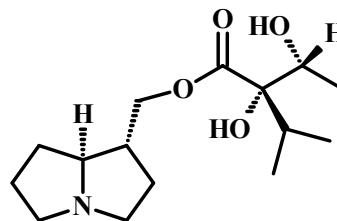
2.2. Podela pirolizidinskih alkaloida prema strukturi

Prema strukturi PA se mogu svrstati u sledeće kategorije:

1. *Monoestri* nastali esterifikacijom primarne alkoholne grupe necinske baze monokarboksilnom kiselinom (amabilin, trahelantamin):

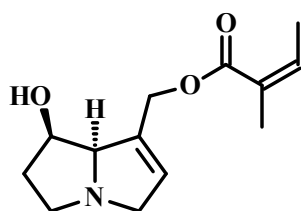


Amabilin

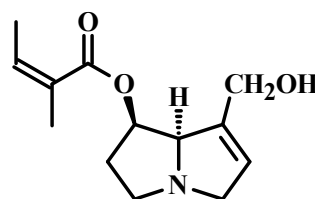


Trahelantamin

2. *Monoestri* nastali esterifikacijom jedne od dve prisutne hidroksilne grupe necinske baze monokarboksilnom kiselinom (9-angeloilretronecin, 7-angeloilretronecin):

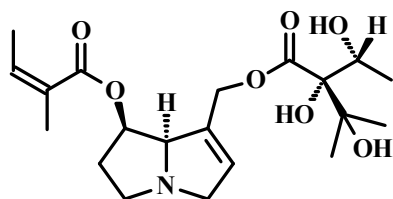


9-Angeloilretronecin

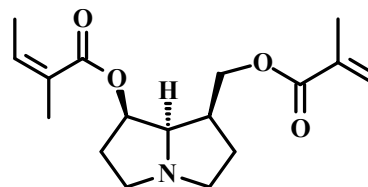


7-Angeloilretronecin

3. *Diestri* nastali esterifikacijom obe hidroksilne grupe necinske baze monokarboksilnim kiselinama (ehimidin, 7,9-diangeloilplatinecin).



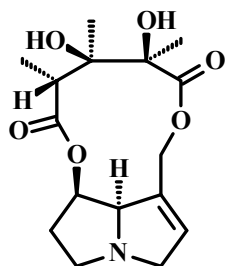
Ehimidin



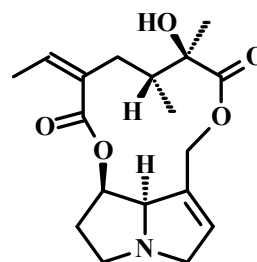
7,9-Diangeloilplatinecin

4. *Ciklični diestri*, nastali esterifikacijom obe hidroksilne grupe necinske baze dikarboksilnim kiselinama. Kao što je napred navedeno, mogu da sadrže 11

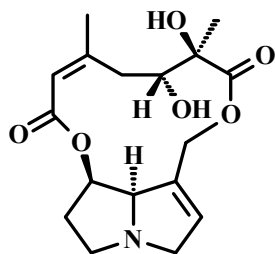
članova (monokrotalin), 12 članova (senecionin), 13 članova (doronenin) i 14 članova (parsonzin).



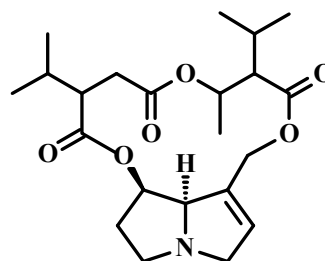
Monokrotalin



Senecionin

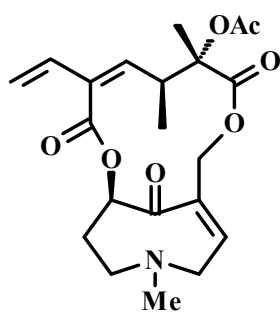


Doronenin

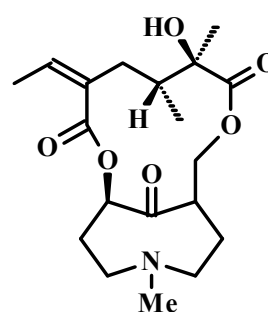


Parsonzin

5. *Ciklični estri otonecinskog tipa*, koji nastaju esterifikacijom obe hidroksilne grupe dikarboksilnim kiselinama. Najčešće imaju 1,2-dvostruku vezu (klivorin), a postoje i oni sa zasićenim prstenom (1,2-dihidrosenkirkin).

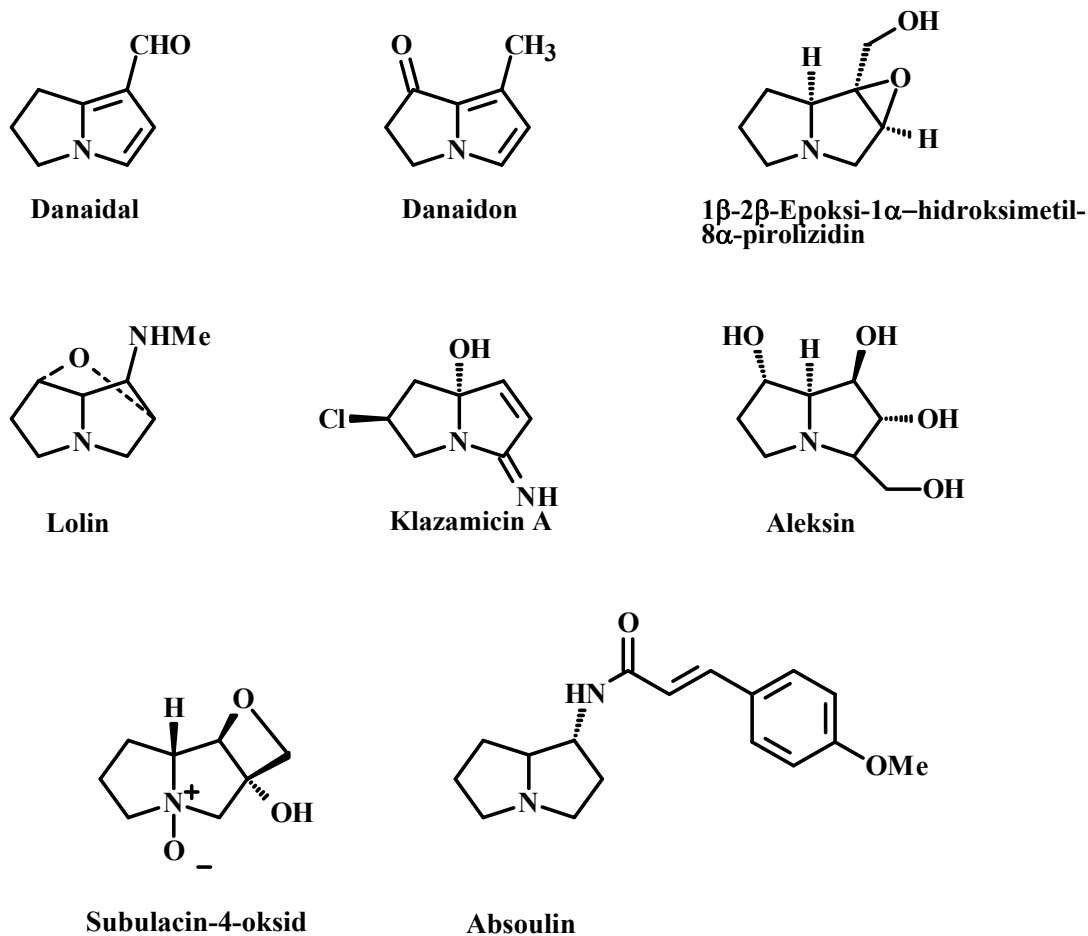


Klivorin



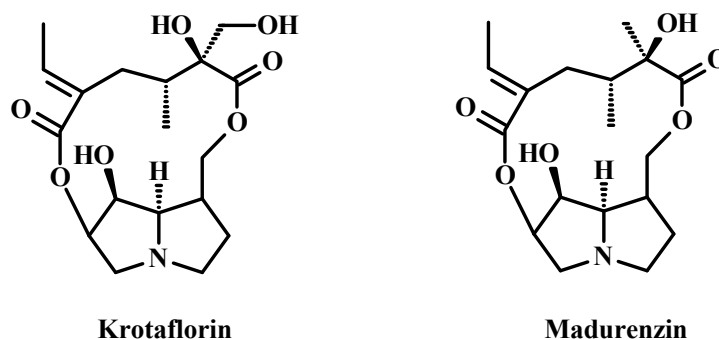
1,2-Dihidrosenkirkin

Neki PA se prema strukturi ne mogu svrstati ni u jednu od navedenih grupa^{1,2}. U svom sastavu mogu da sadrže više alkoholnih ili estarskih grupa u prstenu, aldehidnu grupu, epoksidne prstenove na različitim ugljenikovim atomima ili vezane halogene. Formule nekih od njih prikazane su na slici 4.

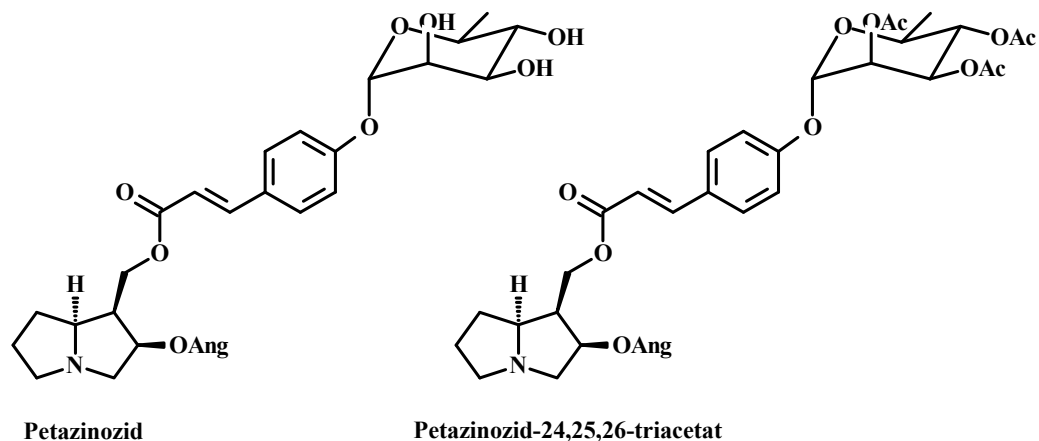


Slika 4. Strukture netipičnih pirolizidinskih alkaloida

Među “neobične” strukture PA se mogu uvrstiti i makrociklični estri kod kojih nije esterifikovana sekundarna alkoholna grupa na položaju C-7, već na C-6. Na taj način se stvara prsten sa 13 članova (krotaflorin, madurenzin)³.



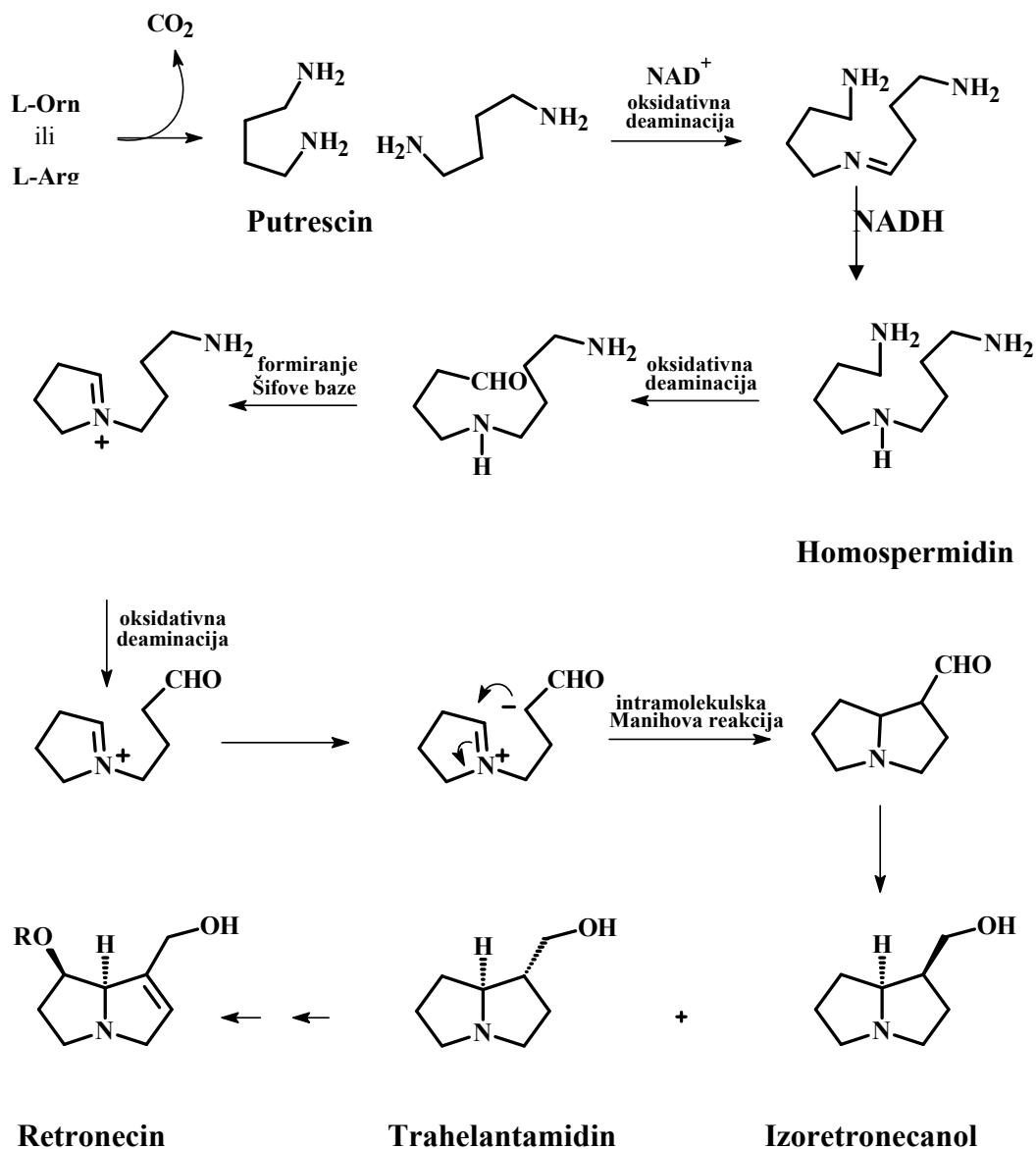
Neki PA se u prirodi nalaze u obliku glikozida³:



2.3. Biosinteza pirolizidinskih alkaloida

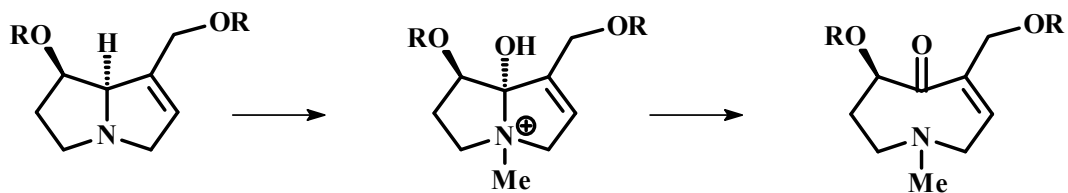
2.3.1. Biosinteza necinskih baza

Biosinteza necina (Slika 5) počinje dekarboksilacijom aminokiselina L-arginina i L-ornitina pri čemu nastaje putrescin. Reakciju katalizuje arginin- i ornitin-dekarboksilaza. Dva molekula putrescina se najpre oksidativno deaminuju (u prisustvu NAD^+), a zatim se nagrađeni imin redukuje pomoću NADH (u prisustvu homospermidin-sintetaze) i nastaje homospermidin. Oksidativnom deaminacijom homospermidina dobija se aldehyd, ciklizacijom odgovarajući intermedijerni iminijum-jon, a u intramolekulskoj Manihovoj reakciji obrazuje se drugi prsten. Redukcijom aldehydne grupe dobija se 1-hidroksimetil-pirolizidin, izoretronecanol i trahelantamidin. Daljom hidroksilacijom i dehidratacijom nastaje retronecin.



Slika 5. Biosinteza necinskih baza

N-metilovani azaciklooktan-4-onski prsten otonecinskog tipa alkaloida nastaje iz retronecina, najverovatnije reakcijom hidrosilacije, oksidacijom hidroksilne grupe do karbonilne grupe, uz simultano cepanje C–N veze i N-metilovanje:

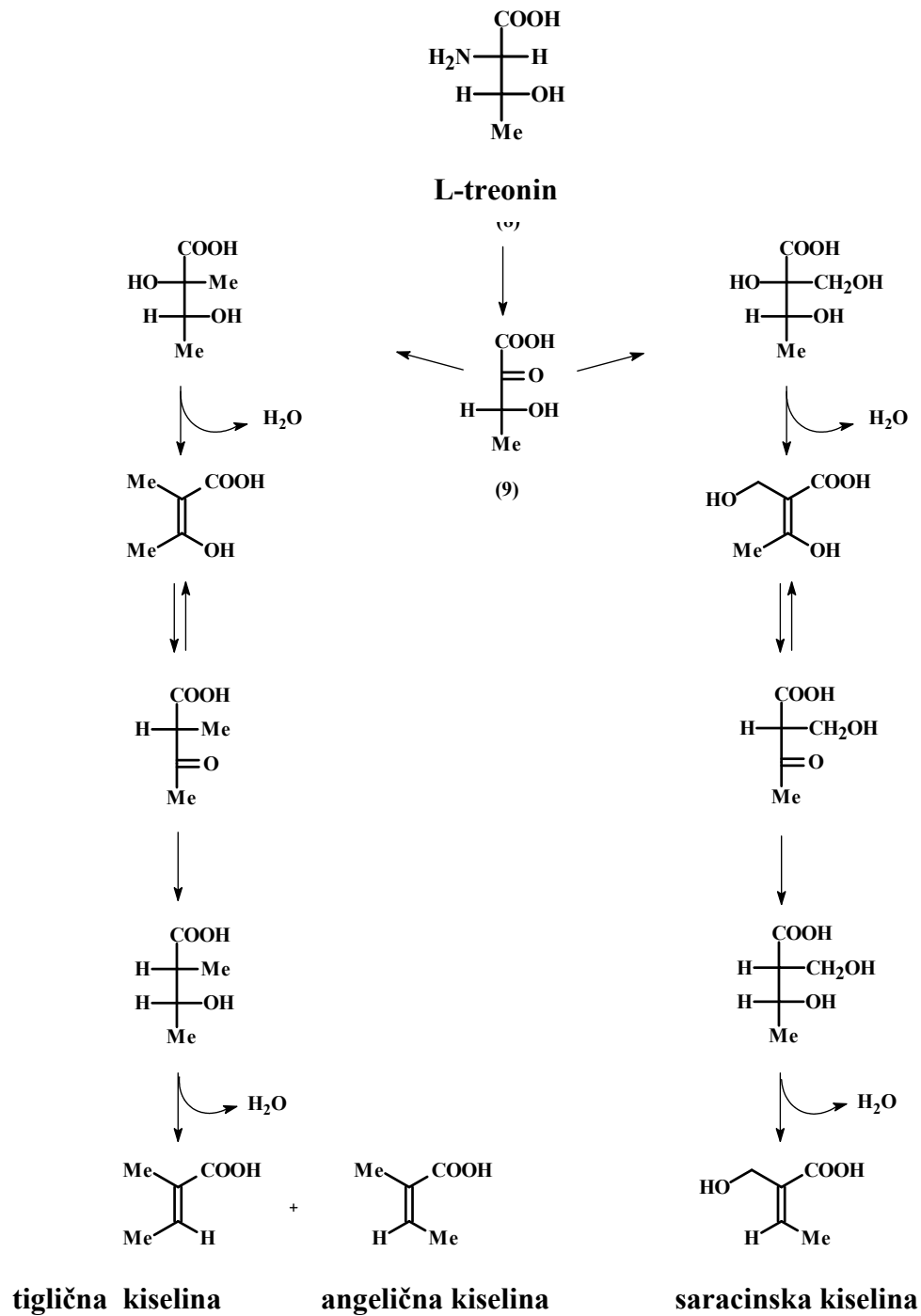


2.3.2. Biosinteza necinskih kiselina

Aminokiseline L-valin, L-leucin, L-izoleucin i L-treonin su polazne supstance za biosintezu necinskih kiselina. Necinske kiseline nemaju zajednički put biosinteze.

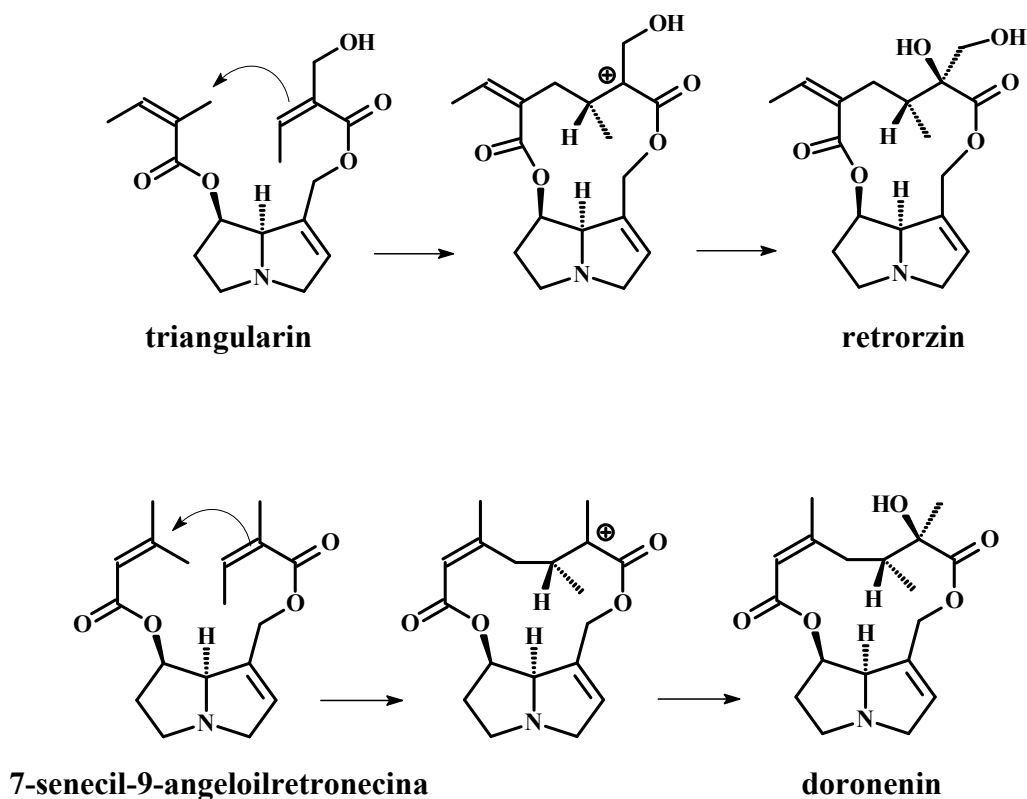
U metabolizmu L-treonina nastaju monokarboksilne kiseline sa pet ugljenikovih atoma i dvostrukom vezom. Najpre, oksidativnom deaminacijom treonina, nastaje keto-kiselina, koja ulazi u dva biosintetska puta. Proizvodi jednog puta su tiglična i angelična, a drugog saracinska kiselina (Slika 6).

Senecioninska, (+) i (-)-viridiflorinska, kao i (+) i (-)-trahelantna kiselina se biosintetišu iz valina (Slika 7) aciloinском reakcijom sa aktiviranim acetaldehidom, hidroksietil-tiamin-pirofosfatom (hidroksietil-TPP).



Slika 6. Biosinteza necinskih kiselina (tiglične, angelične i saracinske) iz L-treonina

Na sličan način, preko karbo-katjonskog intermedijera, iz triangularina nastaje retrorzin, a iz 7-senecil-9-angeloilretronecina doronenin.



2.4. Toksičnost pirolizidinskih alkaloida

PA su česti konstituenti kod nekoliko hiljada biljnih vrsta. Brojne intoksikacije ljudi do kojih dolazi pri konzumaciji ovih biljaka, pripisane su PA.^{4,5,6} U Avganistanu⁷, Indiji⁸ i Tadžikistanu oko 6000 ljudi otrovano je zbog konzumacije hleba kontaminiranog vrstama *Heliotropium* i *Crotalaria*. Sa druge strane, mnoge biljne vrste bogate PA se primenjuju u tradicionalnoj medicini u Aziji i Africi (što ih čini interesantnim za fitohemijska istraživanja). Veoma česte su intoksikacije zbog primene medicinskih biljaka *Senecio* i *Crotalaria*. Na Jamajci i susednim ostrvima, u istočnoj i južnoj Africi i drugim tropskim u subtropskim zemljama⁹ zbog kontinuirane primene medicinskog bilja dolazilo je do razvoja bolesti jetre (ciroze i primarnih tumora). Iako se ove bolesti uglavnom javljaju u zemljama u razvoju, gde je primena biljaka u

narodnoj medicini veoma zastupljena, i u razvijenim zemljama (USA, Nemačka) dolazilo je do trovanja zbog kontaminacija biljkama koje sadrže PA^{10,11}. PA se mogu naći kao kontaminanti žitarica, mleka, meda, te stoga njihova upotreba može dovesti do velikih problema po zdravlje ljudi^{4,12,13,14}. Od 1990. godine upotreba suplemenata u ishrani se znatno povećala i zabeleženo je prisustvo PA u nekim od njih¹⁵. Zbog toga je posebna pažnja posvećena i ovom izvoru izloženosti pirolizidinskim alkaloidima.

Trovanja mnogih životinja, uključujući i domaće (konje, krave, ovce, piliće...) biljkama koje sadrže PA (što je dovelo do gubitaka stočnog fonda) su takođe zabeležena.^{12,16, 17-21}

Ispitivanja aktivnosti PA iz biljaka su pokazala da oni ispoljavaju neurotoksične, mutagene i karcionogene efekte, da dovode do pulmonarnih lezija²²⁻²⁸, da utiču na metabolizam bakra, gvožđa, vitamina A i E, koji se nagomilavaju u jetri. U prisustvu PA dolazi do smanjenog vezivanja gvožđa za hemoglobin, što kao posledicu ima anemiju. Intoksikacija PA indukuje nedostatak ćelijskog antioksidanta vitamina E. Bakar povećava peroksidaciju lipida, što može povećati potrebe za vitaminima E i A^{29,30}.

Pirolizidinski alkaloidi se razlikuju po toksičnosti^{14,31}, što je posledica razlika u njihovoj strukturi. Amino-alkoholi nisu toksični. Ciklični diestri su najtoksičniji, ispoljavaju akutnu toksičnost. Neciklični diestri ispoljavaju intermedijarnu toksičnost, a monoestri su najmanje toksični. U Tabeli 2 prikazane su LD₅₀ vrednosti za neke PA iz roda *Senecio*, izražene u mg/kg telesne mase pacova. Razlike u toksičnosti PA na mušici *Drosophila melanogaster*, odnosno mutagenoj aktivnosti, ispoljilo je 16 alkaloida: senkirkin > monokrotalin > senecifilin > senecionin > 7-acetil-intermedin > heliotrin > retrorzin > 7-acetillikopsamin > simfitin > jakolin > simlandin > intermedin > indicin > likopsamin > indicin-N-oksidi > supinin. Makrociklični diestri senkirkin i senecionin ispoljavaju najveću toksičnu aktivnost. Derivati senecionina, retrorzin (12-hidroksimetil-derivat) i jakolin (hidroksi-derivat), ispoljavaju manju mutagenost od njega. Hidroksilacija necinske kiseline smanjuje mutageni efekat. Diestri acikličnog tipa, 7-acetil-intermedin i 7-acetillikopsamin, pokazuju pet do deset puta slabiju aktivnost od makrocikličnih estara. Sa druge strane, oni u obliku acetil-estara pokazuju dva do tri puta jaču aktivnost od simfitina i simladina, koji su tiglil- i angeloil-estri

analogne strukture. Indicin-*N*-oksid (antitumorni agens) pokazuje veoma slab mutageni efekat.

Tabela 2. LD₅₀ vrednosti nekih PA iz *Senecio* vrsta (izražene u mg/kg telesne mase pacova).

Biljka	Aminoalkohol	PA	LD ₅₀ (mg/kg)
<i>S. jacobaea</i>	Retronecin	Senecifilin	77
		Senecionin	85
		Jakobin	77 (miš)
		Jakonin	168 (ženka)
<i>S. vulgaris</i>	Retronecin	Senecionin	85
		Senecifilin	77
		Retrorzin	38
<i>S. langigilobus</i>	Retronecin	Senecifilin	77
		Retrorzin	38
		Ridelin	105 iš)

Alkaloidi, izvedeni iz 1-hidroksimetil-1,2-dehidropirolizidina i esterifikovani sa najmanje jednom razgranatom C₅ karboksilnom kiselinom, ispoljavaju hepatotoksične, a često i pneumotoksične, karcinogene i mutagene efekte^{21,32,33}. Efekti se pojačavaju kada se hidroksilna grupa uvede u C-7 položaj i takođe esterifikuje. Sve ovo pokazuje da razlike u toksičnom efektu PA potiču od razlika u njihovoj strukturi, odnosno toksični efekti PA su posledica prisustva sledećih strukturnih elemenata u alkaloidima:

- 1,2-dvostruke veze,
- prisustvo jedne, ili dve hidroksilne grupe vezane za pirolinski prsten preko jednog C-atoma,
- prisustvo najmanje jedne esterifikovane grupe i

- prisustvo razgranatog niza u kiseloj komponenti vezanoj za primarnu alkoholnu grupu na C-9.

Alkaloidi *N*-oksidi su manje toksični. Posle oralnog unosa, dejstvom enzima reduktaza iz bakterijske flore redukuju se, a potom apsorbuju u tankom crevu. Za razliku od odgovarajućih alkaloida rastvorljiviji su vodi, pa im je i farmakokinetika različita.

Pirolizidinski alkaloidi, posebno oni iz roda *Senecio*, *Crotalaria*, *Heliotropium* i *Amsinckia*, ispoljavaju akutnu i hroničnu toksičnost. Akutna toksičnost PA se ispoljava kroz hepatotoksičnost sa hemoragijskim nekrozama. Za većinu alkaloida LD₅₀ vrednosti, određene na pacovima, iznose od 34-300 mg/kg, mada se nekada približavaju vrednosti od 1000 mg/kg.

Kod hroničnog trovanja dolazi do oštećenja, uglavnom, jetre, pluća i krvnih sudova, a u nekim slučajevima bubrega, pankreasa, gastrointestinalnog trakta, koštane srži i mozga³³. Izloženost, u dugom periodu, dovodi do uvećanja ćelija, jedra, gubitka metaboličke funkcije, inhibicije mitoze, ciroze jetre i karcinoma. Prestanak funkcije jetre, zbog ciroze, veno-okluzivne bolesti ili atrofije, može nastupiti nekoliko meseci do godinu dana nakon izlaganja manjoj količini alkaloida u jednom ili više navrata. Ovo se objašnjava time da vezivanje pirolnih metabolita za različite nukleofile u jetri može biti reverzibilno i na taj način se formira "depo elektrofila" iz koga se aktivni molekuli otpuštaju s vremena na vreme i oštećuju ćelije. Ovo se dešava sve dok "depo" ne bude ispražnjen, odnosno dok svi aktivni molekuli ne budu eliminisani kao konjugati sa glutationom u urinu ili žuči.

2.4.1. Genotoksičnost pirolizidinskih alkaloida

Posle apsorpcije PA, i metaboličke aktivacije, ispoljavaju se različiti genotoksični efekti. Dolazi do kroslinkinga DNK lanaca, povezivanja proteina i DNK, promena sestara hromatida, hromozomskih aberacija, mutageneze, teratogeneze i karcinogeneze^{22,33-39}.

Mutagenost biljnih ekstrakata koji sadrže PA i čistih PA je ispitivana na različitim biološkim sistemima kao sto su *Drosophila melanogaster*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Aspergillus nidulans*^{34,35,40}, kao i na leukocitima torbara i na

humanim leukocitima, ćelijama jetre miševa, pacova, hrčaka i goveda. Biljni ekstrakti i čisti PA (senecionin, integerimin, retrorzin i *N*-oksidi, senecifilin, jakobin i senkirkin) iz biljnih vrsta roda *Senecio* ispoljavaju mutageni efekat. Heliotrin, senkirkin, retrorzin, senecifilin i ridelin, koji ispoljavaju mutageni efekat na *Salmonella typhimurium* TA 100, ispoljavaju i tumorogeni efekat na eksperimentalnim životinjama^{33,38}.

Ispitivanja tumorogenog efekta makrocikličnih diestara PA (retronecinskog, heliotridinskog i otonecinskog tipa), izolovanih iz tri familije biljaka, pokazala su da su oni veoma moćni tumorogeni efektori. U tabeli 3 prikazani su rezultati ispitivanja efekata PA iz biljaka roda *Senecio*.

Tabela 3. Karcinogeni efekti PA iz biljaka roda *Senecio*, ispitani na pacovima

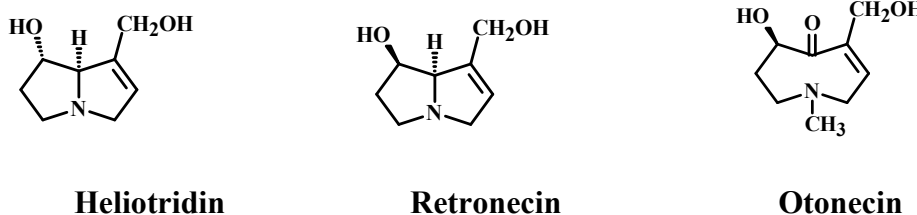
PA	Tip tumora	Referenca
<i>Otonecinski tip PA</i>		
Senkirkin	Hemangioendotelni sarkom, Adenom jetre	41
Hidroksisenkirkin	Tumor mozga	42
Petasitenin	Hemangioendotelni sarkom, Adenom jetre	43
<i>Retronecinski tip PA</i>		
Jakobin	Tumor jetre	44
Retrorsin	Karcinom jetre	44-46
Ridelin	Hepatpkarcinom	46
Senecifilin	Hemiangioendotelni sarkom, Adenom jetre	46
Senecionin	Tumor jetre	44, 47

2.5. Biotransformacija (metabolizam) pirolizidinskih alkaloida

Zbog velike zastupljenosti i toksičnosti pirolizidinskih alkaloida, mehanizmi preko kojih oni ispoljavaju toksični efekat (genotoksičnost i posebno karcinogenost) predmet su mnogih istraživanja. Da bi ispoljili toksične efekte PA se, kao i mnoge druge toksične supstance, prethodno metabolički aktiviraju (biotransformišu).

Nakon unošenja hranom, pirolizidinski alkaloidi se apsorbuju u tankom crevu. Manji udeo alkaloida se pomoću nespecifičnih esteraza u krvi hidrolizuje do necina i necinskih kiselina. Necini su netoksični i ekskretuju se kao konjugati preko bubrega i urina. Najveći udeo alkaloida se transportuje u jetru gde se biotransformiše.

Metabolizam i putevi metaboličke aktivacije PA su mnogo istraživani^{33,38,39,48-53}. Budući da retronecinski (I), heliotridinski (II) i otonecinski (III) tip PA (1,2-nezasićeni PA, Slika 8) ispoljavaju najveću toksičnost i tumorogenost kod eksperimentalnih životinja, njihov metabolizam je najviše ispitan.



Slika 8. Necinske baze PA koje ispoljavaju najveću toksičnost

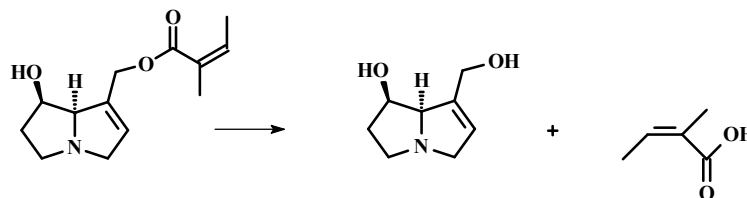
2.5.1. Metabolizam 1,2-nezasićenih pirolizidinskih alkaloida – reakcije I faze

biotransformacije

Metabolizam pirolizidinskih alkaloida retronecinskog i heliotridinskog tipa

Kako se retronecinski i heliotridinski tip PA razlikuju samo na C-7 položaju (*R* i *S* stereohemija) njihov metabolizam se može razmatrati zajedno. Za ova dva tipa PA postoje tri opšta puta biotransformacije:

1. Hidroliza estarskih funkcionalnih grupa vezanih na C-7 i C-9 položajima, pri čemu se dobijaju necinske baze i necinske kiseline. Ovi proizvodi su netoksični i lako se ekskretuju iz organizma.



Ako necinska kiselina koja gradi estarsku vezu sa primarnom alkoholnom grupom sadrži razgranat bočni niz, hidroliza nije moguća zbog steričnih smetnji.

2. *N*-oksidacija necinskih baza do *N*-oksida. Hidrofilni *N*-oksidi alkaloida se iz organizma ekskretuju urinom u toku 24 h.
3. Oksidacija u dva koraka. Prvo se odvija hidroksilovanje necinske baze na C-3 ili C-8 položaju, uz stvaranje odgovarajućih 3- ili 8-hidroksinecinskih derivata. Potom sledi spontana dehidracija do odgovarajućih dehidropirolizidinskih derivata (DHP, pirolni estri)^{38,54}.

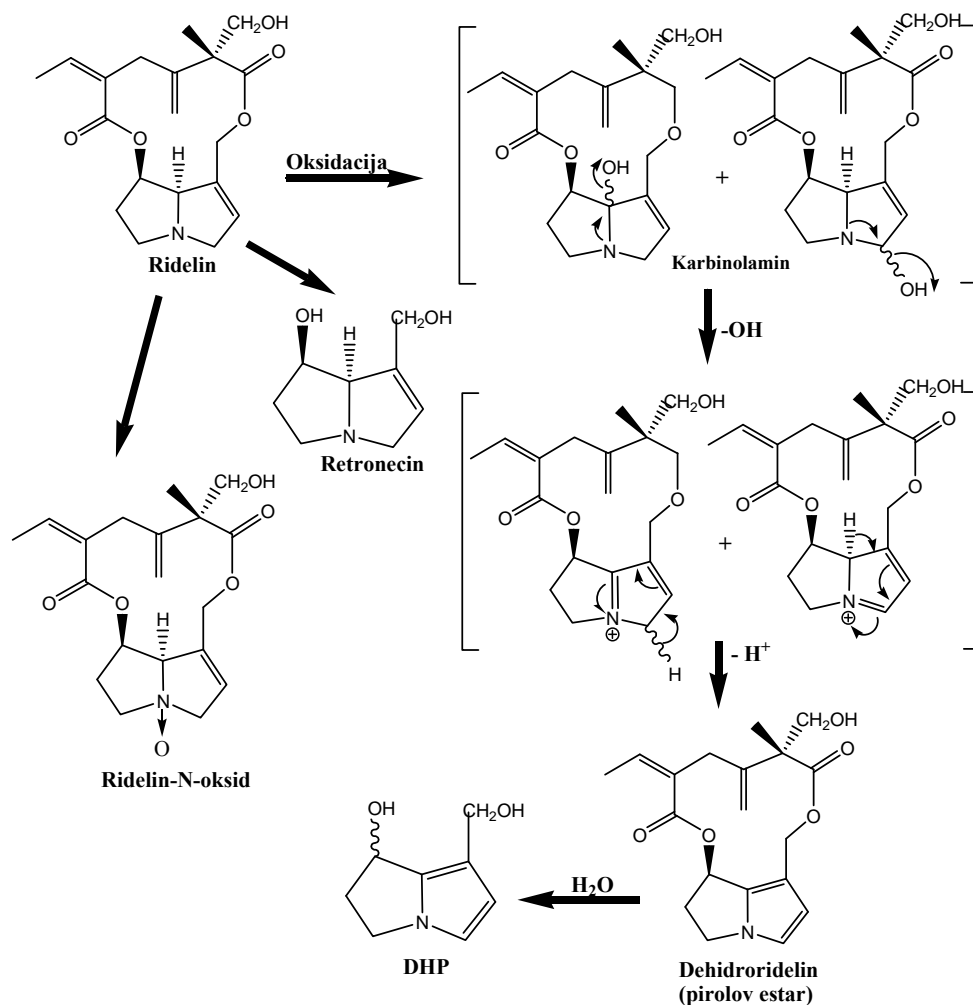
Navedeni metabolički putevi su ilustrovani na primeru metabolizma ridelina, koji se odvija u mikrozomima jetre pacova (Slika 9).

Metabolizam PA otonecinskog tipa

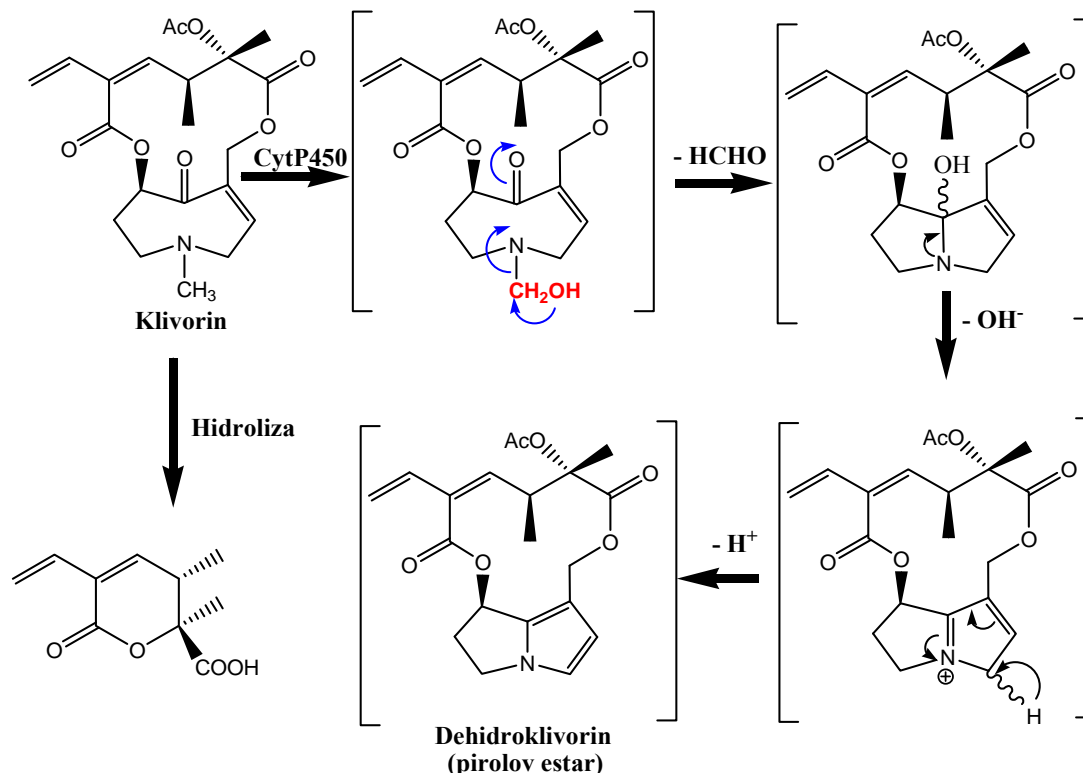
Zbog razlika u strukturi necinske baze otonecinskog tipa PA, u odnosu na baze retronecinskog i heliotridinskog tipa, u prvoj fazi reakcija njegove biotransformacije odvijaju se dva opšta metabolička puta^{51,52}:

1. Hidroliza estarskih funkcionalnih grupa, pri čemu se nastaju odgovarajuće necinske baze i necinske kiseline.
2. Stvaranje odgovarajućih pirolnih estara (dehidropirolizidinskih alkaloida, DHPA) kroz oksidativno *N*-demetilovanje necinske baze (eliminacija molekula

formaldehida) praćeno zatvaranjem prstena i dehidratacijom. Budući da na položaju C-7 pirolizidinski alkaloidi otonecinskog tipa imaju *R* apsolutnu konfiguraciju, stvoreni pirolovi estri imaju necinsku bazu koja je identična bazi PA retronecinskog tipa. Na Slici 10 prikazani su putevi I faze biotransformacije klivorina (PA otonecinskog tipa) kod zamoraca.



Slika 9. Opšti putevi metabolizma ridelina (PA retronecinskog tipa) u fazi I biotransformacije



Slika 10. Opšti putevi I faze biotransformacije klivorina, PA otonecinskog tipa

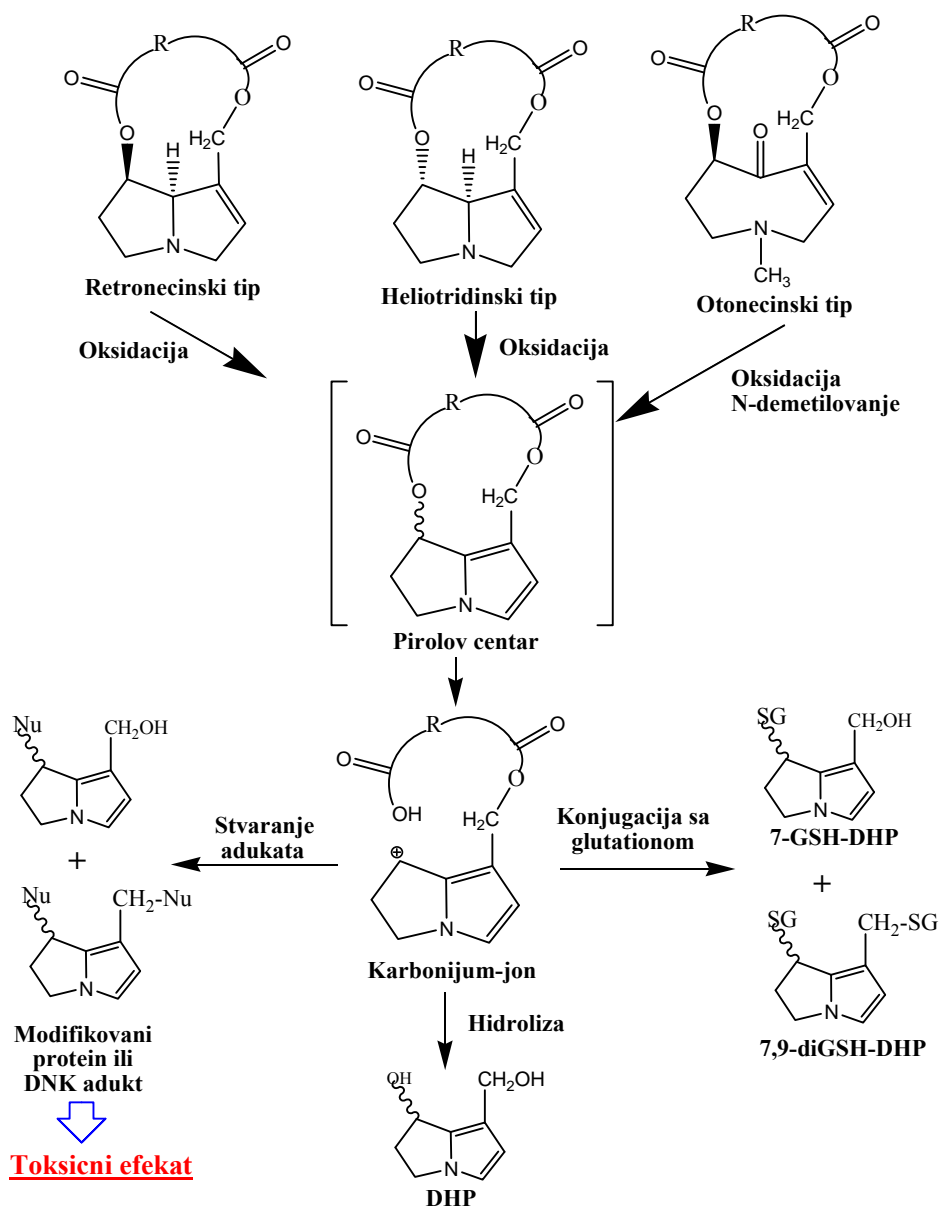
Reakcije C- i N-oksidacije necinske baze do reaktivnih pirolovihi estara i N-oksida PA (resp.) katalizuje hepaticni enzim citohrom P450 (Cyt P450, oksidaza mešovite funkcije)^{39,49,50,52,53,55}. Pored Cyt P450, oksidaciju PA retronecinskog i heliotridinskog tipa do odgovarajućih N-oksida katalizuje i flavin-monooksigenaza^{56,57}.

Reakciju hidrolize estarskih grupa PA, do odgovarajuće necinske baze i kiselih komponenata, katalizuju mikrozomalne esteraze jetre^{49,50,53,56}. Hidroliza može biti katalizovana i citosolnim karboksi-esterazama jetre^{33,50,55}.

Bioaktivacija pirolizidinskih alkaloida

Dehidropirolizidinski metaboliti alkaloida (DHPA, pirolovi estri), nastali u reakcijama I faze biotransformacije (oksidacija i oksidativna demetilacija), su reaktivniji od početnih (nativnih) molekula. Oni su moćni alkilujućii agensi. Razlog tome je

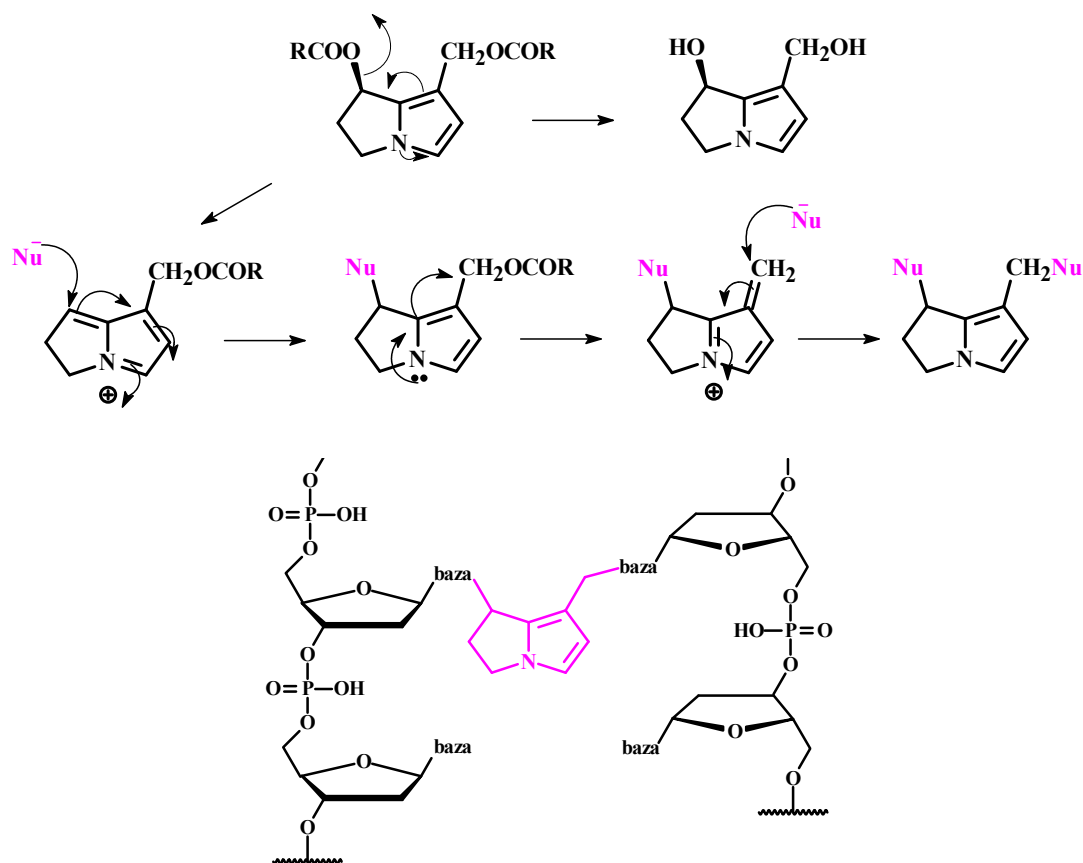
konverzija reaktivnih DHPA u karbonijum jone, sa pozitivnom šaržom na C-7 necinske baze (Slika 11).



Slika 11. Metabolički putevi dehidropirolizidinskih alkaloida (DHPA), stvorenih u fazi I biotransformacije različitih tipova PA. Nu: nukleofili na biološkim molekulima, kao što su –S-protein ili –N-DNK.

Karbonijum-joni mogu brzo da reaguju s nukleofilnim grupama proteina (-SH i -NH₂) i purinskih i pirimidinskih baza DNK. Monoalkilovanjem, odnosno vezivanjem pirolnog derivata za jedan lanac DNK stvara se adukt koji uzrokuje trajne promene u

molekulu DNK. Ova modifikacija DNK može, takođe, da dovede do kroslinkinga između DNK lanaca, kao i proteina i DNK^{33,36-38,58}. Kroslinking je omogućen preko dve funkcionalne grupe (na C-7 i C-9 položajima) pirolovih estara (dehidropirolizidinskih alkaloida) i DHP metabolita (Slika 12). Promene biomolekula imaju za posledicu permanentno oštećenje gena i hromozoma, promenu deobe ćelija, razvoj kancera i čak ćelijsku smrt.



Slika 12. Povezivanje lanaca DNK preko DHP metabolita alkaloida

Dakle, stvaranje pirolovih estara alkaloida (DHPA) predstavlja metaboličku aktivaciju PA koja je uzrok ispoljavanja njihovih toksičnih efekata (uključujući citotoksičnost, genotoksičnost i tumorogenost PA)^{33,39,55,58,59}. Yang i saradnici³⁹ su pokazali da ridelin indukuje stvaranje tumora u jetri upravo pokretanjem genotoksičnih mehanizama preko DHP adukata DNK. DHP-adukti DNK, stoga, mogu biti biomarkeri za PA tumorogenost.

U slučaju senecionina, pored tri gore opisana puta biotransformacije (i njihovih proizvoda), dodatno je nadjen hepatički metabolit trans-4-hidroksi-2-heksenal⁶⁰. Pokazano je da ovaj metabolit dovodi do nekroze jetre *in vivo*.⁶¹ Kao i drugi alkenali, vezuje se za deoksiguanozin, pri čemu nastaju adukti molekula DNK.⁶² Predloženo je da heksenal nastaje zbog lipidne peroksidacije indukovane senecioninom⁶³, pa je stoga metabolizam senecionina razmatran kao bioaktivacija. Indukcija lipidne peroksidacije pirolizidinskim alkaloidima može biti uključena i u ispoljavanje njihove tumorogene aktivnosti.

2.5.2. Metabolizam 1,2-nezasićenih pirolizidinskih alkaloida – reakcije II faze biotransformacije

Karbonijum-joni pirolovih estara, stvoreni u I fazi biotransformacije PA, mogu lako da reaguju sa vodom gradeći DHP (Slika 11). Mogu da reaguju i sa drugim endogenim konstituentima, kao što je na primer glutation (GSH), pri čemu se stvaraju glutationski konjugati 7-glutationil-6,7-dihidro-1-hidroksimetil-5H-pirolizin (7-GSH-DHP) ili 7,9-diglutationil-6,7-dihidro-1-hidroksimetil-5H-pirolizin (7,9-diGSH-DHP) (Slika 11). Reakcija konjugacije sa glutationom pripada reakcijama II faze biotransformacije i predstavlja opšti put detoksifikacije^{52,64,65}. Može da se odvija bez i u prisustvu citosolnih ili mikrozomalnih glutation-S-transferaza. Derivati glutationskih konjugata ekskretuju se urinom.

Reakcija hidrolize pirolizidinskih alkaloida (u prisustvu esteraza), karakteristična za sva tri tipa PA, kao i reakcija N-oksidacije kod PA retronecinskog i heliotridinskog tipa se, takođe, smatraju putevima detoksifikacije.

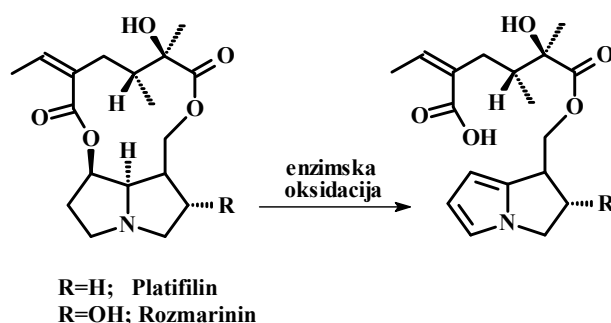
2.5.3. Ispoljavanje toksičnog efekta 1,2-nezasićenih pirolizidinskih alkaloida kod različitih vrsta

Biljke koje sadrže 1,2-nezasićene alkaloide su toksične za ljude i životinje. Trovanja mnogih životinja, uključujući i domaće (konje, krave, ovce, piliće...), ovim

prirodnim proizvodima dešavaju se širom sveta, što je već istaknuto u poglavlju 2.4.^{12, 16-21} Kao što je napred rečeno, osetljivost stoke na dejstvo PA je različito. Konji i goveda su najosetljiviji. Ovce su, sa druge strane, vrlo rezistentne na hepatotoksično dejstvo PA. One mogu da tolerišu unos *S. jacobaea* u količini i do sedam puta većoj od njihove telesne težine. Nađene razlike mogu da budu posledica razlika u apsorpciji PA, u stvaranju reaktivnih pirola, u konjugaciji i ekskreciji PA i pirola. Brzina stvaranja reaktivnih pirola je veća kod vrsta koje su manje rezistentne na toksičnost PA. Administracija induktora Cyt P450 kod rezistentnih vrsta dovodi do veće sinteze ovog enzima i povećanja osetljivosti za ispoljavanje toksičnih efekata PA. Na osnovu izloženog može se zaključiti da će toksičnost PA biti određena odnosom brzine reakcije stvaranja pirolskih estara i brzina reakcija detoksifikacije, odnosno hidrolize, konjugacije sa glutationom i N-oksidacije.

2.5.4. Metabolizam zasićenih pirolizidinskih alkaloida

Zasićeni pirolizidini i njihovi necini nisu toksični. Tako, na primer, zasićeni makrociklični diestri platifilin i rozmarinin podležu enzimskoj hidrolizi estarske veze na C-7, uz simultano stvaranje pirola u prstenu A. Za razliku od pirolskih metabolita nezasićenih pirolizidinskih alkaloida, koji su dehidro(B)pirolizidini i gde postoji veoma reaktivan konjugovan sistem, ovi metaboliti, dehidro(A)pirolizidini su stabilniji i ne stupaju u reakciju sa nukleofilima (Slika 13).



Slika 13. Metabolički put zasićenih pirolizidinskih alkaloida

2.6. Prisustvo i rasprostranjenost pirolizidinskih alkaloida u biljnim vrstama

Pirolizidinski alkaloidi su veoma rasprostranjeni u biljnom svetu. Navedeno je da oko 3 % biljaka cvetnica sadrže toksične PA.⁶⁶ Više stotina PA i njihovih derivata N-oksida identifikovano je (i njihova stuktura dobro okarakterisana) u preko 6000 biljaka, koje pripadaju nepovezanim botaničkim familijama^{14,67-72}: Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Apiaceae, Convolvulaceae, Celestraceae, Proteaceae, Santalaceae, Sapotaceae, Ranunculaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Scrophulariaceae i Poaceae. Najviše su zastupljeni u predstavnicima familija Asteraceae (*Tussilago farfara*, *Petasites* sp., *Senecio* sp., *Adenostyles alliariae*, *Eupatorium* sp.), Boraginaceae (*Symphytum* sp., *Borago officinalis*, *Anchusa officinalis*, *Cynoglossum officinale*, *Echium* sp., *Heliotropium* sp., *Lithospermum* sp.) i Fabaceae (*Crotalaria* sp.),⁷² a nešto manje u Apocynaceae i sporadično u ostalim familijama. U navedenim familijama, njihovo postojanje je uglavnom ograničeno na nekoliko tribusa (Tr), i rodova, kao što je prikazano u Tabeli 4.

U familiji Asteraceae (predstavnicima tribusa Senecioneae) nađeni su makrociklični 12-točlani alkaloidi, od kojih se najčešće pojavljuju senecionin i otonecinski alkaloid senkirkin. Kao predstavnici tribusa Eupatorieae tipični su monoestarski derivati PA. Boraginaceae prvenstveno sintetisu PA-monoestere, kao što je 7- ili 9-angeloilretronecin, i diestre kao što je echimidin, a za rod *Crotalaria* glavni predstavnik PA je 11-točlani makrociklični diestar monokrotalin.

Tabela 4. Nalaženje PA: pregled familija, podfamilija, tribusa i rodova

Familija / podfamilija	Tribus (Tr) / Rod
Apocynaceae / Echitoideae (syn. Apocynoideae)	(Tr) Ecdysanthereae (syn. Apocyneae) (Rod) <i>Anodendron</i> . (Tr) Parsonsieae (Rod) <i>Parsonsia, Urechites, Fernaldia</i> . (Tr) Nerieae (Rod) <i>Alafia</i> .
Asteraceae (Compositae)/ Asteroideae	(Tr) Arniceae (Rod) <i>Arnica</i> . (Tr) Eupatorieae (Rod) <i>Adenostemma, Ageratum, Chromolaena, Conoclinum, Critonia</i> (syn. <i>Eupatorium</i>), <i>Eupatorium, Liatris, Trichogonia</i> . (Tr) Senecioneae (Rod) <i>Adenostyles, Brachyglottis, Cacalia, Chersodoma, Cineraria</i> ("syn. <i>Senecio</i>), <i>Crassocephalum, Emilia, Doronicum, Erechites,</i> <i>Farfugium, Gynura,</i> (Tr) Homogyne, <i>Jacmaia, Kleinia, Ligularia, Notonia</i> (syn. <i>Kleinia</i>), <i>Odontocline</i> (syn. <i>Senecio</i>), <i>Petasites,</i> <i>Senecio, Syneilesis, Tussilago, Werneria</i> .
Boraginaceae/ Heliotropioideae/ Boraginoideae	(Tr) Heliotropieae (Rod) <i>Heliotropium, Tournefortia</i> (syn. <i>Heliotropium</i>), <i>Messerschmiedia</i> (syn. <i>Ceballosia</i>). (Tr) Cynoglosseae (Rod) <i>Caccinia, Cynoglossum, Lindelofia</i> (syn. <i>Cynoglossum</i>), <i>Macrotomia, Paracynoglossum</i> (syn. <i>Cynoglossum</i>), <i>Rindera, Solenanthus</i> (syn. <i>Cynoglossum</i>), <i>Paracaryum,</i> <i>Trachelanthus</i> (syn. <i>Lindelofia</i>), <i>Trichodesma</i> . (Tr) Eritrichieae (Rod) <i>Amsinckia, Asperugo, Cryptantha, Hackelia, Lappula,</i> <i>Mertensia,</i>

Tabela 4.	Nastavak
	<p>(Rod) <i>Moltkiopsis, Myosotis, Neatostema, Ulugbekia.</i></p> <p>(Tr) Boragineae (syn. Anchuseae),</p> <p>(Rod) <i>Alkanna, Anchusa, Borago, Gastrocotyle</i> (syn. <i>Anchusa</i>), <i>Nonea</i> (syn. <i>Nonnea</i>), <i>Rindera, Symphytum.</i></p> <p>(Tr) Lithospermeae</p> <p>(Rod) <i>Arnebia, Buglossoides</i> (syn. <i>Lithospermum spec.</i>), <i>Cerithe, Lithospermum</i> (syn. <i>Arnebia</i>).</p> <p>(Tr) Echieae.</p> <p>(Rod) <i>Echium</i></p>
Ehretiaceae	(Rod) <i>Ehretia.</i>
Celastraceae	(Rod) <i>Bhesa</i>
Convolvulaceae	(Rod) <i>Ipomoea</i>
Fabaceae (Leguminosae) / Papilionoideae (syn. Faboideae)	<p>(Tr) Sophoreae</p> <p>(Rod) <i>Alexa, Castanospermum.</i></p> <p>(Tr) Genisteae</p> <p>(Rod) <i>Laburnum, Adenocarpus.</i></p> <p>(Tr) Crotalarieae</p> <p>(Rod) <i>Crotalaria, Lotononis, Buchenroedera</i> (syn. <i>Lotononis</i>).</p>
Orchidaceae / Orchioideae	<p>(Tr) Epidendreae</p> <p>(Rod) <i>Chysis, Liparis, Hammarbya</i> (syn. <i>Malaxis</i>), <i>Malaxis.</i></p> <p>(Tr) Vandaeae</p> <p>(Rod) <i>Doritis</i> (syn. <i>Phalaenopsis</i>), <i>Catasetum.</i></p> <p><i>Kingiella, Phalaenopsis, Trichoglottis, Vanda, Vandopsis.</i></p>
Poaceae (Gramineae) / Pooideae / Panicoideae	<p>(Tr) Poeae (syn. Festucaceae)</p> <p>(Rod) <i>Festuca, Lolium, Schismus.</i></p> <p>(Tr) Andropogoneae</p> <p>(Rod) <i>Thelepogon.</i></p>
Ranunculaceae	(Rod) <i>Caltha</i>
Rhizophoraceae	(Rod) <i>Cassipourea</i>
Santalaceae	(Rod) <i>Thesium</i>
Sapotaceae	(Rod) <i>Mimusops, Planchonella</i>

2.7. Biljna vrsta *Rindera umbellata* Bunge



Slika 14. *Rindera umbellata* Bunge

Biljka *Rindera umbellata* pripada familiji Boraginaceae koja je zastupljena u Srbiji sa 17 rodova i 56 vrsta. Rod *Rindera* je dobio ime u čast lekara i botaničara A. Rindera. Može da bude dvogodišnja i višegodišnja biljka⁷³ (slika 14). Koren je taman, nezadebljao, osovinski; biljka monokarpna, stablo prosto, rebrasto, paučinasto dlakavo, 20 do 60 cm visoko, uspravno, u gornjem delu razgranato, sa gustim listovima. Bazalni listovi su u vreme fruktifikacije suvi, lancetasti ili duguljasti, 10 do 15 cm dugi, do 2 cm široki, pri osnovi suženi i postepeno prelaze u lisne drške, na vrhu dugo ušiljeni, rastresito paučinasto dlakavi. Listovi na stablu su lancetasti, gornji linearni sedeći, šiljati, ka vrhu stabla sve kraći. Uvojci mnogobrojni, na vrhu stabla skupljeni u složenu štitastu cvast (umbellata = štitasta, *lat.*), bez braktea. Cvetovi su savijeni naniže, na jako dlakavim drškama; čašica bela od vunastih dlaka, oko 10 mm duga, sa dugim pravostojećim okrajcima. Krunica žućkasta, 15 mm duga, sa produženim, tupim,

skoro pravostojećim režnjevima, čija je dužina oko 5 mm. Stubić daleko isturen iz krunice; ljuste tek malo niže od ždrele, crvenkaste, izdužene, 2-3 mm visoke; antere izduženo linearne, pri osnovi okrugle, 6 mm duge, vrhovima malo nadvisuju režnjeve krunice, filamenti oko 5 mm dugi; žig vrlo mali. Orašice glatke, 14-15 mm u prečniku, okriljene. Vrsta *Rindera umbellata* je opšte rasprostranjena u podunavskim zemljama, raste na peskovitim mestima, u Srbiji se nalazi u Deliblatskoj i Ramskoj peščari.

2.8. Izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala

Više od 50 godina razvijaju se analitičke metode za izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala. Razlozi za razvijanje analitičkih metoda najčešće su bili, određivanje ukupne količine alkaloida u nekom biljnom materijalu iz preventivnih razloga, radi očuvanje zdravlja ljudi i životinja, ili izolovane alkaloida kako bi se ispitala njihova aktivnost i odredile njihove strukture za potrebe farmacije, taksonomije, toksikologije, entomologije i ekologije. U oba slučaja postoje zajedničke faze u postupku koje se odnose na pripremu biljnog materijala, ekstrakciju alkaloida iz biljnog materijala i prečišćavanje sirovog ekstrakta kako bi se dobila što čistija smeša alkaloida. Nakon što se dođe do prečišćene smeše alkaloida ona može biti analizirana, kako bi se odredio ukupni ili pojedinačni sadržaj alkaloida, ili može biti dalje razdvajana kako bi se izolovali čisti alkaloidi radi određivanja njihovih struktura i aktivnosti.

2.8.1. Priprema uzorka biljnog materijala

Analizirani biljni materijal može biti suv ili svež sa većim procentom vode. Ukoliko se radi o kvalitativnoj analizi biljnog materijala, gde je cilj analize samo detekcija alkaloida u biljci, može se raditi sa svežim biljnim materijalom. U tom slučaju biljka se može potopiti u metanol ili rastvor neke kiseline⁷⁴. Za kvantitativnu analizu

alkaloida iz biljke, neophodno je da biljka bude osušena. Biljni materijal može biti osušen na više načina: stajanjem na sobnoj temperaturi^{75,76}, pod vakumom⁷⁷, grejanjem u sušnici⁷⁸ ili sušenjem zamrzavanjem⁷⁹. Sušenje grejanjem je najbrži način, ali je pokazano da u slučaju sušenja polena na 56 °C dolazi do gubitka 50 % *N*-oksida cikličnih diestara⁸⁰, tako da je za kvantitativnu analizu pouzdaniji sporiji način sušenja na sobnoj temperaturi. Bez obzira da li se radi o detekciji ili određivanju pirolizidinskih alkaloida, biljni materijal (suv ili svež) mora biti pre analize usitnjen i homogenizovan. Najbolji rezultati za usitnjavanje i homogenizaciju biljnog materijala se postižu korišćenjem blendera.

2.8.2. Ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala

Pirolizidinski alkaloidi su polarna bazna jedinjenja i kao takva najčešće se ekstrahuju potapanjem biljnog materijala u metanol ili rastvor neke kiseline (maceracija). Pored maceracije⁸¹, ekstrakcija metanolom može se vršiti i uz zagrevanje sa i bez zakišeljavanja⁸², potpomognuta ultrazvukom⁸³ ili blendiranjem biljke sa metanolom⁷⁶. Soxhlet-ova ekstrakcija metanolom je često primenjivana za izolovanje alkaloida iz biljnog materijala^{76,84,85}. Međutim, utvrđeno je da prilikom Soxhlet-ovih ekstrakcija dolazi do velikog gubitka u prinosu pirolizidinskih alkaloida⁸⁸. Metanol može biti zakišljen sa vinskom⁸⁶ ili limunskom⁸⁷ kiselinom, ili pomešan sa hloroformom⁷⁷. Najbolji prinosi, za izolovanje alkaloida iz biljnog materijala sa razblaženim kiselinama, postignuti su sa sumpornom^{83,89,90} i hlorovodoničnom⁹¹ kiselinom. Pri ekstrakciji hlorovodoničnom kiselinom dolazi do reakcije sa alkaloidima koji u svojoj strukturi imaju epoksidnu grupu⁷⁷. Do istog problema dolazi pri ekstrakcijama hloroformom i smešama hloroforma i drugih rastvarača, jer hloroform često sadrži tragove hlorovodonične kiseline. U literaturi su zabeležene i ekstrakcije alkaloida etanolom⁷⁵ i vodom⁹², kao i pokušaji ekstrakcija nepolarnim rastvaračima. Najveći nedostatak ekstrakcija (iz biljnog materijala, meda, mleka i jaja) nepolarnim rastvaračima je što se *N*-oksidi alkaloida jako slabo ekstrahuju⁹³⁻⁹⁵. Pirolizidinske alkaloidne iz biljnog materijala moguće je ekstrahovati i tečnim ugljen-dioksidom⁹⁶⁻¹⁰². Iako se ovim postupkom dobija smeša alkaloida koja ne zahteva dalje prečišćavanje, on nije zaživeo u rutinskoj primeni jer je skup i zahteva posebnu opremu.

2.8.3. Prečišćavanje početnog ekstrakta pirolizidinskih alkaloida

Početni ekstrakti biljaka pored pirolizidinskih alkaloida sadrže i razna druga jedinjenja, koja mogu da ometaju dalji tok razdvajanja i analizu. Primenuju se dva načina za prečišćavanje početnih ekstrakata: tečno-tečna ekstrakcija i tečno-čvrsta ekstrakcija. Prečišćavanje tečno-tečnim ekstrakcijama se smatra klasičnim, odnosno tradicionalnim. Nedostaci ovog načina prečišćavanja su trošenje velike količine rastvarača, dugo trajanje i manja ponovljivost u odnosu na tečno-čvrste ekstrakcije. Nedostatak prečišćavanja početnog ekstrakta tečno-čvrstim ekstrakcijama, u odnosu na tečno-tečne ekstrakcije, je manji prinos izolovanih alkaloida.

Tečno-tečne ekstrakcije

Tok prečišćavanja tečno-tečnim ekstrakcijama, odnosno broj koraka zavisi od toga da li su PA iz biljke ekstrahovani organskim rastvaračima i rastvorima kiselina. Ukoliko su alkaloidi ekstrahovani organskim rastvaračima, prečišćavanje ima sledeće faze^{68,69,103}:

1. Odvajanje ekstrakta od biljnog ostatka ceđenjem,
2. Uparavanje organskog rastvarača do suvog ostatka pod sniženim pritiskom,
3. Rastvaranje suvog ostatka u razblaženoj kiselini, najčešće sumpornoj ili hlorovodoničnoj, kako bi alkaloidi bili protovani (u obliku soli), odnosno bolje rastvorni u vodi,
4. Odmašćivanje vodenog rastvora alkaloida, ekstrakcijom metilen-hloridom, kako bi se iz rastvora uklonila jedinjenja nepolarnija od alkaloida,
5. Povišene pH vrednosti vodenog rastvora alkaloida do bazne sredine, kako bi se alkaloidi deprotonovali, odnosno smanjila njihova rastvorljivost u vodi,
6. Ekstrakcija alkaloida, iz alkalonog vodenog rastvora, metilen-hloridom, do negativne reakcije na alkaloide,
7. Uparavanje spojenih metilen-hloridnih ekstrakata alkaloida, pod sniženim pritiskom, do suvog ostatka (čiste smeše alkaloida).

Ukoliko su alkaloidi iz biljnog materijala ekstrahovani rastvorima kiselina, postupak prečišćavanja se skraćuje za dve faze. Posle ceđenja se ekstrakt ne uparava, odnosno suvi ostatak ne rastvara u razblaženoj kiselini.

Kada je cilj analize, pored izolovanja pirolizidinskih alkaloida i izolovanje *N*-oksida pirolizidinskih alkaloida, nakon ekstrakcija alkalnog vodenog rastvora metilen-hloridom, alkalni vodeni rastvor se ekstrahuje i *n*-butanolom do negativne reakcije na *N*-okside¹⁰³. Ukoliko je cilj određivanje sadržaja *N*-oksida, a ne njihovo izolovanje, analiza se može uraditi tako da se kiseli vodeni rastvor alkaloida podeli na dve probe. Jedna proba se podvrgne klasičnim postupku pripreme uzorka za određivanje alkaloida, a u drugu probu se doda cink u prahu i izvrši redukcija *N*-oksida do alkaloida¹⁰⁴. Nakon toga se iz razlike u sadržaju alkaloida u prvoj i drugoj probi može odrediti sadržaj *N*-oksida.

Tečno-čvrste ekstrakcije

Za prečišćavanje početnih biljnih ekstrakata tečno-čvrstim ekstrakcijama, u literaturi su zabeležene primene tri tipa komercijalno pakovanih kolona: kolone sa inertnom dijatomejskom zemljom^{15,90,106}, kolone sa nepolarnim fazama C₈ i C₁₈^{76,86} i kolone sa jakim polimernim katjonskim izmenjivačima^{85,86,107,108}. Sa kolona napunjenih diatomejskom zemljom, rastvorom amonijaka su uspešno eluirani ciklični estri pirolizidinskih alkaloida, a necilični estri veoma loše¹⁰⁹. Kolone pakovane nepolarnom fazom C₈ i C₁₈ se nisu dobro pokazale. Efikasnost (rikaveri vrednosti) alkaloida eluiranih sa C₈ kolona su bile male, a sa C₁₈ kolona su zadovoljavajuće, ali je dolazilo do eluiranja neželjenih jedinjenja. Najbolji rezultati prečišćavanja početnih ekstrakata tečno-čvrstom ekstrakcijom postignuti su sa kolonama pakovanim polimernim katjonskim izmenjivačima, posebno benzil- sulfonatom¹⁰⁸.

Prečišćavanje početnog ekstrakta tečno-čvrstim ekstrakcijama se obično primenjuje kod rutinskih analiza PA pomoću HPLC-a. Ukoliko se analize izvode pomoću GC ili neke druge metode ovako pripremljen uzorak obično nije pogodan, jer se pri eluiranju alkaloida sa kolone koristi amonijak ili amonijak u metanolu. Za GC i većinu drugih metoda pogodnije je pripremati uzorak klasičnim tečno-tečnim ekstrakcijama. Takođe, prilikom izolovanja alkaloida iz biljnog materijala u cilju njihovog daljeg razdvajanja radi određivanja strukture i aktivnosti, bolje je primenjivati tečno-tečne ekstrakcije.

2.8.4. Izolovanje čistih pirolizidinskih alkaloida iz prečišćene smeše

Čisti alkaloidi se mogu izolovati iz smeše alkaloida na više načina: razdvajanjem na koloni, tankoslojnom preparativnom hromatografijom, gasnom preparativnom hromatografijom i HPLC-om sa preparativnom kolonom za razdvajanje. Za razdvajanje pirolizidinskih alkaloida na koloni najčešće se primenjuju kolone pakovane silika-gelom¹¹⁰⁻¹¹⁴ i aluminijum-oksikom^{115,116}. Za razdvajanje diastereoizomera pirolizidinskih alkaloida, kolona se pakuje staklenim prahom impregniranim rastvorom boraksa ili alkalisanim silika-gelom.^{117,118}

Preparativna tankoslojana hromatografija se često primenjuje za razdvajanje alkaloida, a kao adsorbensi koriste se silika-gel i aluminijum-oksikid. Najuspešnije razdvajanje se postiže kada se kao eluent upotrebi sistem rastvarača metilen-hlorid/metanol/amonijak u odnosu 85/14/1^{119,120}. Razdvajanje alkaloida na gravitacionoj koloni i pomoću tankoslojne preparativne hromatografije ograničava broj alkaloida u smeši¹²¹. Ukoliko je on veći od šest, vrlo je teško izolovati čiste alkaloide. U takvim slučajevima mnogo veća efikasnost razdvajanja se postiže pomoću preparativne GC i HPLC-a. Ograničenje u primeni gasne hromatografije je temperatura, tako da se samo mali broj pirolizidinskih *N*-oksida može razdvojiti i detektovati. Najefikasnije rešenje je razdvajanje smeše alkaloida preparativnim HPLC-om. Ovom tehnikom je moguće razdvojiti veliki broj alkaloida u smeši, bez obzira da li se radi o PA ili njihovim *N*-oksidima.

2.8.5. Hromatografske metode u identifikaciji i određivanju izolovanih pirolizidinskih alkaloida

Gasna hromatografija (GC)

Gasna hromatografija ima veliku primenu u identifikaciji i određivanju izolovanih pirolizidinskih alkaloida. Identifikacija je (do pojave masenih detektora sa kojima je identifikacija značajno olakšana) vršena na osnovu retencionog vremena alkaloida u zavisnosti od tipa kolone⁷⁹. Kolone koje se koriste za razdvajanje pirolizidinskih alkaloida mogu biti manje ili više polarne: DB1, HP5 i DB17. Kao detektori pri određivanju pirolizidinskih alkaloida najčešće su korišćeni FID, NPD i

MS. Mana gasne hromatografije je nemogućnost određivanja *N*-oksida pirolizidinskih alkaloida, koji su nestabilni na temperaturama potrebnim za njihovo isparavanje. U cilju postizanja boljeg razdvajanja alkaloida gasnom hromatografijom i izgleda pika, korišćene su različite metode za derivatizaciju pirolizidinskih alkaloida. Sililovanjem¹²² alkaloida dobijaju se trimetilsilil-etri. Sililovanje nije uspešno na vicinalnim diolnim grupama alkaloida. Iz tog razloga derivatizacija vicinalnih diolnih grupa se vrši derivatima borne kiseline^{123,124}, a alkil-borati se nakon toga sililuju.

Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Za brzu identifikaciju pirolizidinskih alkaloida najveću primenu ima GC-MS. Molekulska masa alkaloida, najčešće se može utvrditi samo ukoliko se koristi hemijska jonizacija. Hemijska jonizacija PA se najčešće izvodila metanom^{125,126}, izobutanom¹²⁷ i amonijakom^{126,128,130}. Pirolizidinski alkaloidi izolovani iz iste biljke često imaju jednake molekulske mase, pa se njihove strukturne razlike mogu utvrditi na osnovu različitih fragmentacija dobijenih elektronskom jonizacijom. Identifikacija pirolizidinskih alkaloida je olakšana posle objavljivanja radova koji sadrže podatke o retencijomim vremenima alkaloida dobijenim pri korišćenju određenih kolona i hromatografskih uslova i njihovih fragmentacija pri elektronskoj jonizaciji^{79,129,131}. Pored toga, u komercijalnim bibliotekama masenih spektara, vremenom se povećava broj masenih spektara pirolizidinskih alkaloida. Primenom novijih metoda, kao što su GC-MS-MS, GC-GC-MS i GC-TOFMS, značajno je poboljšano određivanje pirolizidinskih alkaloida.¹³²

Tečna hromatografija visokog razlaganja (HPLC)

Tečna hromatografija visokog razlaganja (HPLC) je nedestruktivna metoda koja omogućava razdvajanja pirolizidinskih alkaloida i *N*-oksida u istoj analizi, pošto nema potrebe da se *N*-oksidi prethodno redukuju. Razdvajanja su vršena sa različitim kombinacijama stacionarnih i mobilnih faza. Kada se koristi reversna fazna kolona, pirolizidinski alkaloidi se eluiraju pre *N*-oksida sa kiselom mobilnom fazom⁷⁷. Sa druge

strane, u baznoj mobilnoj fazi N-oksidi su polarniji od odgovarajućih neutralnih alkaloida i eluiraju se ranije¹³³. Na C₁₈ koloni postignuto je znatno bolje razdvajanje nego na C₈, ali dobri rezultati se dobijaju samo u baznim uslovima (pH 10-11) i sa dužim trajanjem razdvajanja⁸⁷. Sa smanjivanjem pH vrednosti i vremena trajanja analize, rezultati razdvajanja su lošiji. Detekcija alkaloida do pojave MS detektora najčešće se vršila pomoću UV detektora. Detekcija nezasićenih pirolizidinskih alkaloida na niskoj i nespecifičnoj talasnoj dužini (220 nm) je bila otežana, zbog čega je izbor eluenata bio ograničen.

Tečna hromatografija visokog razlaganja-masena spektometrija (HPLC-MS)

Primena masenih detektora u tačnoj hromatografiji visokog razlaganja prevazišla je mnoge ranije probleme u analitici pirolizidinskih alkaloida: redukciju N-oksida, temperature na kojima se jedinjenja raspadaju i probleme sa UV detektorom vezane za osetljivost i neselektivnost talasnih dužina. Azot u prstenu alkaloida se može lako protonovati i zato se većina određivanja PA radi u pozitivnom modu jonizacije. Jonizacija alkaloida i N-oksida se najčešće vrši elektron-sprej jonizacijom i hemijskom jonizacijom na atmosferskom pritisku. Elektron-sprej jonizacija obično zahteva kiselu mobilnu fazu, sa kojom je razdvajanje alkaloida lošije u odnosu na baznu mobilnu fazu. Hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku je znatno osetljivija kada se koristi bazna mobilna faza (pH 9-10), ali je jonizacija polarnih N-oksida znatno manja u odnosu na elektron-sprej jonizaciju^{109, 134}. Glavni problem kod identifikacije alkaloida HPLC-MS metodama je što molekulski jon može da odgovara većem broju različitih pirolizidinskih alkaloida. Taj problem je delimično prevaziđen upotrebom tandemne masene spektrometrije i MSⁿ spektrometrije. Glavni problem kod određivanja alkaloida je mali broj dostupnih komercijalnih standarda u odnosu na broj poznatih alkaloida, tako da se još uvek ne može reći koja je metoda, HPLC-MS ili GC-MS, bolja za određivanje pirolizidinskih alkaloida, jer i jedna i druga imaju prednosti i ograničenja.

2.8.6. Nuklearna magnetna rezonanca (NMR)

Struktura pirolizidinskih alkaloida se uglavnom određuje primenom NMR spektroskopije. Do sada je objavljeno više revijalnih radova^{100-102,135} sa tabelarno prikazanim ¹H NMR i ¹³C NMR podacima, što značajno olakšava utvrđivanje struktura izolovanih jedinjenja. Primena 2D NMR metoda olakšava utvrđivanje stereochemije alkaloida. Najviše podataka o strukturi nekog alkaloida dobija se iz ¹H NMR spektra, naročito vrednosti hemijskog pomeranja protona necinske baze (C-2, C-6, C-7, C-8 ili C-9). Necinska baza je obično mono-oksigenovana na C-9 ili di-oksigenovana na C-7 i C-9, a ponekad su oksigenovani i C-2 ili C-6. Hidroksilna grupa na C-7 identifikuje se na osnovu signala geminalnog protona na $\delta \sim 4,5$, a hidroksilovani C-9 se prepoznaje na osnovu signala na $\delta \sim 3,5$, koji potiče od H-9. Ukoliko su oba C atoma esterifikovana signali geminalnih protona se pomeraju ka nižem polju za približno 1ppm. Ako nema hidroksilne grupe na C-7 protoni su obično neekvivalentni i njihova pomeranja su u oblasti δ 1,5-2,2. O mono- ili diestrima acikličnih alkaloida ili o makrocikličnim diestrima zaključuje se takođe na osnovu položaja signala protona na C-7 i C-9. Protoni na C-9 su često neekvivalentni, posebno u makrocikličnim diestrima, a $\Delta\delta_{H-9}$ u nekim slučajevima može da ukaže na veličinu makrocikličnog prstena. Kod jedanestočlanih 7,9-diestarskih prstenova ova razlika je 0,15 -1,24 ppm, ali kod većine ispod 1,0 ppm, dok kod dvanaestočlanih ona iznosi 0,08 - 1,54 ppm, a kod malo više od polovine razmatranih jedinjenja ova vrednost je ispod 1,0 ppm. Dakle, $\Delta\delta_{H-9}$ ima dijagnostičku vrednost samo za 12-očlane prstenove kada se kreće između 1,25 i 1,55 ppm. Za trinaestočlane 7,9-diestre ne uočava se nikakav trend, dok je kod 6,9-diestara $\Delta\delta_{H-9}$ vrednost u opsegu 1,58 - 1,65 ppm, i značajno je viša od najveće vrednosti za 12-očlani prsten alkaloida. Svi 14-očlani tipovi prstena imaju $\Delta\delta_{H-9}$ u opsegu od 0,75 do 0,95 ppm. H-8 signal je pomeren ka višim vrednostima hemijskog pomeranja za *N*-okside, a izostaje kod pirolizidinskih alkaloida otonecinskog tipa. Na zasićenje baze obično ukazuje položaj H-2 signala: kod zasićenih baza je na $\delta \sim 2,0-2,5$ ppm, kod nezasićenih na $\sim 5,8$ ppm i kod 2-hidroksi baza na $\sim 4,0$ ppm. Ako je C-6 hidroksilovan hemijsko pomeranje H-6 je $\sim 4,0$, a ako nije, njegov signal je obično na $\delta \sim 2,0$. Hemijsko pomeranje H-6 može takođe biti preliminarni pokazatelj stereochemije necinske baze; kod alkaloida sa retronecinskim tipom baze multiplet protona H-6 se obično javlja na δ vrednosti višoj od 2,3 ppm, a kod heliotridinskog tipa na nižoj. Kod necinskih kiselina

su za prepoznavanje njihove strukture najkorisnija hemijska pomeranja karakteristična za vinilne-protone, jer protoni *E* i *Z* dvostrukih veza imaju različita hemijska pomeranja. Vrednosti δ za uobičajeniju *Z* konfiguraciju su oko 6 ppm, kao što je to slučaj kod angelične kiseline ($\delta \sim 6,0$), saracinske kiseline ($\sim \delta 6,2$) i kod mnogih makrocikličnih alkaloida (npr. retrorzin δ 5,71; senecionin δ 5,71 i senecifilin δ 5,83). Signali vinilnih protona kod *E* konfiguracije imaju hemijsko pomeranje više za 0,5 ppm ili više od onih kod *Z* konfiguracije. Tako δ_H kod tiglične kiseline iznosi 6,6 ppm, za izosaracinsku 6,8 ppm, a za makrocikle kao što su integerimin i spartioidin 6,52, odnosno 6,70 ppm. Uopšteno, oblik signala vinilnog protona necinske kiseline (kvartet) omogućava njegovo razlikovanje od signala nezasićenog protona H-2 (prošireni singlet).

2.8.7. Ostale metode za određivanje pirolizidinskih alkaloida

Spektrofotometrija se primenjuje za određivanje ukupnog sadržaja alkaloida. Najčešće primenjivani reagensi su Erlich-ov¹³⁶ i metil-oranž za nezasićene pirolizidinske alkaloide^{137,138}.

Kapilarna elektroforeza se može primenjivati za određivanje ograničenog broja alkaloida^{104,139}.

Protočna injekciona analiza se primenjuje za određivanje pirolizidinskih alkaloida i N-oksida. Zasniva se na ispoljavanju hemoluminiscencije alkaloida nakon reakcije sa tris (2,2-bipiridil)rutenijumom(II) ili kalijum-permaganatom¹⁴⁰.

Diferencijalna pulsna polarografija se pokazala kao dobra metoda za određivanje alkaloida u koncentracionom opsegu od 1 do 30 ppm, ali su u literaturi zabeležena samo dva primera ovakvih analiza^{141,142}.

Imunohemijske metode određivanja imaju visoku selektivnost i veliku osetljivost pri kvantifikaciji određenih pirolizidinskih alkaloida. Najčešće primenjivane metode su RIA i ELISA¹⁴³⁻¹⁴⁶.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparati i hemikalije

GC-MS analize su rađene na *Agilent 7890A* GC sistemu opremljenom sa 5975C inert XL EI/CI MSD i FID detektorom. Korišćena je kolona HP-5 MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) prečnika 25 mm, dužine 30 m, i debljine filma 0.25 μm . Uzorci su injektirani u split-less modu. Zapremina injektiranih uzoraka je bila 0,2 μl , 1 μl i 3 μl , a temperature injektora 250 °C. Gas nosač je helijum sa protokom 1.1 ml/min. Temperaturni program je podešen linarno od 100-325 °C, sa povećanjem od 10 °C/min, i zadržavanjem na 325 °C u trajanju od dva minuta. Transfer linija je podešena na 325 °C, a temperatura FID detektora na 300 °C. EI maseni spektri (70 eV) su snimani u opsegu 45-450 m/z , a temperatura jonskog izvora je bila 230 °C.

NMR spektri su snimani na spektrometrima *Varian Gemini 2000* (200 MHz za ^1H i ^{13}C), *Bruker AMX 500* i *Bruker Avance III 500* (500 MHz za ^1H i ^{13}C). Uzorci su snimani na sobnoj temperaturi i u NMR kivetama prečnika 5 mm. Kao rastvarač korišćen je CDCl_3 i njegovi signali su korišćeni kao referentni. Hemijska pomeranja δ su izražena u ppm jedinicama, a konstante kuplovanja (J) u Hz.

Hromatografija na tankom sloju (TLC) rađena je na aluminijumskim pločama debljine 0,25 mm (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Nemačka), a preparativna TLC na staklenim pločama (20 × 20 cm) debljine 0,75 mm (Kieselgel 60 F₂₅₄).

Ultrazvučno kupatilo USK Ei Niš i rotacioni mikser, napravljen za potrebe laboratorije, korišćeni su tokom optimizacija postupka izolovanja PA iz biljnog materijala.

Podlašavanje pH vrednosti rastvora je rađeno na uređaju PHS-38W SERIES (Microprocessor pH/mV meter).

Korišćene su sledeće hemikalije: standard pentakozana Sigme (USA), sumporna kiselina p.a. Zorke (Šabac) i amonojak p.a. NRK Inžinjerina (Beograd). Za ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala korišćeni su metanol, etanol i metilen-hlorid, koji su pre upotrebe predestilovani.

3.2. Biljni materijal

Biljni materijal *R. umbellata* Bunge sakupljen je u Deliblatskoj peščari, juna 2011. godine. Berba je izvršena na latitudi N 44°57'58" i longitudi E 21°1'48". Herbarijumski primerak se nalazi u Herbarijumu Biološkog fakulteta u Beogradu, zaveden pod brojem BEOU 17070.

Sakupljene biljke su osušene na sobnoj temperaturi tokom petnaest dana. Za svaki eksperiment potrebna količina biljnog materijala je usitnjena i homogenizovana blendiranjem.

3.3. Izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala

R. umbellata Bunge

Osušeni i usitnjeni biljni materijal *R. umbellata* (210 g) je potopljen u 1,0 L metanola na sobnoj temperaturi i tamnom mestu. Nakon sedam dana metanolni ekstrakt je ceđenjem na Bihnerovom levku odvojen od biljnog ostatka i uparen pod sniženim pritiskom. Dobiveno je 22 g suvog ekstrakta, koji je rastvoren u 150 ml sumporne kiseline (C=1 mol/L). Kiseli rastvor alkaloida je odmašćen metilen-hloridom (2 × 70 ml), nakon čega je u rastvor dodat amonijak do pH=9. Iz alkalnog rastvora alkaloidi su ekstrahovani metilen-hloridom (3 × 100 ml). Metilen-hloridni ekstrakti su spojeni i upareni do suva pod sniženim pritiskom. Smeša prečišćenih alkaloida je razdvojena preparativnom tankoslojnom hromatografijom na silka-gelu. Sistem za eluiranje je bio metilen-hlorid : metanol : amonijak (9 : 1 : 0,1), a ploče su tri puta uzastopno razvijane. Trake alkaloida su detektovane pomoću 50 % sumporne kiseline i Dragendorff-ovog reagensa. Na ovaj način izolovano je šest čistih pirolizidinskih alkaloida: 7-angeloiheliotridan (6,4 mg), 7-angeloiheliotridin (1,2 mg), lindelofin (49,0 mg), 7-angeloilrinderin (7,8 mg), punktanečin (1,5 mg) i heliosupin (23,1 mg). Strukture pirolizidinskih alkaloida su utvrđene NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.

3.4. Spektralni podaci izolovanih pirolizidinskih alkaloida

7-Angeloilheliotridan

CIMS $[M+H]^+$ m/z 240; EIMS $[M]^+$ m/z 239;

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 168,5 (s, C-1''), 139,4 (d, C-3''), 127,4 (s, 2''), 74,8 (d, C-8), 72,6 (d, C-7), 63,2 (t, C-9), 54,3 (t, C-3), 53,8 (t, C-5), 44,5 (d, C-1), 32,7 (t, C-6), 28,8 (t, C-2), 20,4 (q, C-5''), 15,9 (q, C-4'');

1H NMR: (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 6,13 (1H, qq, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-3''), 5,19 (1H, m, H-7), 3,79 (2H, d, $J = 6,9$ Hz, H-9), 3,50 (1H, m, H-8), 3,24 (1H, m, H-5b), 3,06 (1H, m, H-3b), 2,83 (1H, m, H-5a), 2,63 (1H, m, H-3a), 2,63 (1H, m, H-1), 2,00 (2H, m, H-6), 1,99 (3H, m, $J_1 = 7,2$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-4''), 1,86 (3H, m, H-5''), 1,40 (2H, m, H-2);

7-Angeloilheliotridin

CIMS $[M+H]^+$ m/z 238; EIMS $[M]^+$ m/z 237;

1H NMR: (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 6,13 (1H, qq, $J_1 = 6,5$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-3''), 5,62 (1H, br s, H-2), 5,12 (1H, m, C-7), 4,36 (2H, br s, H-9), 4,06, (1H, m, H-8), 3,90 (1H, m, H-3b), 3,32 (1H, m, H-3a), 3,16 (1H, m, H-5b), 2,85 (1H, m, H-5a), 2,00 (3H, m, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-4''), 1,91 (2H, m, H-6), 1,87 (3H, m, $J = 1,4$ Hz, H-5'');

Lindelofin

CIMS $[M+H]^+$ m/z 286; EIMS $[M]^+$ m/z 285;

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 174,8 (s, C-1'), 83,0 (s, C-2'), 69,1 (d, C-3'), 67,0 (d, C-8), 64,4 (t, C-9), 55,7 (t, C-5), 53,6 (t, C-3), 39,8 (d, C-1), 32,9 (d, C-5'), 26,2 (t, C-2), 25,8 (t, C-7), 25,7 (t, C-6), 16,9 (q, C-7'), 16,8 (q, C-6'), 16,4 (q, C-4');

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 4,30 (2H, br d, $J = 7,2$ Hz, H-9), 4,09 (1H, q, $J = 6,4$ Hz, H-3'), 3,66 (1H, m, H-8), 3,43 (1H, m, H-3a), 2,91 (1H, m, H-5a), 2,65 (1H, m, H-5b), 2,50 (1H, m, H-3b), 2,00 (1H, m, H-1), 1,96 (1H, m, H-5'), 1,70 (2H, m, H-2),

1,60 (2H, m, H-6), 1,53 (2H, m, H-7), 1,21(3H, d, $J = 6,2$ Hz, H-4'), 0,97 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, H-7'), 0,92 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-6');

7-Angeloilirinderin

CIMS $[M+H]^+$ m/z 382;

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 175,2 (s, C-1'), 168,1 (s, C-1''), 138,9 (d, C-3''), 134,5 (s, C-1), 129,3 (d, C-2), 127,6 (s, 2''), 82,9 (s, 2'), 79,2 (d, C-8), 76,9 (d, C-7), 69,3 (d, C-3'), 62,2 (t, C-3), 62,2 (t, C-9), 54,2 (t, C-5), 32,8 (d, C-5'), 30,2 (t, C-6), 20,4 (q, C-5''), 17,3 (q, C-4'), 17,1 (q, C-6'), 16,7 (q, C-7'), 15,8 (q, C-4'');

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 6,2 (1H, qq, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-3''), 5,85 (1H, br s, H-2), 5,17 (1H, br s, H-7), 4,95 (2H, br s, H-9), 4,09 (1H, q, $J = 6,4$ Hz, H-3'), 4,06 (1H, m, H-8), 3,96 (1H, br d, H-3b), 3,36 (1H, m, H-3a), 3,20 (1H, m, H-5b), 2,86 (1H, m, H-5a), 2,08 (1H, m, $J = 6,9$ Hz, H-5'), 1,98 (3H, m, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-4''), 1,92 (2H, m, H-6), 1,87 (3H, m, $J = 1,4$ Hz, H-5''), 1,27 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H-4'), 0,94 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-6'), 0,93 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, H-7');

Punktanecin

CIMS $[M+H]^+$ m/z 384;

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 6,10 (1H, qq, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-3''), 5,10 (1H, dd, H-7), 4,38 (2H, dd, H-9), 4,04 (1H, m, H-3'), 3,60 (1H, m, H-8), 3,22 (1H, m, H-3b), 2,66 (1H, m, H-3a), 3,02 (1H, m, H-5b), 2,75 (1H, m, H-5a), 2,14 (1H, m, $J = 6,6$ Hz, H-5'), 2,02 (2H, m, H-2), 2,00 (1H, m, H-1), 2,00 (1H, m, H-6b), 1,97 (3H, m, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-4''), 1,94 (1H, m, H-6a), 1,87 (3H, m, $J = 1,4$ Hz, H-5''), 1,21 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-4'), 0,93 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, H-6'), 0,92 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, H-7');

Heliosupin

CIMS $[M+H]^+$ m/z 398;

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 174,3 (s, C-1'), 168,1 (s, C-1''), 139,8 (s, C-1), 139,7 (d, C-3''), 128,9 (d, C-2), 127,2 (s, 2''), 82,8 (s, 2'), 79,1 (d, C-8), 76,7 (d, C-7), 73,8 (s,

C-5'), 69,8 (d, C-3'), 62,0 (t, C-9), 61,9 (t, C-3), 54,1 (t, C-5), 30,0 (t, C-6), 25,9 (q, C-6'), 24,8 (q, C-7'), 20,4 (q, C-5''), 18,5 (q, C-4'), 15,9 (q, C-4'');

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6,16 (1H, qq, $J_1 = 7,2$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, H-3''), 5,92 (1H, br s, H-2), 5,24 (1H, m, H-7), 5,04 (1H, br d, $J = 13$ Hz, H-9a), 4,93 (1H, br d, $J = 13$ Hz, H-9b), 4,21 (1H, q, $J = 6,5$ Hz, H-3'), 4,41 (1H, m, H-8), 4,16 (1H, m, H-3a), 3,47 (1H, m, H-3b), 3,38 (1H, m, H-5a), 2,97 (1H, m, H-5b), 2,04 (2H, m, H-6), 1,98 (3H, dq, $J_1 = 7,2$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, H-4''), 1,88 (3H, m, $J = 1,5$ Hz, H-5''), 1,30 (3H, s, H-7'), 1,28 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-4'), 1,26 (3H, s, H-6');

3.5. Maceracija biljnog materijala u metanolu

Usitnjeni i homogenizovani uzorci (1,00 g) biljnog materijala su potopljeni u 30 ml metanola i ostavljeni na sobnoj temperaturi i tamnom mestu tokom 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Zatim su procedeni na Bihnerovom levku i metanolni ekstrakt je uparen do suva pri sniženom pritisku. Suvi ekstrakt je rastvoren u 30 ml sumporne kiseline (C=1 mol/L) i odmašćen sa dve porcije metilen-hlorida od 30 ml. U kiseli rastvor je postepeno dodavan amonijak, odnosno pH rastvora je podešen na 9. Pirolizidinski alkaloidi su iz alkalnog rastvora ekstrahovani sa tri porcije metilen-hlorida od po 30 ml. Metilen-hloridni ekstrakti su spojeni i upareni do suva pri sniženom pritisku. U prečišćenu smešu pirolizidinskih alkaloida dodato je 10 µL rastvora pentakozana (inertni standard) u metilen-hloridu (C=1,3550 g/L). Smeša je zatim rastvorena u 1,00 ml metilen-hlorida, a sadržaj smeše (prinosi svakog od šest izolovanih alkaloida) je određen GC/MS-FID analizom. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe.

3.6. Maceracija biljnog materijala u etanolu

Odmereni su uzorci mase 1,00 g usitnjenog i homogenizovanog biljnog materijala i potopljeni u 30 ml etanola. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi i tamnom mestu u trajanju od 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Po isteku vremena etanolni ekstrakt je od biljnog materijala odvojen ceđenjem kroz Bihnerov levak i uparen do suva pri sniženom

pritisku. Suvi ekstrakt je rastvoren u 30 ml rastvora sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$) i odmašćen sa dve porcije metilen-hlorida od po 30 ml. Kiselom rastvoru je zatim dodat amonijak do $\text{pH}=9$. Pirolizidinski alkaloidi su iz alkalnog rastvora ekstrahovani sa tri porcije metilen-hlorida od po 30 ml. Metilen-hloridni ekstrakti su spojeni i upareni do suva pri sniženom pritisku. U prečišćenu smešu pirolizidinskih alkaloida dodato je $10 \mu\text{L}$ standardnog rastvora pentakozana u metilen-hloridu ($C=1,3550 \text{ g/L}$). Smeša PA je rastvorena u $1,00 \text{ ml}$ metilen-hlorida, a sadržaj smeše određen je GC/MS-FID analizom. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe.

3.7. Maceracija biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$)

Uzorci suve, usitnjene i homogenizovane biljke ($1,00 \text{ g}$) su potopljeni u 30 ml rastvora sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$) i ostavljeni na sobnoj temperaturi i tamnom mestu tokom: 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Potom su proceđeni kroz Bihnerov levak, odmašćeni sa dve porcije metilen-hlorida ($2 \times 30 \text{ ml}$). U kiselu rastvor dodat je amonijak do $\text{pH} 9$. Iz alkalnog rastvora su pirolizidinski alkaloidi ekstrahovani sa tri porcije metilen-hlorida od po 30 ml . Metilen-hloridni ekstrakti su spojeni i upareni do suva pri sniženom pritisku. U prečišćenu smešu pirolizidinskih alkaloida dodato je $10 \mu\text{L}$ standardnog rastvora pentakozana u metilen-hloridu ($C=1,3550 \text{ g/L}$). Smeša je rastvorena u $1,00 \text{ ml}$ metilen-hlorida, a sadržaj smeše je određen GC/MS-FID analizom. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3.8. Optimizacija koncentracije rastvora sumporne kiseline za ekstrakciju biljnog materijala

Usitnjeni i homogenizovani uzorci osušenog biljnog materijala (1 g) su potopljeni u 30 ml sumporne kiseline različite koncentracije: $0,05 \text{ mol/L}$; $0,10 \text{ mol/L}$; $0,25 \text{ mol/L}$; $0,50 \text{ mol/L}$; $0,75 \text{ mol/L}$; $1,00 \text{ mol/L}$; $1,25 \text{ mol/L}$ i $1,50 \text{ mol/L}$. Maceracija

na tamnom mestu i sobnoj temperaturi je trajala četiri dana. Biljni materijal je odstranjen ceđenjem kroz Bihnerov levak, a ekstrakt je odmašćen sa dve porcije metilen-hlorida (2×30 ml). U kiseli rastvor je dodat amonijak do pH 9. Pirolizidinski alkaloidi su iz alkalnog rastvora ekstrahovani metilen-hloridom (3×30 ml). Metilen-hloridni ekstrakti su spojeni i upareni do suva pri sniženom pritisku. Smeši pirolizidinskih alkaloida dodato je $10 \mu\text{L}$ standardnog rastvora pentakozana u metilen-hloridu ($C=1,3550$ g/L). Smeša je rastvorena u $1,00$ ml metilen-hlorida, a sadržaj smeše (prinosi svakog od šest izolovanih alkaloida) je određeno GC/MS-FID analizom. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe.

3.9. Izbor tehnike za efikasnu ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida. Određivanje optimalnog vremena trajanja ekstrakcije sumpornom kiselinom.

Uzorci osušenog biljnog materijala (1 g) su ekstrahovani sa 30 ml sumporne kiseline ($C=1$ mol/L) tokom $1, 2, 3, 4$ i 5 dana na sobnoj temperaturi različitim tehnikama ekstrakcije: maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera. Ultrazvučna ekstrakcija je trajala deset sati tokom jednog dana. Nakon ceđenja na Bihnerovom levku uzorci su odmašćeni metilen-hloridom (2×30 ml) i potom zaalkalisani amonijum-hidroksidom do pH 9. Pirolizidinski alkaloidi su ekstrahovani sa tri porcije metilen-hlorida od po 30 ml, ekstrakti su spojeni i upareni do suva pri sniženom pritisku. U suvi ostatak PA dodato je $10 \mu\text{L}$ standardnog rastvora pentakozana u metilen-hloridu ($C=1,3550$ g/L) i $1,00$ ml metilen-hlorida i u njoj je određen prinos svakog od šest izolovanih i okarakterisanih alkaloida. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu.

3.10. Optimizacija zapremine rastvora sumporne kiseline

Uzorci usitnjene i homogenizovane biljke ($1,00$ g) su ekstrahovani tri dana na rotacionom mikseru sa različitim zapreminama rastvora sumporne kiseline ($C=1$ mol/L): $25, 30, 35, 40, 45$ i 50 ml, a potom proceđeni na Bihnerovom levku.

Odmašćivanje kiselih ekstrakata urađeno je sa dve porcije metilen-hlorida (2×30 ml). Ekstrakti su dalje tretirani kao što je opisano u Poglavlju 3.9. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe.

3.11. Optimizacija uslova za alkalnu ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida

Biljni materijal (1,00 g), usitnjen i homogenizovan, je ekstrahovan tri dana na rotacionom mikseru sa 30 ml sumporne kiseline ($C=1$ mol/L). Uzorci su procedeni su na Bihnerovom levku i nepolarne supstance su uklonjene ekstrakcijom sa dve porcije metilen-hlorida (2×30 ml). U kisele rastvore dodavan je amonijum-hidroksid do postizavanja različitih pH vrednosti rastvora: 7,50, 8,00, 8,50, 8,75, 9,00, 9,25, 9,50, 9,75, 10,00 i 10,50. Iz ovih alkalnih rastvora pirolizidinski alkaloidi su dalje tretirani po postupku opisanom u Poglavlju 3.9. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe.

3.12. Broj ponovljenih ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida metilen-hloridom

Usitnjeni i homogenizovani uzorci biljnog materijala (1,00 g), su ekstrahovani tri dana na rotacionom mikseru sa 30 ml sumporne kiseline ($C=1$ mol/L). Uzorci su procedeni na Bihnerovom levku i odmašćeni sa dve porcije metilen-hlorida (2×30 ml). U kiselu rastvor pirolizidinskih alkaloida dodat je amonijum-hidroksid do pH 9. Pirolizidinski alkaloidi su iz alkalnog rastvora ekstrahovani metilen-hloridom (30 ml), a potom se broj uzastopnih ekstrakcija sa istom zapreminom metilen-hlorida povećavao (2, 3, 4 i 5 puta). Spojeni metilen-hloridni ekstrakti su dalje tretirani po postupku opisanom u Poglavlju 3.9. Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu. Prinosi dobijeni u slučaju ekstrakcije sa jednom porcijom metilen-hlorida poređeni su za svaki od šest alkaloida sa prinosima dobijenim pri ponovljenim ekstrakcijama 2, odnosno 3, 4 i 5 puta.

3.13. Prinos pirolizidinskih alkaloida

U svaki uzorak izolovanih pirolizidinskih alkaloida, pre GC/MS-FID analize je dodata ista količina pentakozana kao inertnog standarda. Prinos pirolizidinskih alkaloida je računat iz dobivenih hromatograma na sledeći način:

$$\text{prinos PA} = \text{površina plka PA} / \text{površina plka inertnog standarda}$$

Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe (n=3). Relativne standardne devijacije srednjih vrednosti dobivenih prinosa pirolizidinskih alkaloida bile su u opsegu od 0,81 % do 29,74 %.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj ovog rada je optimizacija postupka za izolovanje i određivanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala. Najveći izazov je bio pronaći uslove pod kojima će jedinjenja sa značajnim strukturnim razlikama biti izolovana uz maksimalni prinos. Pirolizidinski alkaloidi su relativno polarna bazna jedinjenja i na ovim svojstvima su bazirane ideje za njihovo izolovanje iz biljnog materijala, zabeležene u literaturi. Za primarnu ekstrakciju iz biljnog materijala najčešće su primenjivani sledeći organski rastvarači (metanol, zakišljen metanol, etanol, hloroform/metanol, voda) i rastvori sumporne, hlorovodonične i limunske kiseline^{15,28,74,75,81,92,103,105,147,148,149}. Najmanji prinosi dobiveni su sa vodom (pH 7). Prilikom upotrebe rastvora hlorovodonične kiseline i hloroforma, u kome je hlorovodonična kiselina prisutna u tragovima, dolazilo je do reakcije između hlorovodonične kiseline i alkaloida sa epoksidnom grupom⁷⁷. U literaturi su zabeležene različite tehnike pomoću kojih su vršene početne ekstrakcije biljnog materijala: maceracija^{81,82}, ultrazvučna ekstrakcija⁸³, Soxhlet-ova ekstrakcija^{76,84,85}, super-kritična ekstrakcija ugljen-dioksidom⁹⁶⁻¹⁰² i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera. Najčistija smeša alkaloida dobivala se superkritičnom ekstrakcijom, ali zbog visoke cene ova tehnika nije zaživela u praksi i retko je primenjivana. Glavni nedostatak Soxhlet-ove ekstrakcije je što dolazi do razlaganja alkaloida nestabilnih na povišenim temperaturama⁸⁸.

U ovom radu optimizacija uslova primarne ekstrakcije biljnog materijala izvođena je rastvaračima sa kojima su postizani dobri rezultati (metanol, etanol i rastvor sumporne kiseline) i poređena je njihova efikasnost. Poređene su i efikasnosti primene različitih tehnika pri ekstrakciji: maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera. Takođe je optimizovana pH vrednost alkalnog rastvora alkaloida za ekstrakciju metilen-hloridom i broj reekstrakcija potreban za postizanje najvišeg prinosa alkaloida. Optimizacija postupka za izolovanje i određivanje PA rađena je sa biljnom vrstom *R. umbellata* Bunge čiji je pirolizidinski sastav prethodno utvrđen. Tokom optimizacija praćen je prinos šest pirolizidinskih alkaloida.

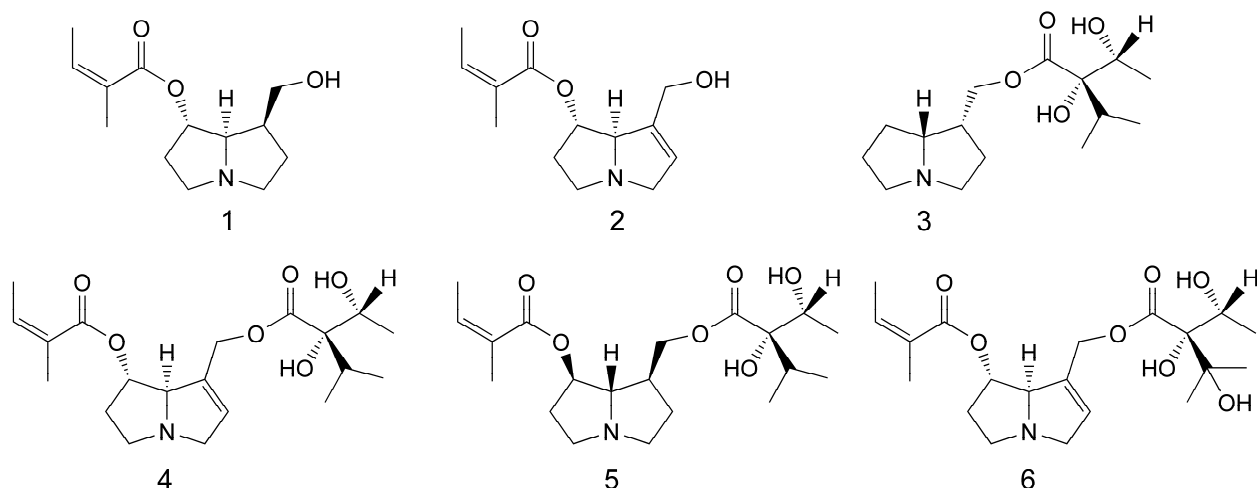
4.1. Izolovanje i određivanje strukture pirolizidinskih alkaloida iz *R. umbellata* Bunge

Biljni materijal *R. umbellata* je osušen na vazduhu na sobnoj temperaturi tokom petnaest dana, nakon čega je usitnjen i homogenizovan u blenderu. Primarna ekstrakcija je rađena metanolom, stajanjem na sobnoj temperaturi tokom sedam dana. Nakon odvajanja metanolnog ekstrakta od ostatka biljnog materijala ceđenjem kroz Bihnerov levak, ekstrakt je uparen do suva u vakuum-uparivaču, a suvi ostatak rastvoren u sumpornoj kiselini koncentracije 1 mol/L. Kiseli rastvor alkaloida ekstrahovan je metilen-hloridom, kako bi se iz rastvora uklonila jedinjenja nepolarnija od alkaloida. Zatim je kiselom rastvoru dodavan amonijak do pH 9, pri čemu su se alkaloidi deprotonovali i time se smanjila njihova rastvorljivost u vodi. Iz alkalnog rastvora alkaloidi su ekstrahovani metilen-hloridom do negativne reakcije sa Dragendorfovom reagensom. Metilen-hloridni ekstrakti alkaloida su spojeni i upareni do suva na vakuum-uparivaču. Smeša alkaloida razdvojena je pomoću tankoslojne preparativne hromatografije. Za eluiranje je primenjen sistem metilen-hlorid/metanol/amonijak (9/1/0,1).

Ovim postupkom izolovano je šest pirolizidinskih alkaloida (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktanečin i heliosupin, Tabela 5, Slika 15). Strukture alkaloida su određene NMR spektroskopijom (Slike 16,17-**PA1**; 20-**PA2**; 23,24-**PA3**; 27,28-**PA4**; 31-**PA5**; 34,35-**PA6**) i masenom spektrometrijom (Slike 18,19-**PA1**;21,22-**PA2**; 25,26-**PA3**; 29,30-**PA4**; 32,33-**PA5**; 36,37-**PA6**), poređenjem sa literaturnim NMR podacima^{101,102} i masenim spektrima¹⁵⁰.

Tabela 5. Pregled alkaloida izolovanih iz *Rindera umbellata* Bunge

Broj	Trivijalni naziv	Naziv po IUPAC-u	M _r	Slike NMR i MS spektara
PA1	7-Angeloilheliotridan	(Z)-((1S,7S,7aR)-7-(hidroksimetil)heksahidro-1H-pirolizin-1-il)2-metilbut-2-enoat	239	16 i 17; 18 i 19
PA2	7-Angeloilheliotridin	(Z)-((1S,7aR)-7-(hidroksimetil)-2,3,5,7a-tetrahidro-1H-pirolizin-1-il)2-metilbut-2-enoat	237	20; 21 i 22
PA3	Lindelofin	(2S,3R)-((1R,7aR)-heksahidro-1H-pirolizin-1-il) metil-2,3-dihidroksi-2-izopropilbutanoat	285	23 i 24; 25 i 26
PA4	7-Angeloilrinderin	(2S,3R)-((1S,7aR)-heksahidro-1H-pirolizin-1-il) metil-2,3-dihidroksi-2-izopropilbutanoat	381	27 i 28; 29 i 30
PA5	Punktanecin	(Z)-((1R,7S,7aS)-7-(((2S,3R)-2,3-dihidroksi-2-izopropilbutanoiloksi)metil)heksahidro-1H-pirolizin-1-il)2-metilbut-2-enoat	383	31; 32 i 33
PA6	Heliosupin	(Z)-((1S,7aR)-7-(((R)-2,3-dihidroksi-2-((R)-1-hidroksietil)-3-metilbutanoiloksi)metil)-2,3,5,7a-tetrahidro-1H-pirolizin-1-il)2-metilbut-2-enoat	397	34 i 35; 36 i 37

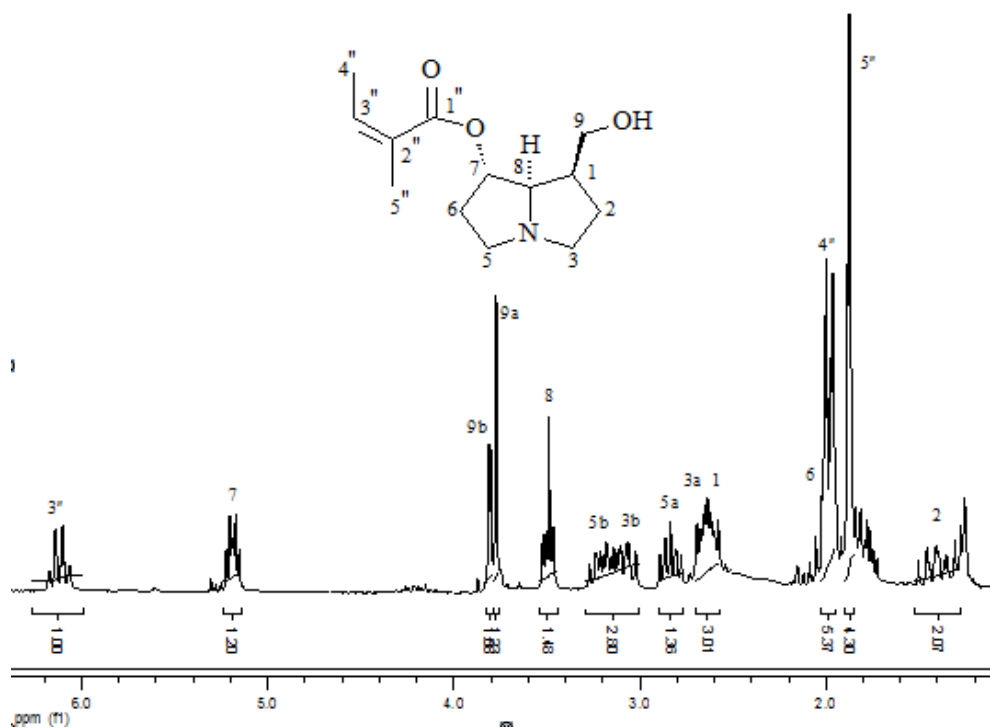
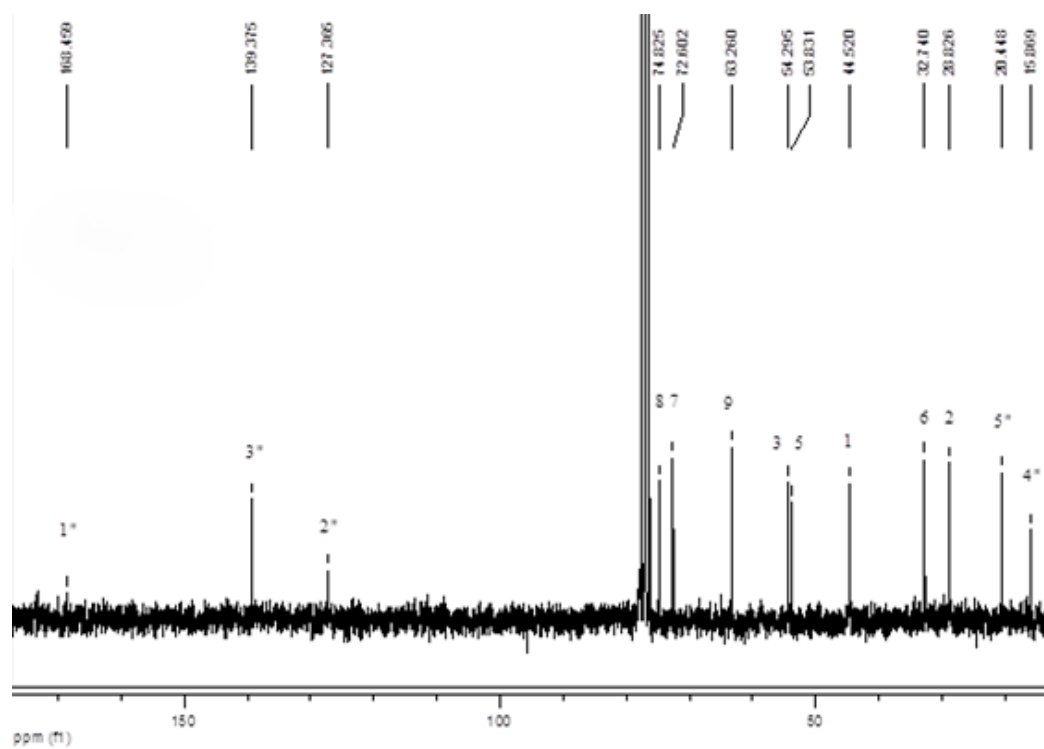


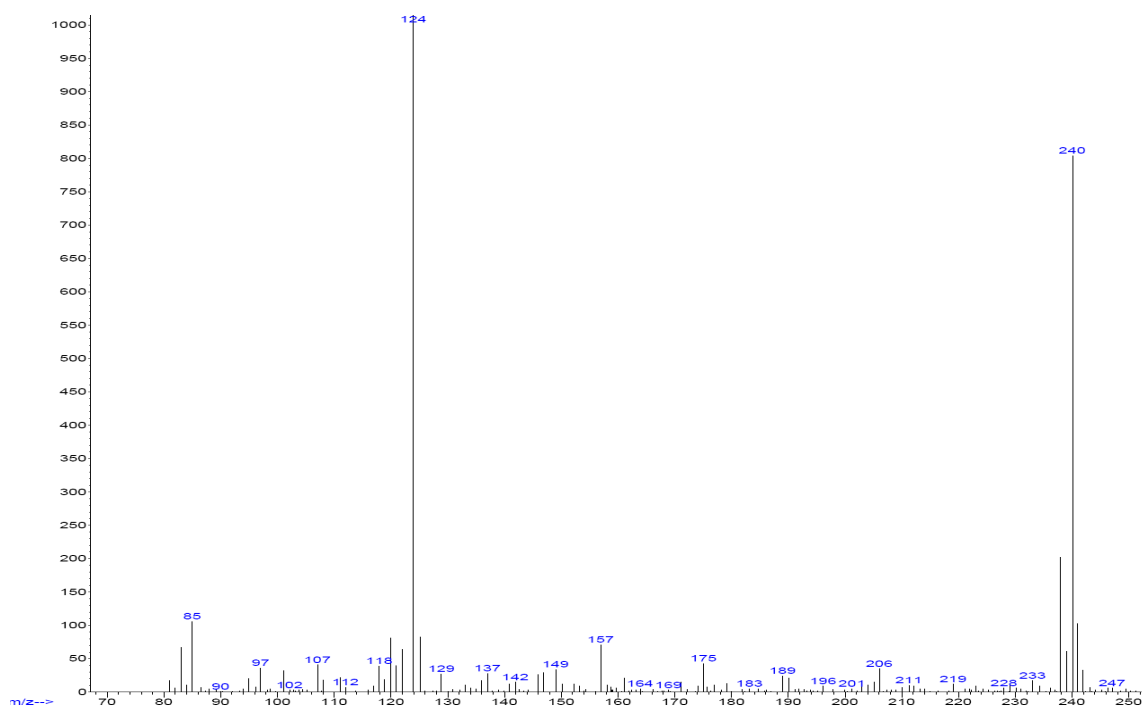
Slika 15. Strukturne formule pirolizidinskih alkaloida izolovanih iz *R. Umbellata*. Nazivi jedinjenja, sa oznakama PA od **1-6**, dati su u tabeli 5.

Kako je napred istaknuto, PA se prema necinskim bazama mogu klasifikovati u četiri tipa: heliotridinski, platynecinski, otonecinski i retronecinski tip. Retronecine i heliotridine (enantiomeri na C7 položaju) su, pored otonecinskog tipa PA, privukli mnogo pažnje zbog njihove rasprostranjenosti i velike toksičnosti⁷². Ispitivanje raspodele PA u okviru familija je pokazalo da je otonecinski tip PA glavni predstavnik u familiji Asteraceae, a heliotridinski u familiji Boraginaceae. Retronecinski tip PA se može naći u biljnim vrstama iz familija Fabaceae, Asteraceae i Boraginaceae^{31,72,95}.

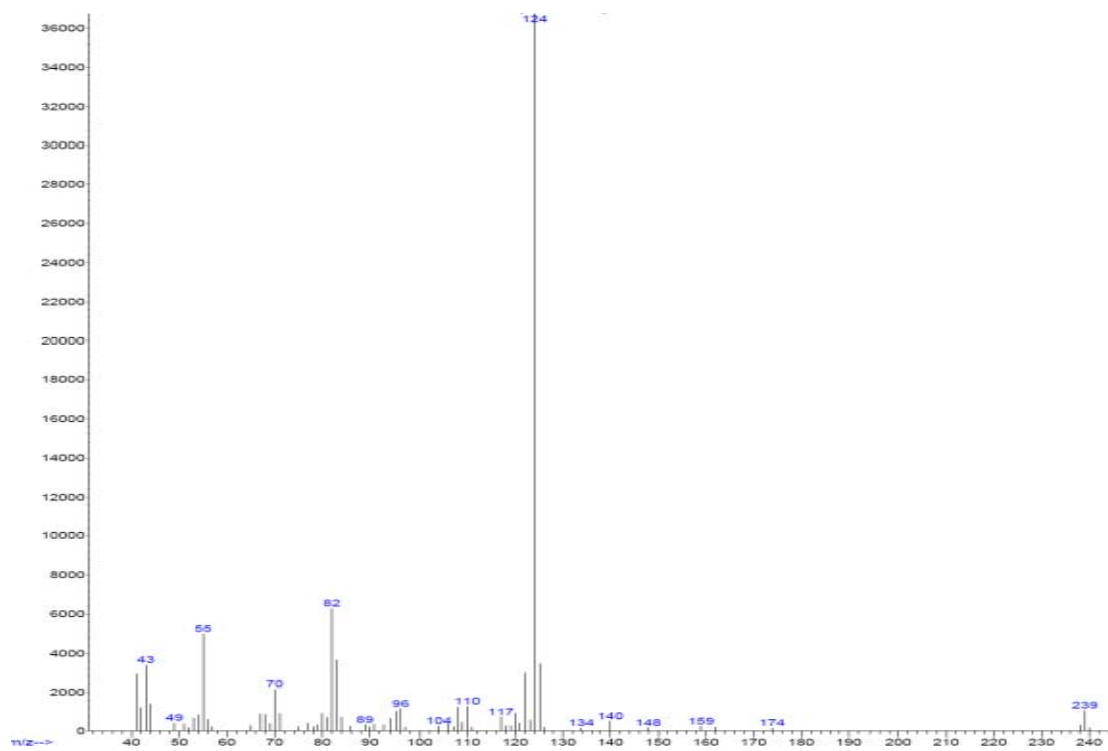
Većina izolovanih PA iz *R. umbellata* Bunge pripadaju heliotridinskom tipu. Slično ovom nalazu nađeno je da su PA heliotridinskog tipa dominantni u prethodno ispitivanim *Rindera* vrstama: *R. austroechinata*, *R. baldschuanica*, *R. cyclodonta*, *R. echanata* i *R. oblongifolia*⁹⁵. Ehinatin je prisutan u svim ovim vrstama i stoga bi se on mogao razmatrati kao karakteristika roda. Ipak do sada nije istraženo dovoljno *Rindera* vrsta da bi se izveli zaključci o alkaloidima kao hemijskim markerima za razlikovanje vrsta unutar roda.

7-Angeloilheliotridan (PA1)

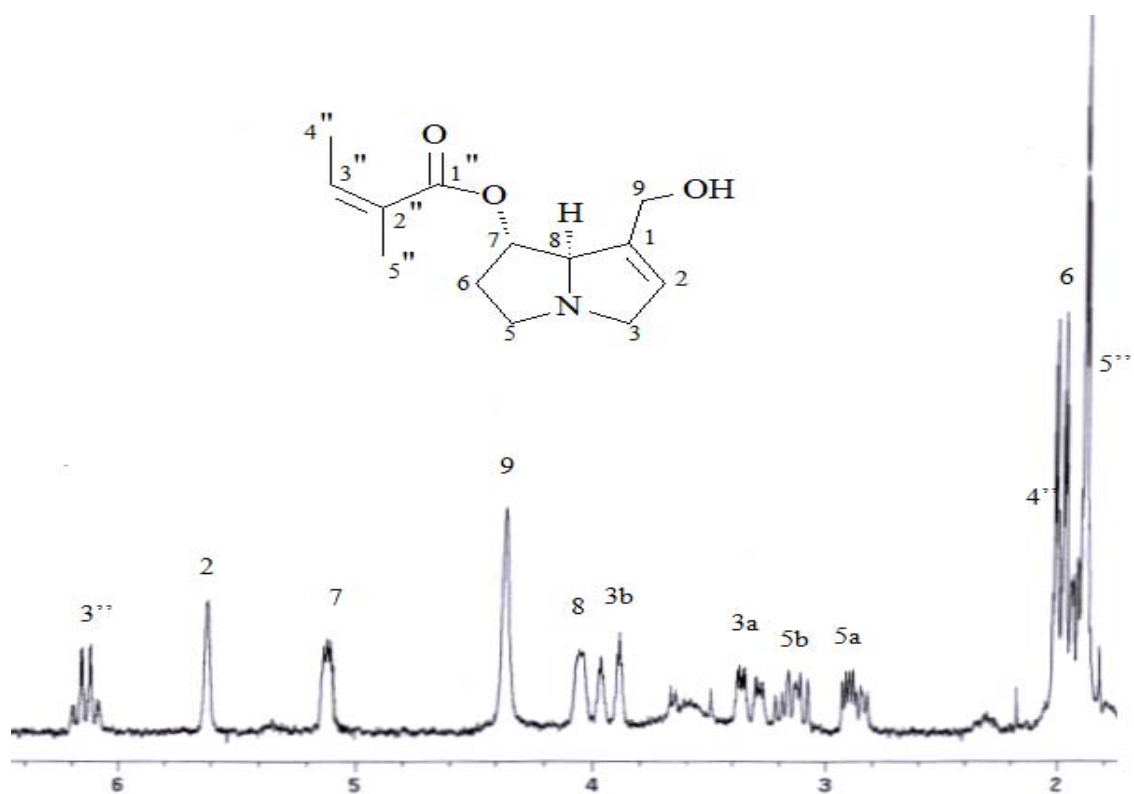
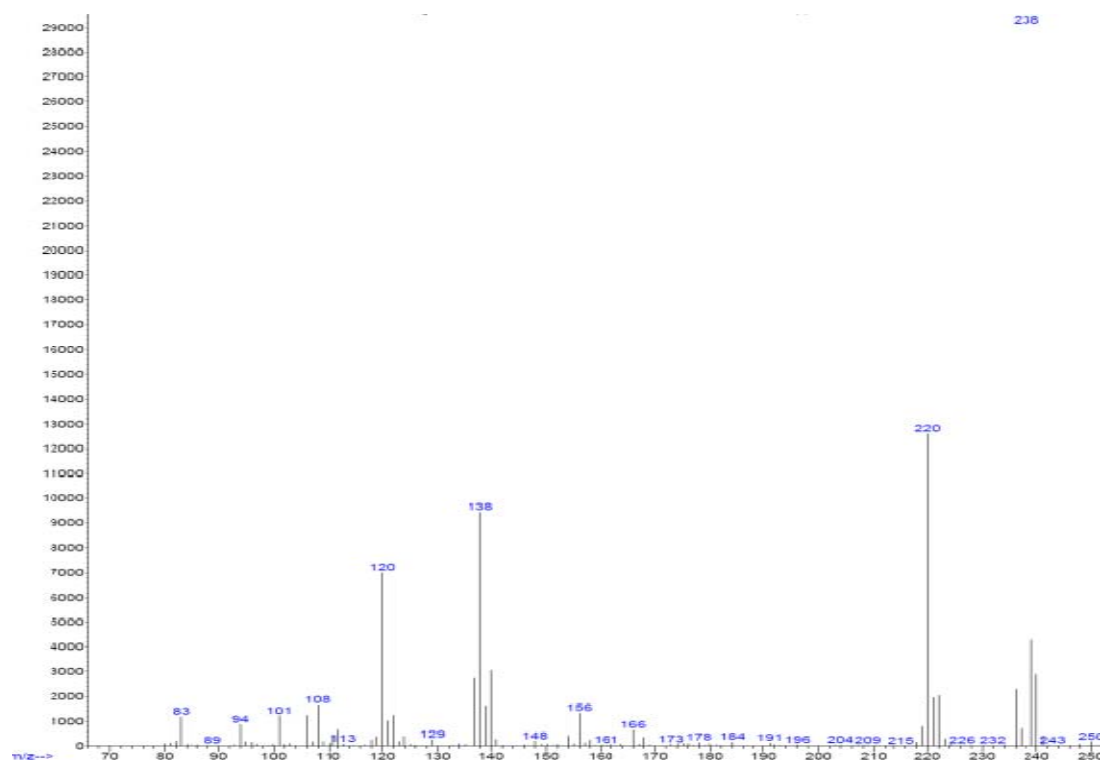
Slika 16. ¹H NMR spektar 7-angeloilheliotridanaSlika 17. ¹³C NMR spektar 7-angeloilheliotridana

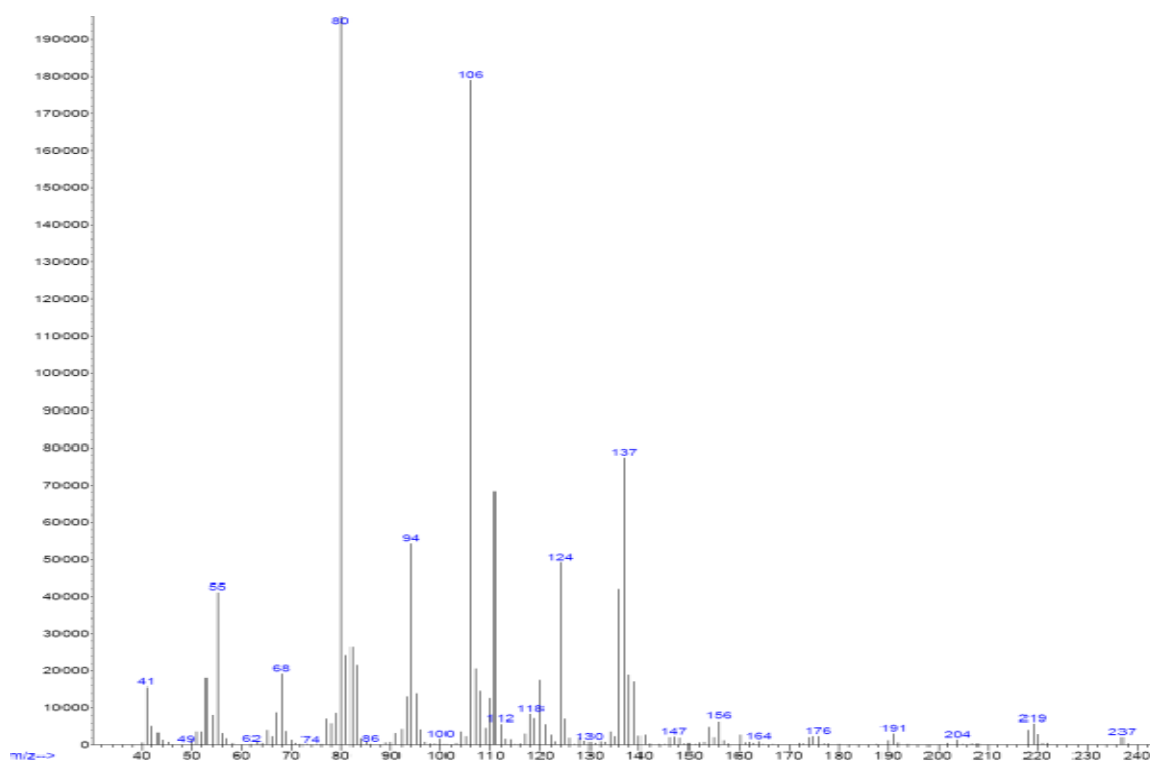


Slika 18. CI MS spektar 7-angeloiheliotridana

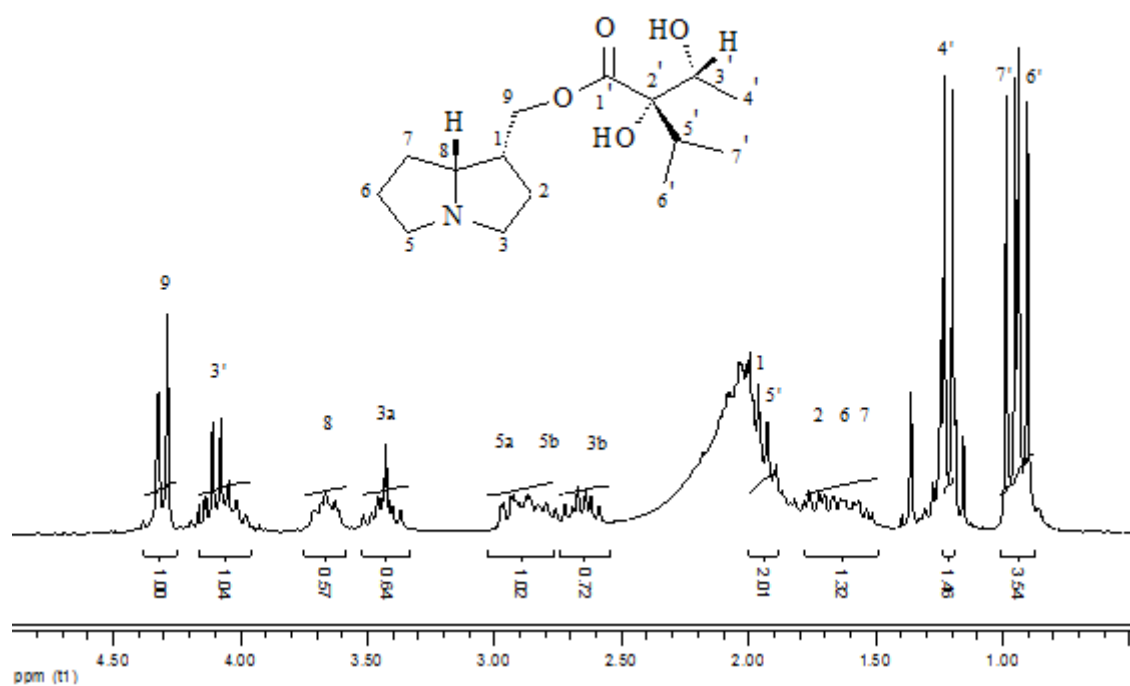


Slika 19. EI MS spektar 7-angeloiheliotridana

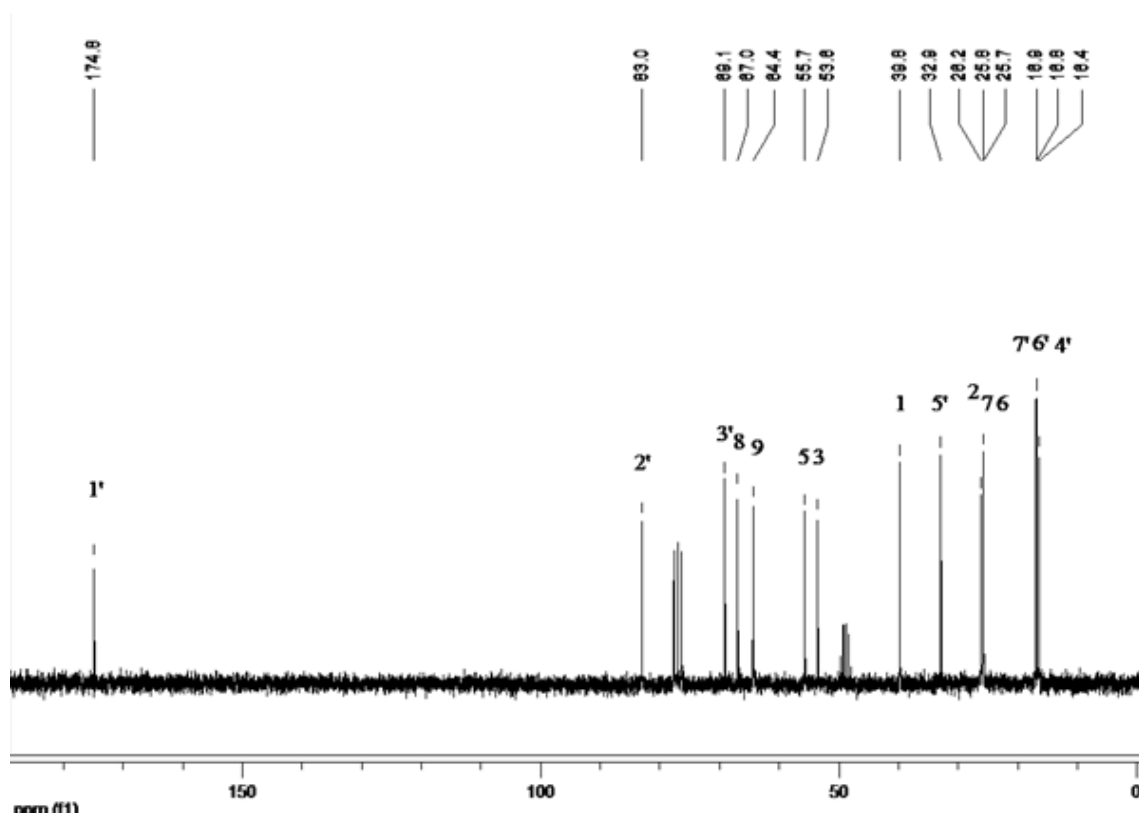
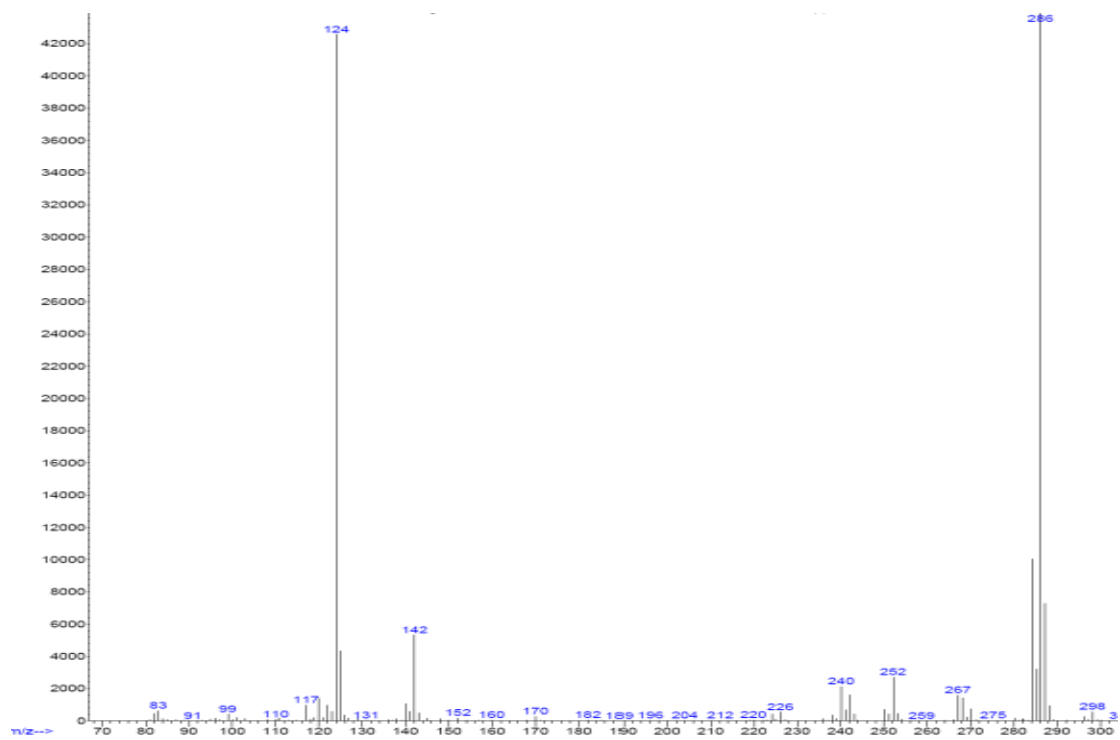
7-Angeloilheliotridin (PA2)**Slika 20.** ^1H NMR spektar 7-angeloilheliotridina**Slika 21.** CI MS spektar 7-angeloilheliotridina



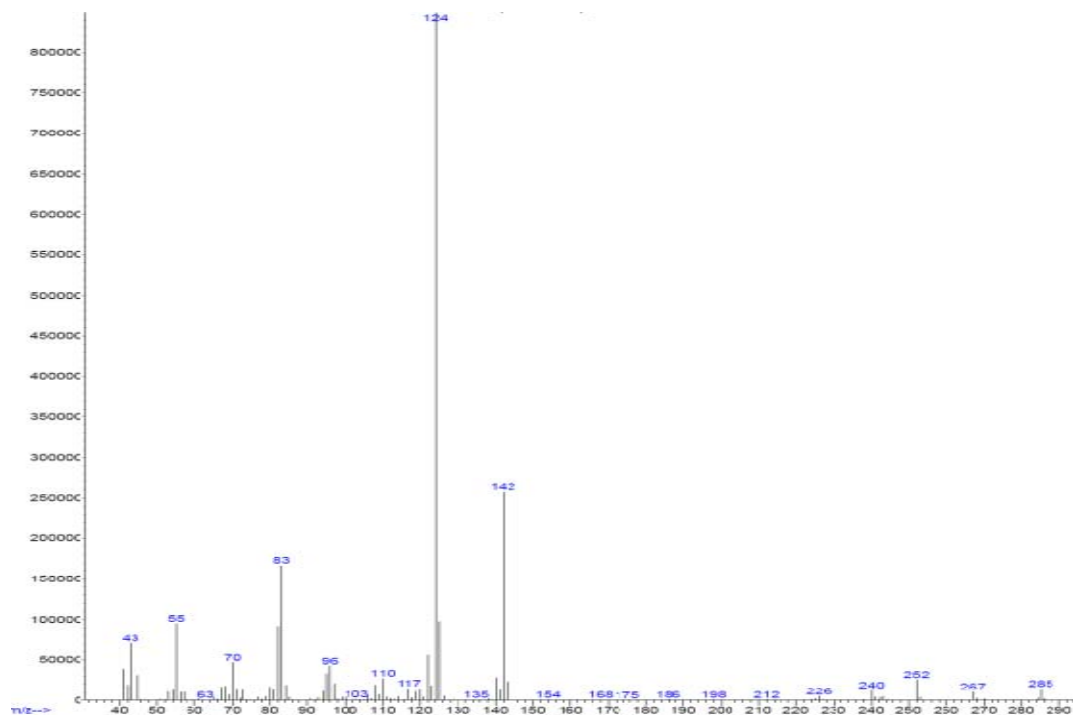
Slika 22. EI MS spektar 7-angeloilheliotridina
Lindelofin (PA3)



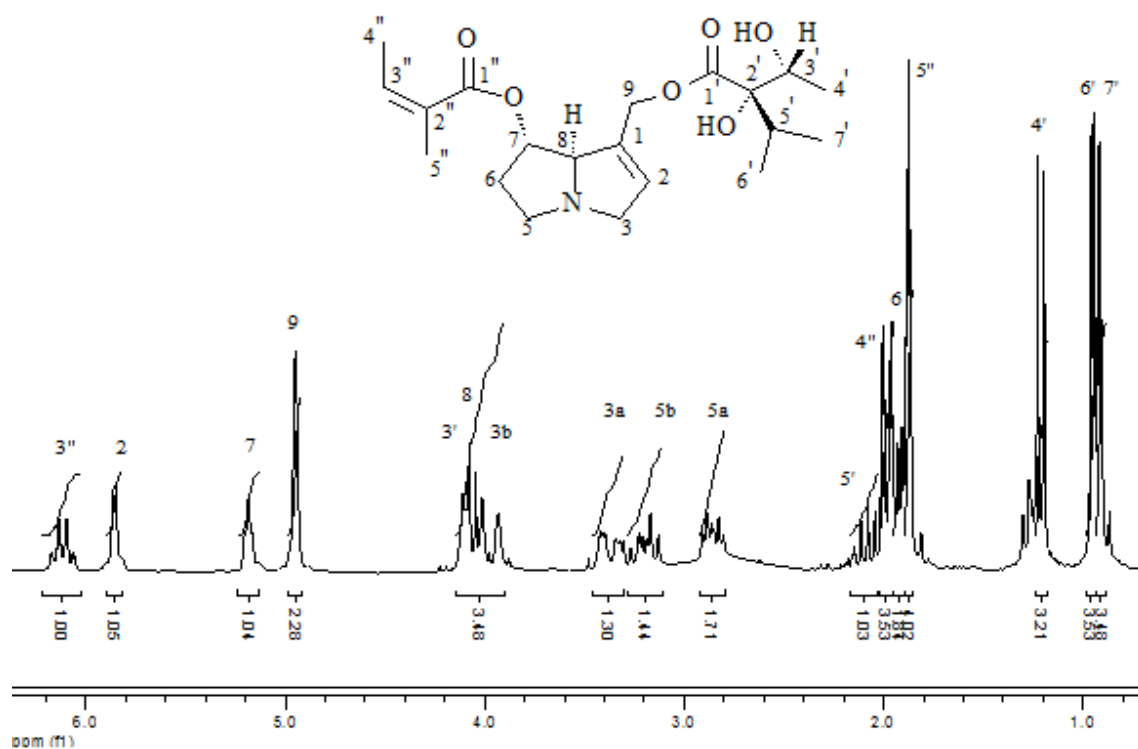
Slika 23. ^1H NMR spektar lindelofina

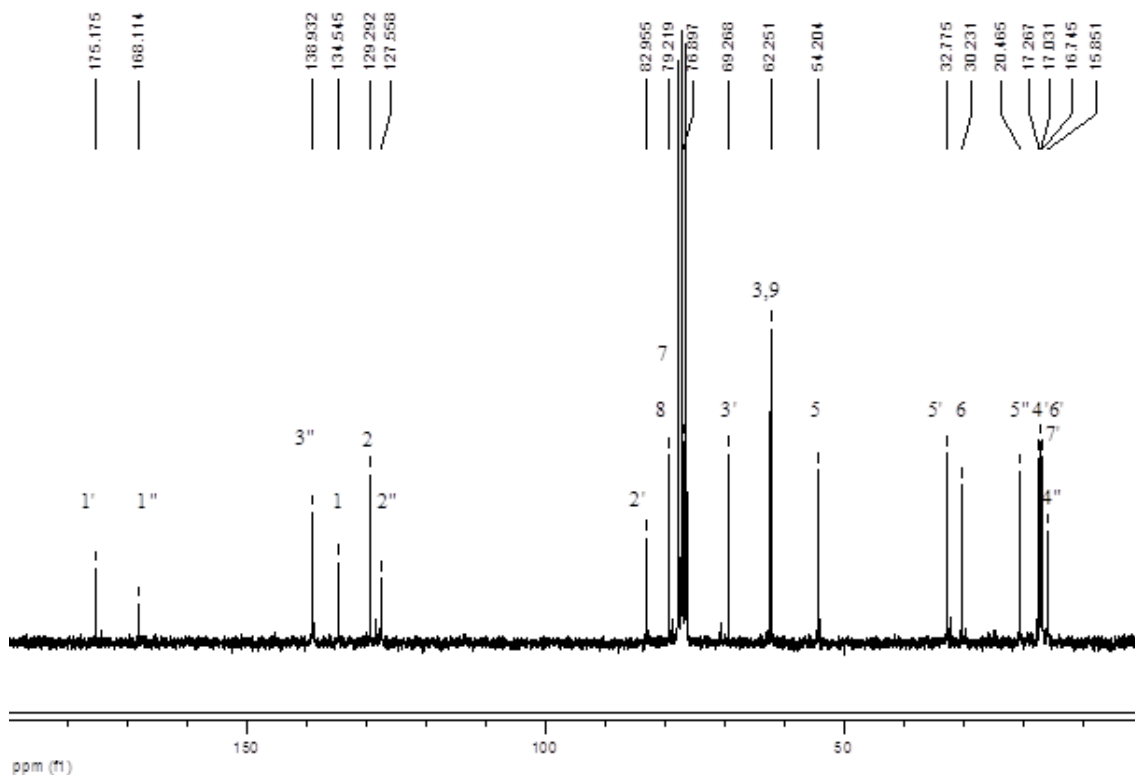
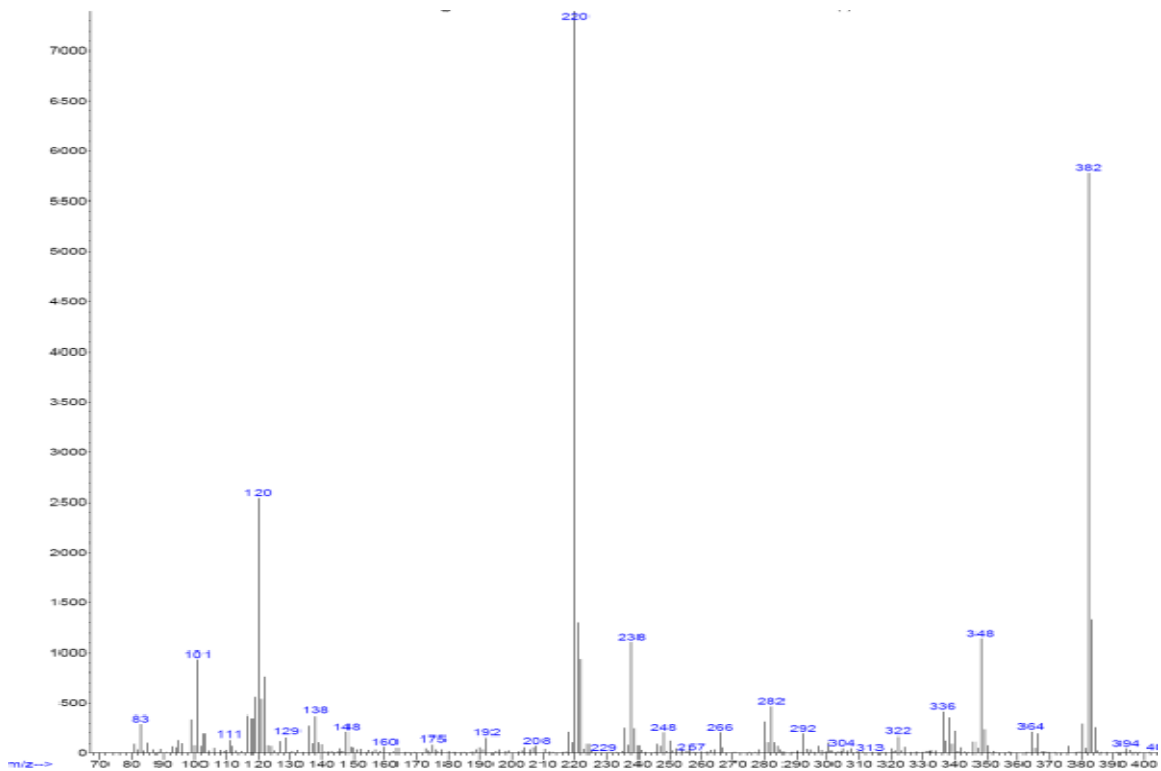
Slika 24. ^{13}C NMR spektar lindelofina

Slika 25. CI MS spektar lindelofina

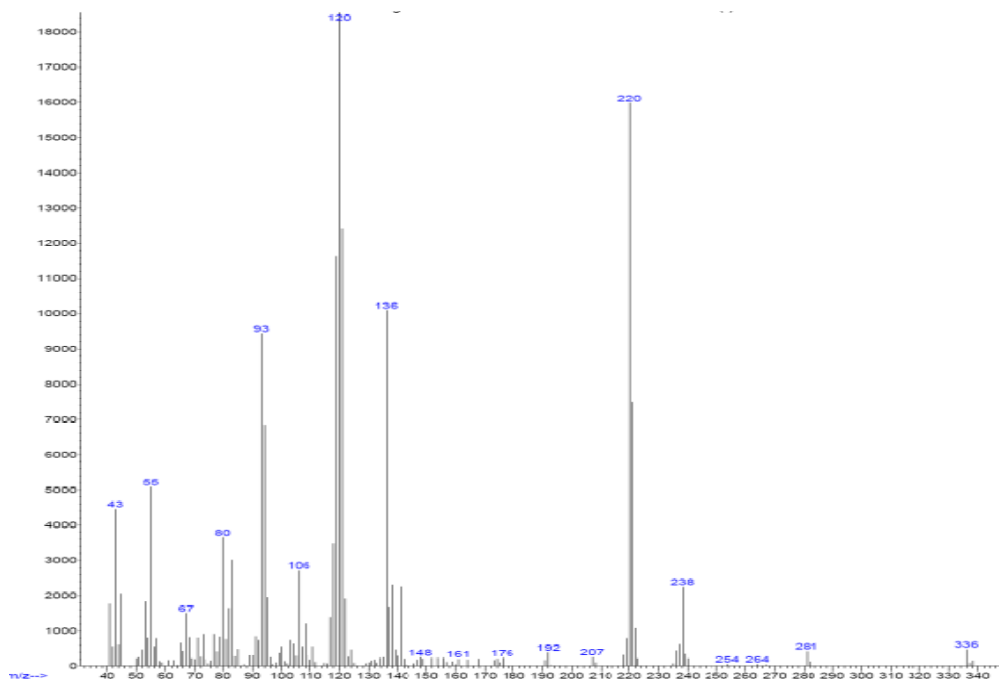


Slika 26. EI MS spektar lindelofina

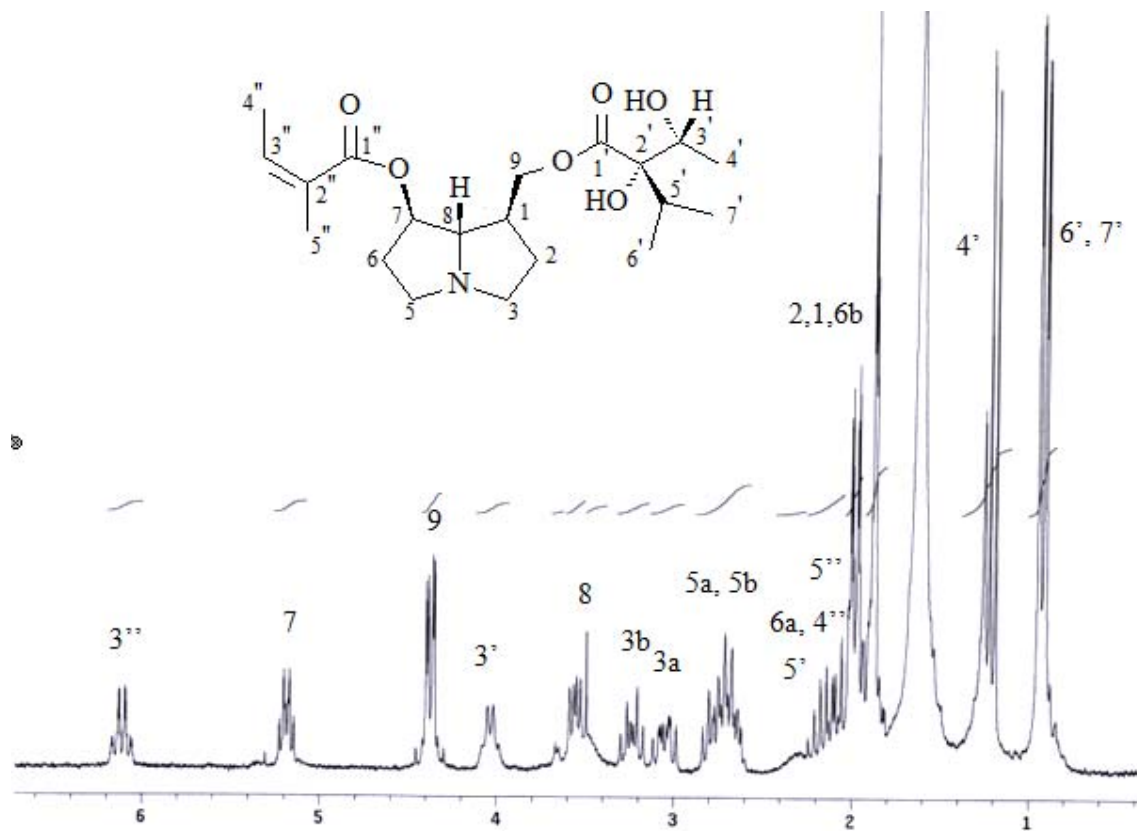
7-Angeloilrinderin (PA4)Slika 27. ^1H NMR spektar 7-angeloilrinderina

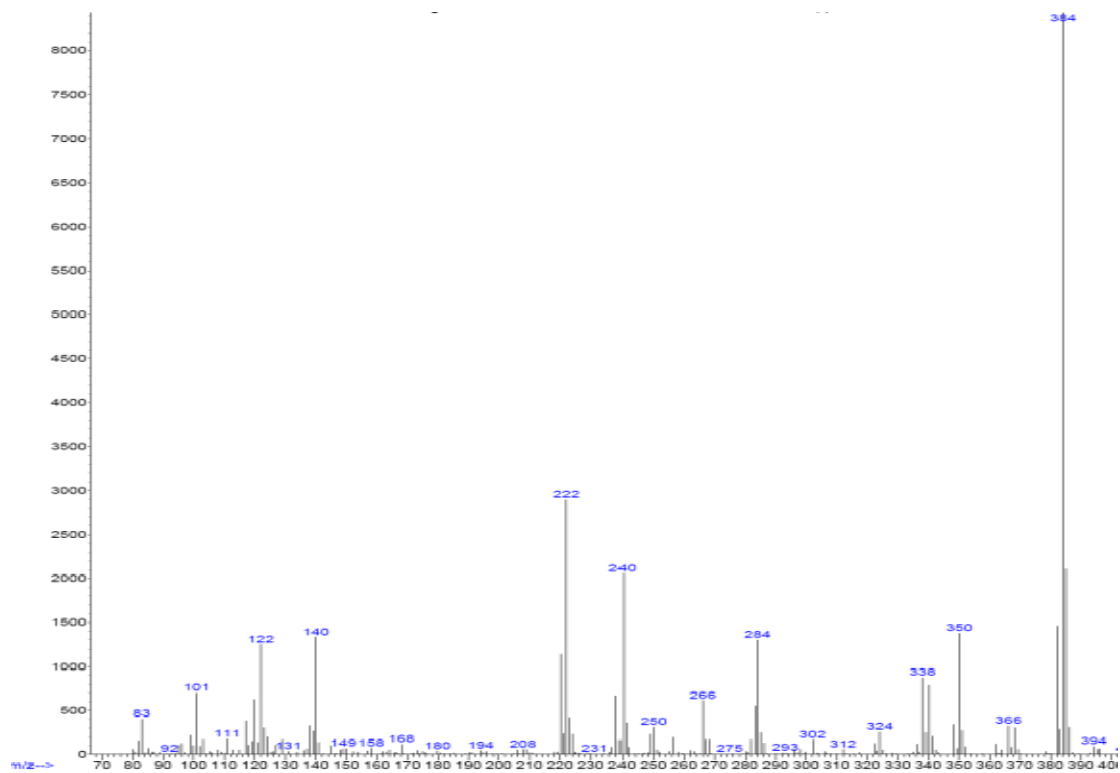
Slika 28. ^{13}C NMR spektar 7-angeloilrinderina

Slika 29. CI MS spektar 7-angeloilrinderina

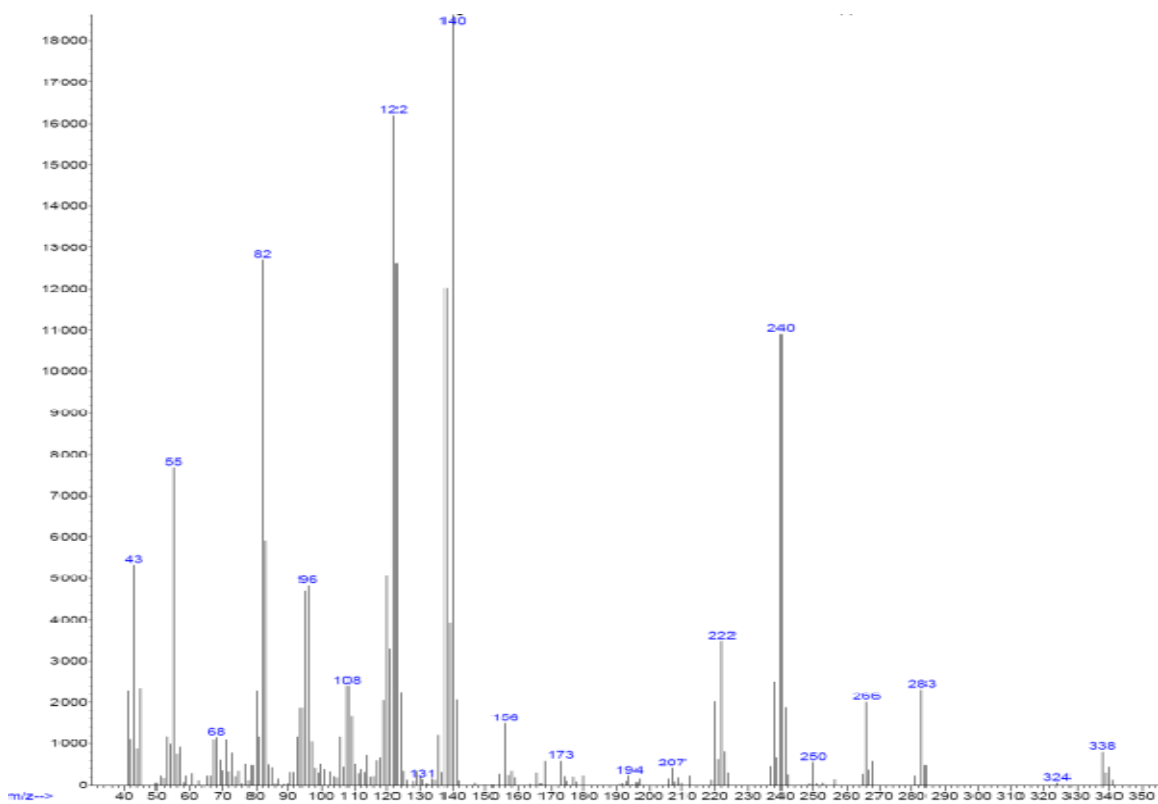


Slika 30. EI MS spektar 7-angeloilrinderina

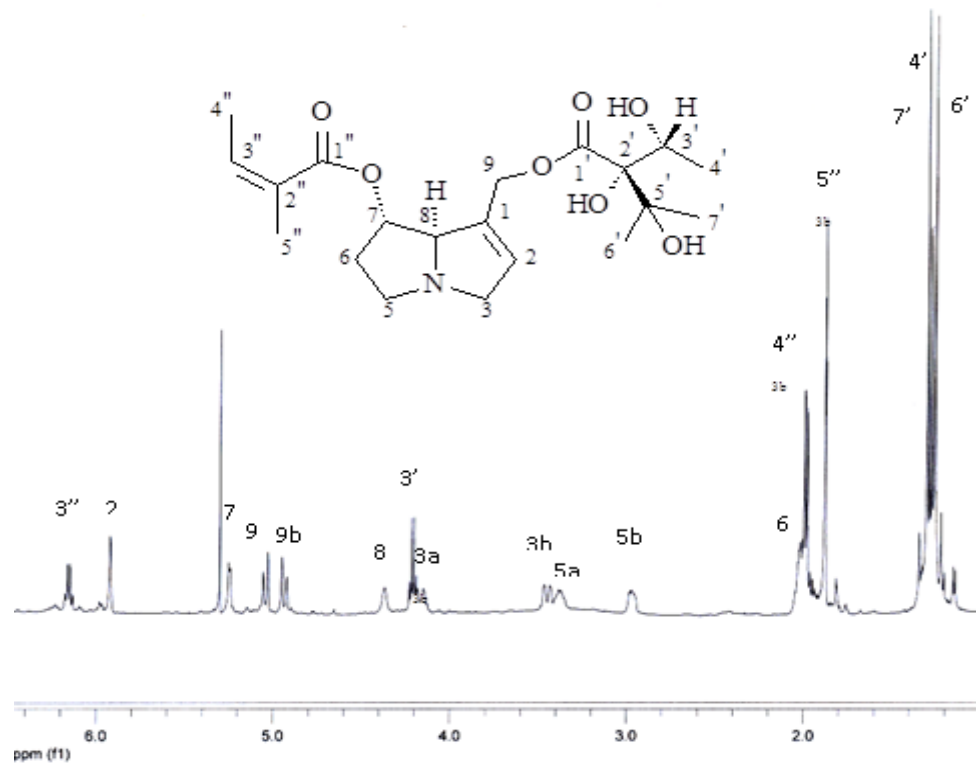
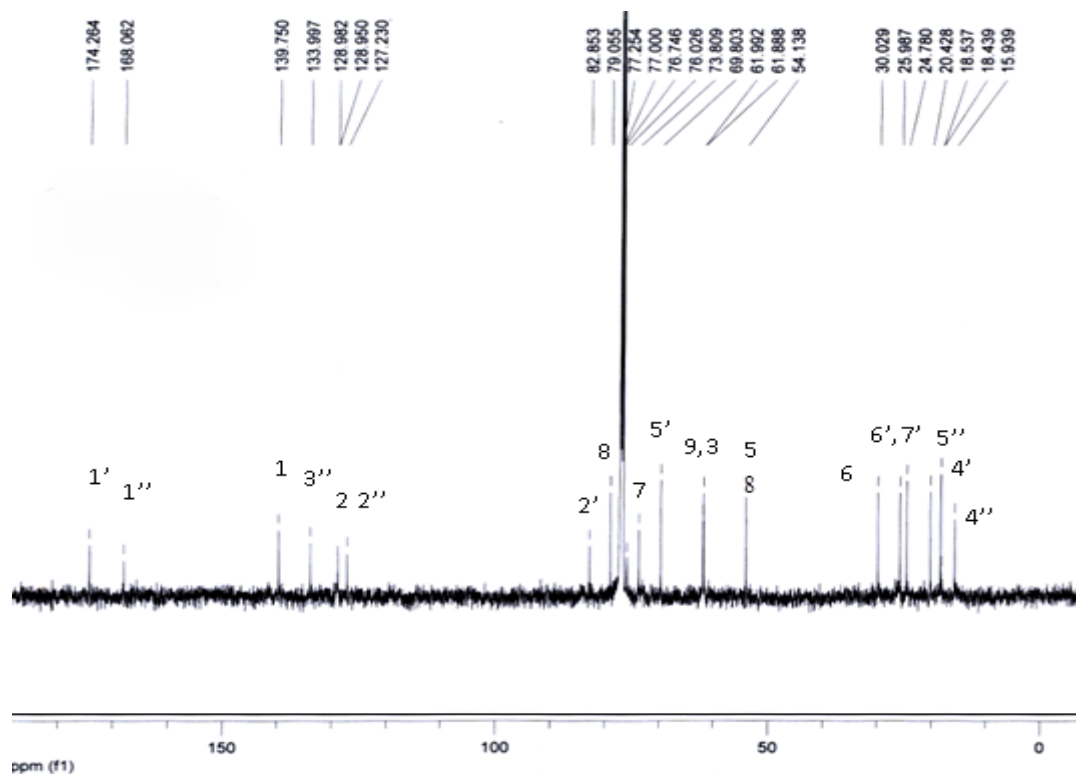
Punktanecin (PA5)Slika 31. ^1H NMR spektar punktanečina

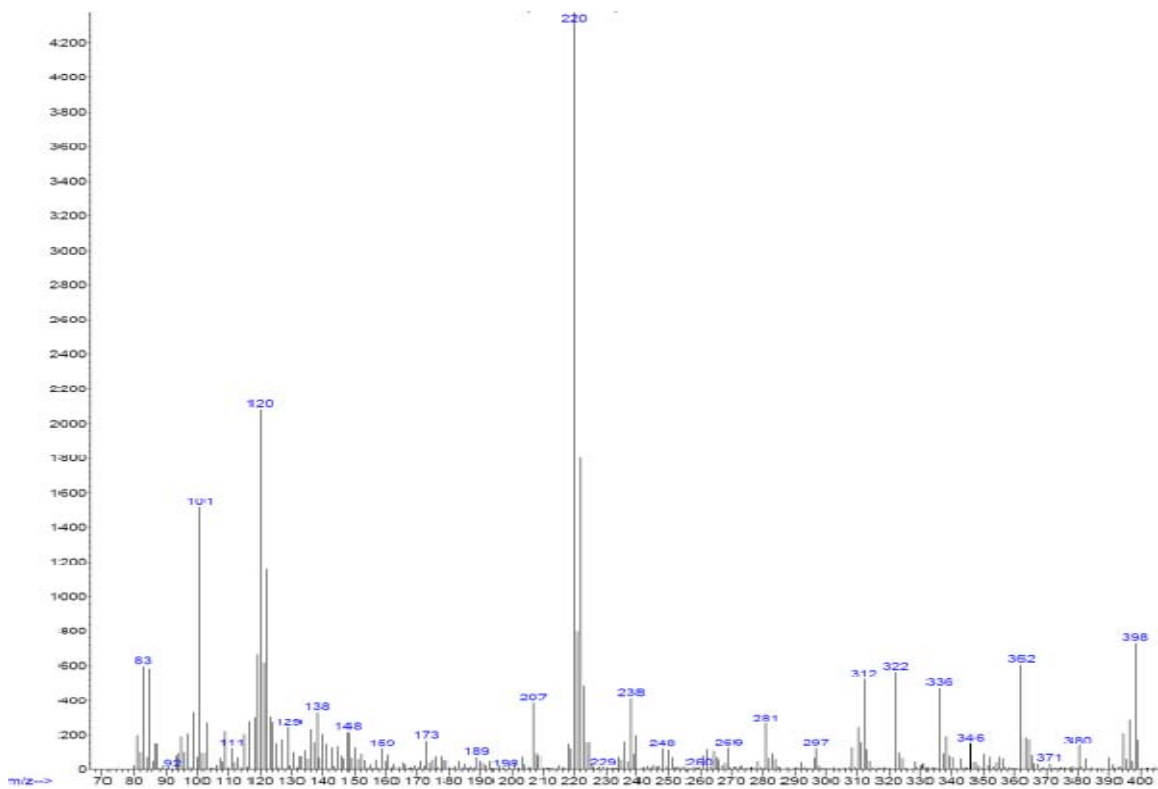


Slika 32. CI MS spektar punktanecina

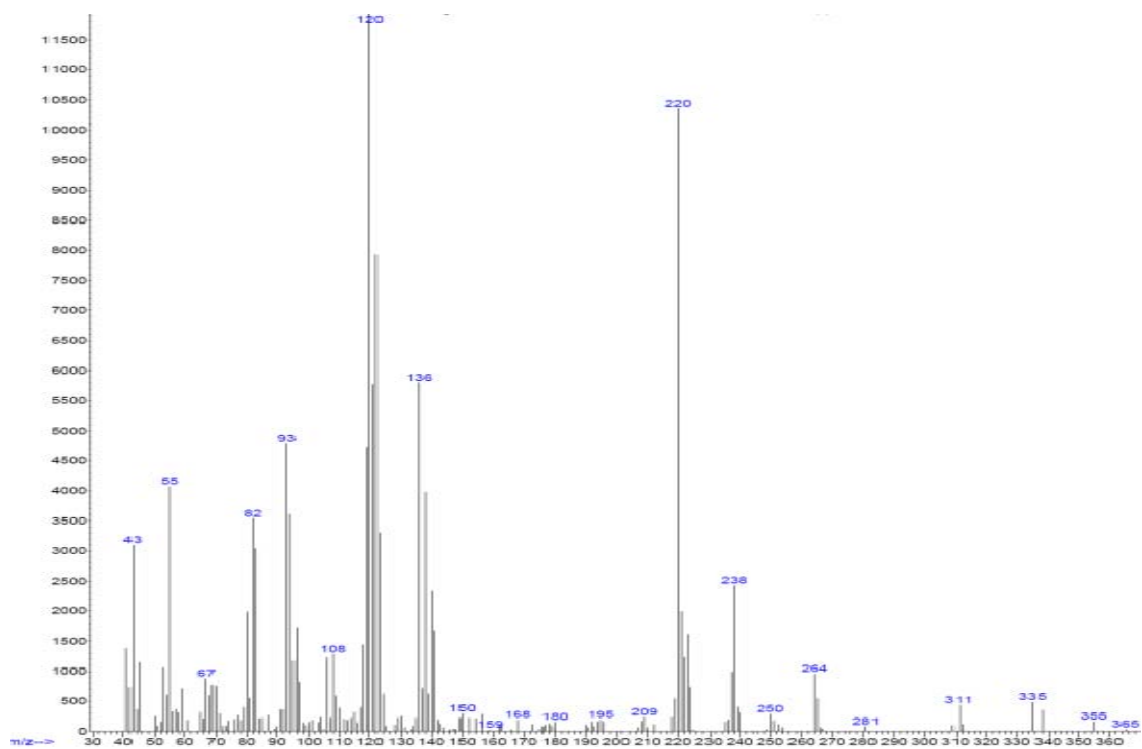


Slika 33. EI MS spektar punktanecina

Heliosupin (PA6)Slika 34. ^1H NMR spektar heliosupinaSlika 35. ^{13}C NMR spektar heliosupina



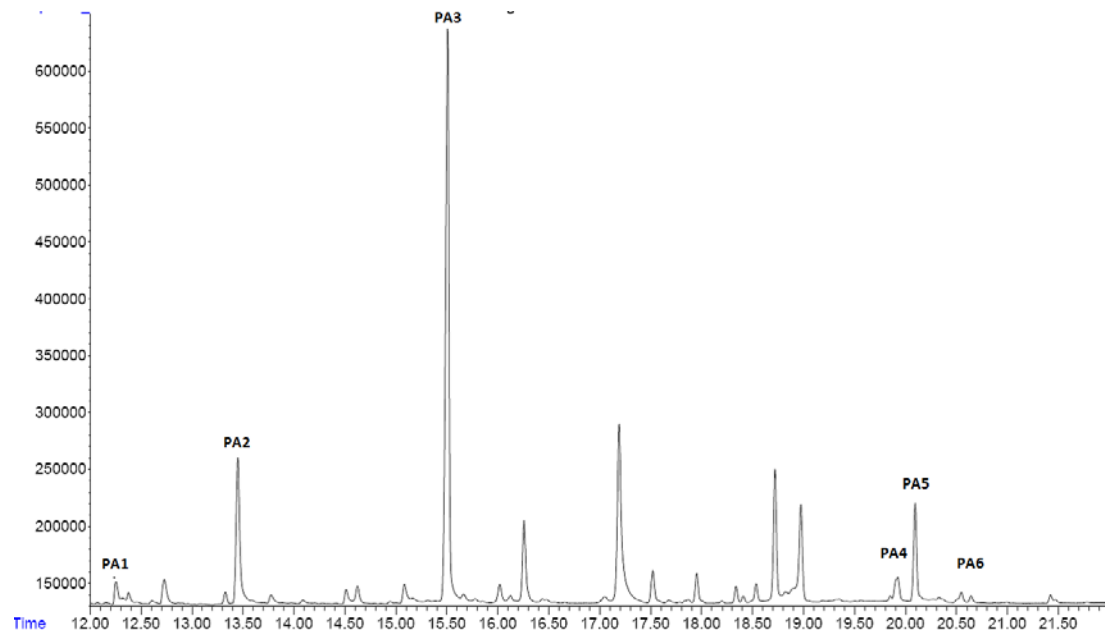
Slika 36. CI MS spektar heliosupina



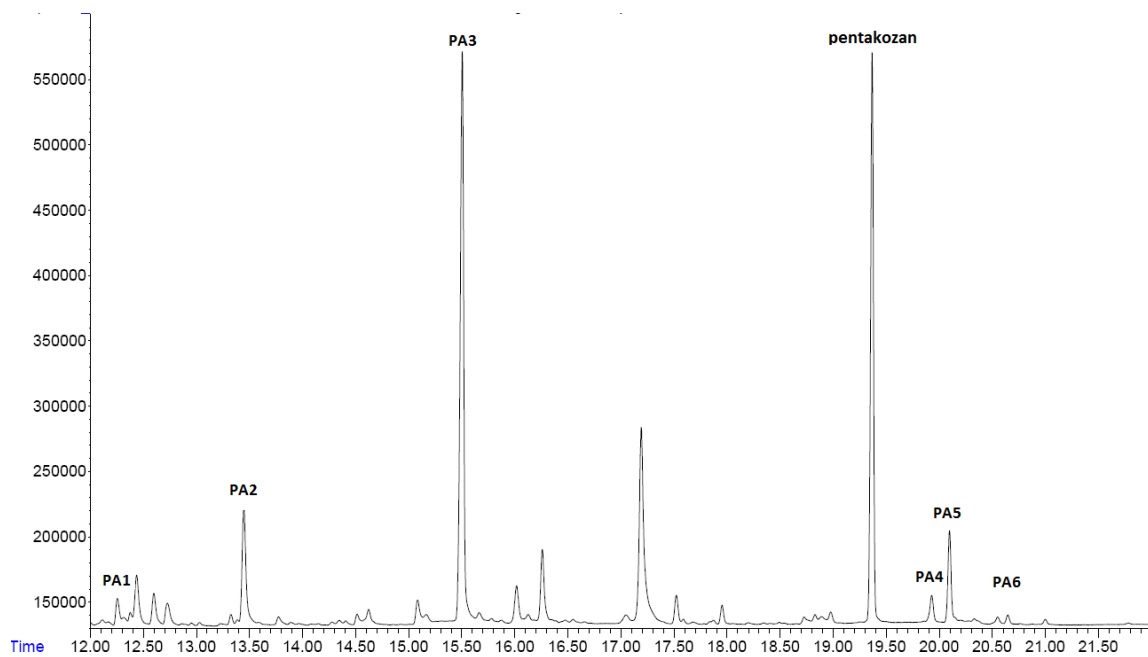
Slika 37. EI MS spektar heliosupina

4.2. Praćenje sadržaja pirolizidinskih alkaloida tokom optimizacije postupka za izolovanje, pomoću GC-MS/FID

Tokom optimizacije postupka za izolovanje i određivanje PA iz biljnog materijala, sadržaj pirolizidinskih alkaloida (okarakterisanih i prikazanih u poglavlju 4.1., **PA1 - PA6**) u izolovanoj i prečišćenoj smeši praćen je pomoću gasnog hromatografa sa masenim i plameno-jonizujućim detektorom. Nakon optimizacije uslova za razdvajanje smeše pirolizidinskih alkaloida gasnom hromatografijom, na osnovu masenih spektara dobivenih hemijskom i elektronskom jonizacijom utvrđeno je koji pikovi u hromatogramu (slika 38) odgovaraju okarakterisanim pirolizidinskim alkaloidima **PA1 - PA6**, a pomoću plameno-jonizujućeg detektora praćen je njihov sadržaj u smeši. Kao inertni standard za određivanje prinosa alkaloida u smešama dobivenim tokom optimizacija korišten je pentakozan (slika 39). U svaku izolovanu i prečišćenu smešu alkaloida dodata je ista zapremina rastvora pentakozana u metilen-hloridu, nakon čega je smeša rastvorena u 1,00 ml metilen-hlorida. Tako dobiven rastvor alkaloida sa pentakozanom analiziran je GC-MS/FID. Prinos pirolizidinskih alkaloida izračunavan je kao odnos površine pika svakog od praćenih alkaloida sa površinom pika pentakozana. Svi eksperimenti optimizacije postupka rađeni su kao tri probe.



Slika 38. Gasni hromatogram smeše pirolizidinskih alkaloida



Slika 39. Gasni hromatogram smeše pirolizidinskih alkaloida sa inertnim standardom pentakozanom

4.3. Optimizacija postupka za izolovanje pirolizidinskih alkaloida

Dobri prinosi za izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, zabeleženi u literaturi, postignuti su kada je primarna ekstrakcija biljke rađena sa metanolom, etanolom i rastvorima sumporne kiseline. Ostali rastvarači (kiselina/metanol, hloroform/metanol, voda) i rastvori kiselina (hlorovodonična i limunska) primenjivani za ekstrakciju biljnog materijala su, ili imali manje prinose, ili su reagovali sa izolovanim alkaloidima i hemijski ih modifikovali. Eksperimentalno je dokazano da su najpogodnije tehnike za izolovanje pirolizidinskih alkaloida: maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera. Ostale tehnike, primenjivane i prikazane u literaturi, su ili značajno skuplje (pa nisu zaživele) ili je dolazilo do termičkog razlaganja alkaloida.

U ovom radu su ispitani i poređeni različiti uslovi i tehnike izolovanja PA iz biljnog materijala:

- Vreme ekstrakcije maceracijom u metanolu,
- Efikasnost ekstrakcija metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline,
- Ekstrakcija sumpornom kiselinom:
 - Uticaj koncentracija i zapremina sumporne kiseline
 - Vreme i tehnike ekstrakcije:
 - Maceracija na sobnoj temperaturi,
 - Ultrazvučna ekstrakcija,
 - Ekstrakcija pomoću rotacionog miksera,
- pH vrednosti alkalne ekstrakcije PA iz vodenog rastvora sa metilen-hloridom,
- Broj ponovljenih ekstrakcija PA metilen-hloridom iz alkalnog rastvora (pH 9).

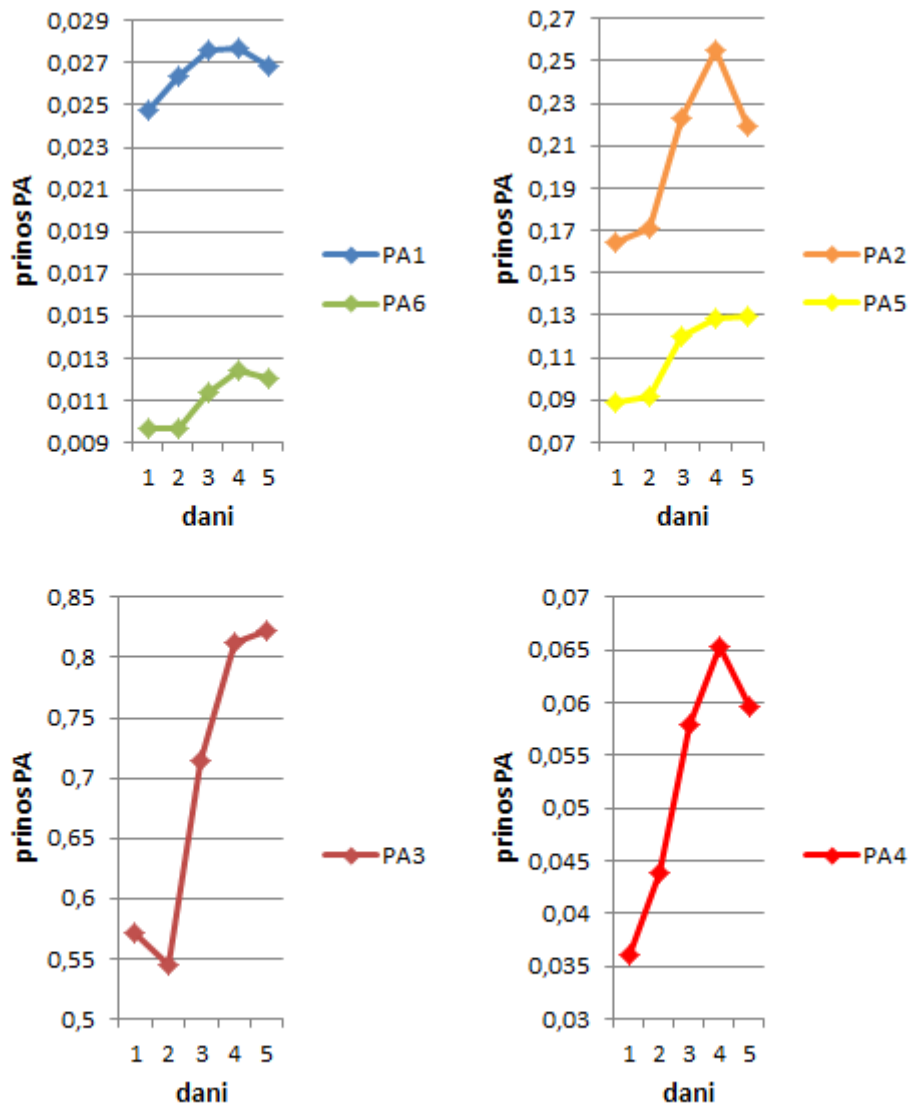
Biljni materijal *R. umbellata* Bunge je osušen na sobnoj temperaturi tokom petnaest dana, nakon čega je usitnjen i homogenizovan blendiranjem. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe, a za svaki eksperiment odmereno je po 1,00 g osušenog, usitnjenog i homogenizovanog biljnog materijala. Ekstrakcije biljke su rađene sa metanolom, etanolom i rastvorima sumporne kiseline, pomoću različitih tehnika ekstrakcije (maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera). Metanolni i etanolni ekstrakti su nakon ceđenja upareni na vakuum uparivaču i rastvoreni u sumpornoj kiselini koncentracije 1 mol/L. Iz kiselih rastvora alkaloida uklonjena su nepolarna jedinjenja ekstrakcijom metilen-hloridom, a zatim su vodeni rastvori alkaloida zaalkalisani amonijakom i PA su ekstrahovani metilen-hloridom. Nakon spajanja u uparavanja metilen-hloridnih ekstrakata dobivena je smeša prečišćenih alkaloida. U smešu pirolizidinskih alkaloida dodat je standardni rastvor pentakozana i prinos alkaloida u različitim eksperimentima je praćen i poređen pomoću GC-MS/FID.

4.3.1. Maceracija u metanolu

Maceracija u metanolu je najčešće primenjivana tehnika za izolovanje PA iz biljnog materijala. Cilj ovog eksperimenta je bio da se utvrdi vreme trajanja maceracije biljke u metanolu koje omogućava dobivanje maksimalnog prinosa svih šest izolovanih alkaloida. Uzorci biljnog materijala su potopljeni u metanolu i ostavljeni na tamnom mestu tokom 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Prinosi PA (**1 – 6**), u zavisnosti od vremena trajanja maceracije, prikazani su na slici 40, a relativne standardne devijacije (RSD) prinosa u tabeli 6.

Za sve pirolizidinske alkaloidne najveći prinosi su dobiveni nakon četiri dana maceracije biljnog materijala u metanolu. Posle prva dva dana maceracije nije bilo značajne razlike u prinosima većine alkaloida. Značajan skok u prinosu za sve PA ostvaren je posle trećeg, a posebno posle četvrtog dana maceracije. Nakon četvrtog dana maceracije prinos alkaloida **PA3** i **PA6** nije se značajno menjao, dok je prinos alkaloida **PA1**, **PA2**, **PA4** i **PA5** blago opadao. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je

da je optimalno vreme za maceraciju biljnog materijala u metanolu, na sobnoj temperaturi, četiri dana.



$$\text{prinos PA} = \text{površina pika PA} / \text{površina pika inertnog standarda}$$

Slika 40. Prinosi pirolizidinskih alkaloida (PA1–PA6) dobiveni maceracijom biljnog materijala u metanolu u toku pet dana na sobnoj temperaturi.

Tabela 6. Relativne standardne devijacije (%) prinosa **PA1-PA6**, praćenih tokom optimizacije vremena maceracije biljnog materijala u metanolu na sobnoj temperaturi. Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

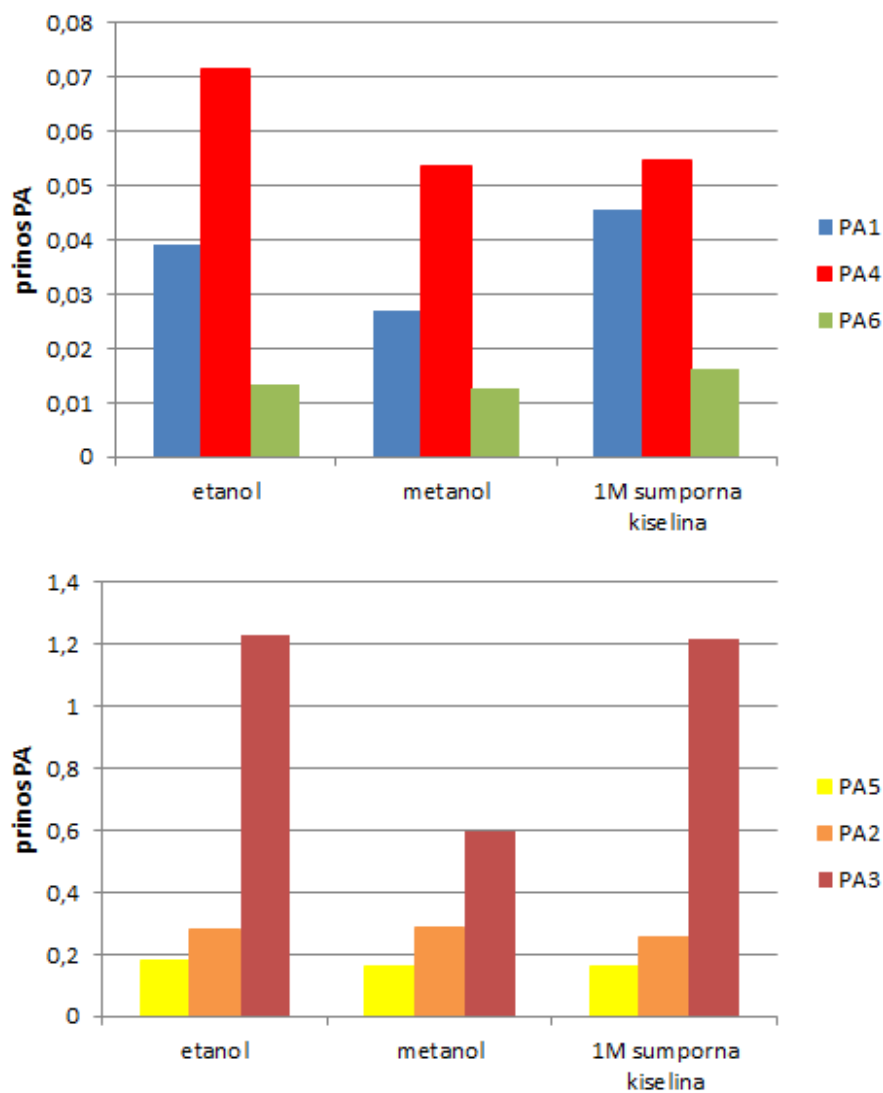
Broj dana maceracije	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
1	11,63	13,74	8,94	9,78	16,79	11,45
2	14,39	16,18	13,62	11,34	14,36	13,78
3	10,12	19,27	11,43	13,89	18,42	14,12
4	9,84	14,73	10,97	8,16	12,66	10,43
5	12,34	12,81	15,43	12,73	13,97	18,67

4.3.2. Efikasnost ekstrakcije pirolizidinskih alkaloida metanolom, etanolom i sumpornom kiselnom

Pored maceracije u metanolu, za ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida primenjivani su etanol⁷⁵ i rastvori sumporne kiseline^{83,89} (najčešće koncentracije 1 mol/L). Cilj ovog eksperimenta je bio da se utvrdi sa kojim od navedenih rastvarača se postiže najveća efikasnost ekstrakcije svih izolovanih pirolizidinskih alkaloida (**PA1-PA6**) iz biljnog materijala. Budući da je utvrđeno optimalno vreme maceracije za metanol (Poglavlje 2.3.1.), uzorci biljnog materijala su potopljeni u metanol, etanol i rastvor sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L tokom četiri dana, na tamnom mestu i na sobnoj temperaturi. Dobiveni prinosi praćenih alkaloida su prikazani na slici 41, a vrednosti relativnih standardnih devijacija u tabeli 7.

Najniži prinosi za svih šest pirolizidinskih alkaloida dobijeni su pri ekstrakciji metanolom. Prinosi alkaloida izolovanih maceracijom etanolom i rastvorom sumporne kiseline (C=1 mol/L) su gotovo jednaki u slučaju **PA2, PA3, PA5 i PA6**. U slučaju **PA1**

najveći prinos je dobiven pri maceraciji sumpornom kiselinom, a za **PA4** sa etanolom. Prednost ekstrakcije alkaloida rastvorom sumporne kiseline u odnosu na ekstrakciju etanolom je manji broj koraka (za dva) u toku postupka izolovanja. Naime, pri ekstrakciji PA iz biljnog materijala etanolom, etanolni ekstrakt nakon ceđenja treba upariti, a zatim suvi ostatak rastvoriti u sumpornoj kiselini.



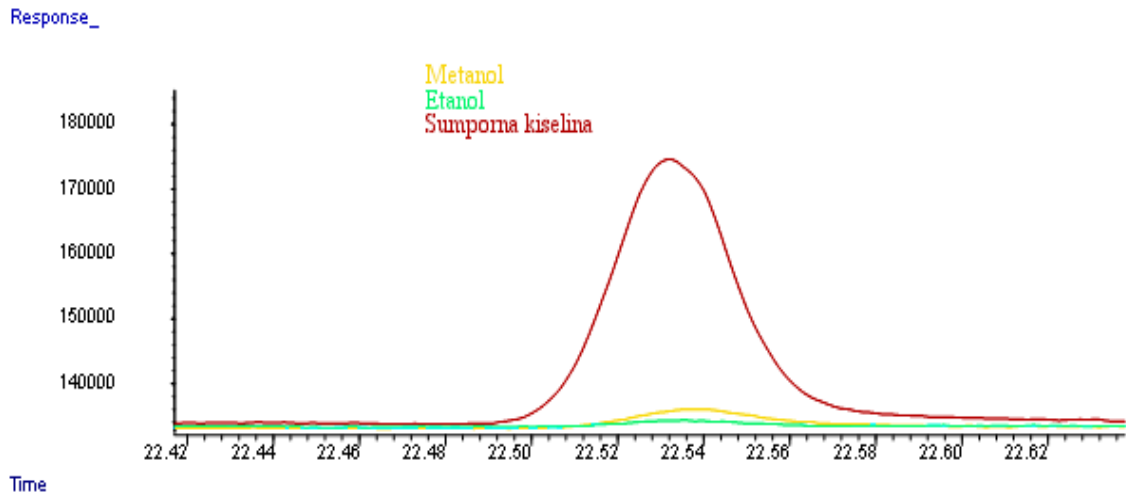
$$\text{prinos PA} = \frac{\text{površina pika PA}}{\text{površina pika inertnog standarda}}$$

Slika 41. Prinosi pirolizidinskih alkaloida (**PA1–PA6**) dobiveni ekstrakcijom iz biljnog materijala metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L, u toku četiri dana na tamnom mestu i na sobnoj temperaturi.

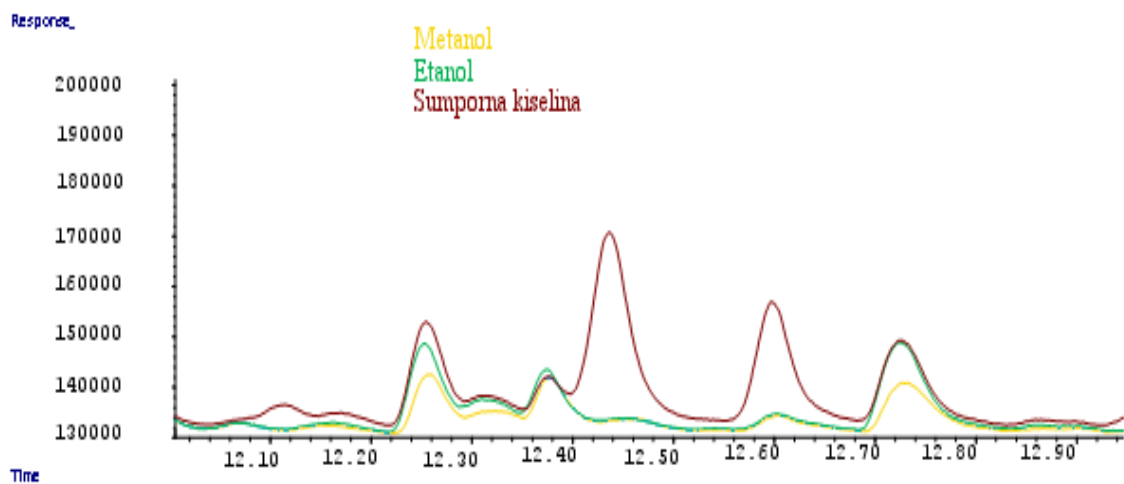
Pored navedenog, utvrđeno je da se pri maceraciji sumpornom kiselinom izoluje veći broj pirolizidinskih alkaloida (Slike 42 i 43) nego maceracijom etanolom i metanolom. Na hromatogramu smeše pirolizidinskih alkaloida koji je dobiven posle maceracije rastvorom sumporne kiseline mogu se videti pikovi alkaloida koji su izostali na hromatogramima smeša alkaloida dobivenih maceracijom metanolom i etanolom. Iako nije utvrđeno o kojim se pirolizidinskim alkaloidama radi, na osnovu masenih spektara potvrđeno je da se radi o ovoj klasi jedinjenja. Na osnovu svih rezultata zaključeno je da je za izolovanje pirolizidinskih alkaloida najefikasnija primarna ekstrakcija biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline.

Tabela 7. Relativne standardne devijacije (%) prinosa **PA1-PA6** dobivene pri ekstrakciji biljnog materijala metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L, u toku četiri dana, na sobnoj temperaturi. Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

Rastvarač	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
Metanol	14,26	11,18	13,27	9,26	13,14	16,27
Etanol	17,96	13,11	14,81	16,71	15,04	11,08
Sumporna kiselina	12,01	9,88	8,76	11,34	14,37	12,42



Slika 42. Uporedni prikaz delova hromatograma smeša PA, dobivenih pri ekstrakciji metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L.



Slika 43. Uporedni prikaz delova hromatograma smeša PA, dobivenih pri ekstrakciji metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L.

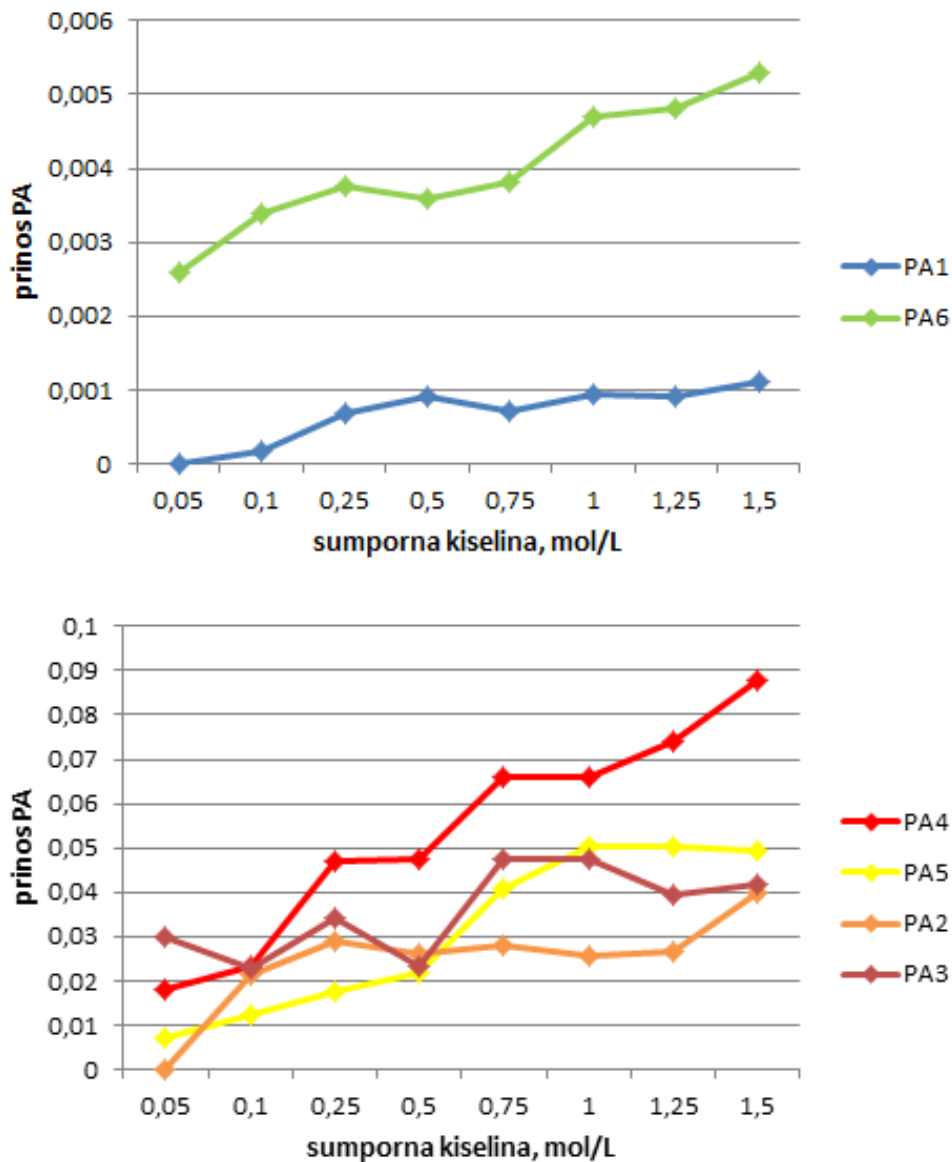
4.3.3. Ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida sumpornom kiselinom

Nakon što je u utvrđeno da je za izolovanje pirolizidinskih alkaloida najefikasnija primarna ekstrakcija biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline, bilo je potrebno optimizovati uslove za primenu ovog rastvora. U tom cilju optimizovana je koncentracija sumporne kiseline i zapremina kiseline u odnosu na masu (1,00 g) suve biljke *R. umbellata*. Pored toga, ispitane su i upoređene različite tehnike ekstrakcije (maceracija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera) i optimizovano je vreme ekstrakcija. Svi eksperimenti su rađeni kao tri probe.

4.3.3.1. Koncentracija rastvora sumporne kiseline

Pirolizidinski alkaloidi su ekstrahovani iz osušenog, usitnjenog i homogemizovanog biljnog materijala maceracijom na sobnoj temperaturi, tokom četiri dana na tamnom mestu, sumpornom kiselinom različitih koncentracija: 0,05 mol/L; 0,1 mol/L; 0,25 mol/L; 0,5 mol/L; 0,75 mol/L; 1 mol/L; 1,25 mol/L i 1,5 mol/L. Prinosi šest praćenih pirolizidinskih alkaloida (**PA1 – PA2**) i relativne standardne devijacije prinosa su prikazani na slici 44 i u tabeli 8.

Sa porastom koncentracije rastvora sumporne kiseline rastu prinosi pirolizidinskih alkaloida. Za većinu praćenih alkaloida maksimalni prinosi su postignuti rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L. Daljim povećanjem koncentracije sumporne kiseline do 1,5 mol/L prinosi alkaloida su različiti: ne menjaju se (**PA1, PA5 i PA6**), rastu (**PA2 i PA4**), i manji su (**PA3**) u odnosu na prinose dobijene kiselinom koncentracije 1 mol/L. Ove razlike mogu biti posledica razlika u strukturi PA. **PA2 i PA4** su nezasićeni disupstituisani necinski alkaloidi, **PA3** je zasićeni monosupstituisani, a **PA1 i PA5** zasićeni disupstituisani necinski alkaloidi. Uzimajući u obzir svih šest pirolizidinskih alkaloida zaključeno je da ekstrakciju biljnog materijala treba raditi sa rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L.



$prinos\ PA = \frac{površina\ pika\ PA}{površina\ pika\ inertnog\ standarda}$

Slika 44. Prinosi pirolizidinskih alkaloida (PA1–PA6) dobiveni primarnom ekstrakcijom biljnog materijala rastvorima sumporne kiseline različitih koncentracija, u toku četiri dana na tamnom mestu i na sobnoj temperaturi.

Tabela 8. Relativne standardne devijacije (%) prinosa **PA1-PA6** dobivene pri maceraciji biljnog materijala rastvorima sumporne kiseline različitih koncentracija, u toku četiri dana, na sobnoj temperaturi. Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

Koncentracija rastvora sumporne kiseline	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
0,05 mol/L	.*	.*	26,73	29,51	14,99	29,25
0,1 mol/L	11,29	26,68	18,03	10,00	22,99	23,13
0,25 mol/L	11,52	21,67	21,56	12,41	5,21	5,55
0,5 mol/L	8,36	17,58	19,35	20,57	11,55	16,08
0,75 mol/L	15,49	3,41	14,74	28,65	22,93	21,88
1 mol/L	10,06	2,83	28,57	19,02	9,06	6,43
1,25 mol/L	11,89	11,17	19,55	12,39	7,83	11,74
1,5 mol/L	16,97	5,42	9,09	25,10	2,39	11,80

* prinosi PA1 i PA2 za conc. 0,05 mol/L su ispod granice kvantifikacije metode

4.3.3.2. *Primena različitih tehnika za ekstrakciju. Vreme trajanja ekstrakcije rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L*

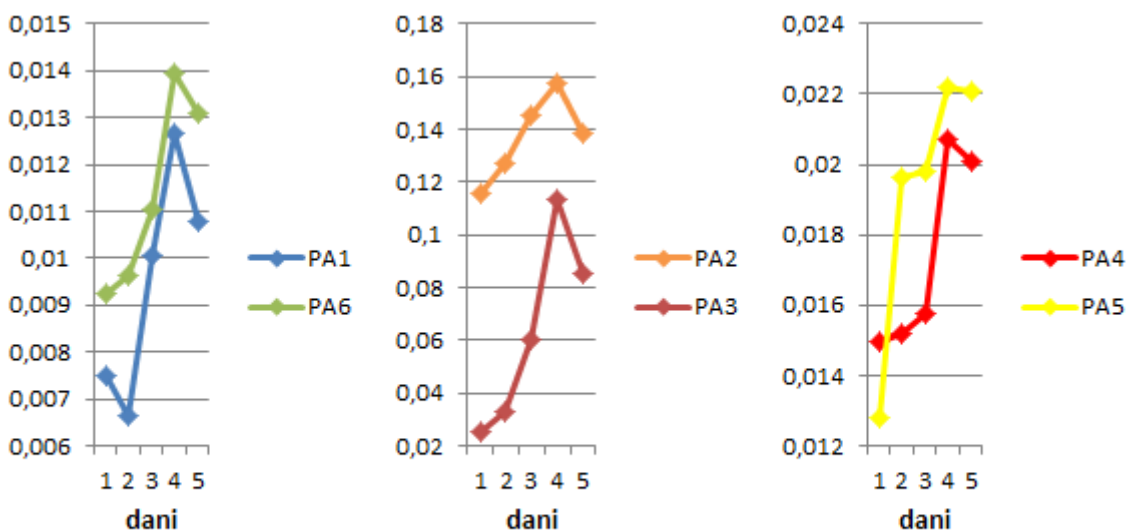
Za ekstrakciju biljnog materijala sumornom kiselinom koncentracije 1 mol/L testirane su i upoređene efikasnosti različitih tehnika ekstrakcije na sobnoj temperaturi: maceracija na tamnom mestu, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću rotacionog miksera. Za svaku od tehnika optimizovano je vreme trajanja ekstrakcije.

4.3.3.2.1. *Maceracija biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L*

Osušeni, usitnjeni i homogenizovani uzorci biljke potopljeni su u sumpornoj kiselini (C=1 mol/L) i ostavljeni na tamnom mestu tokom: 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Cilj eksperimenta je bio da se utvrdi optimalno vreme maceracije u rastvoru sumporne

kiseline. Prinosi alkaloida (**PA1-PA6**) prikazani su na slici 45, a relativne standardne devijacije prinosa u tabeli 9.

Tokom četiri dana maceracije biljnog materijala prinosi alkaloida su rasli sa vremenom trajanja maceracije. Za svih šest okarakterisanih pirolizidinskih alkaloida maksimalni prinosi su postignuti posle četvrtog dana. Posle petog dana maceracije došlo je do smanjenja prinosa, pa je zaključeno da maceracija biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$) u toku četiri dana predstavlja optimalno vreme maceracije.



prinos PA = površina pika PA/površina pika inertnog standarda

Slika 45. Prinosi pirolizidinskih alkaloida (**PA1-PA6**) dobiveni u zavisnosti od vremena trajanja maceracije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$), na tamnom mestu.

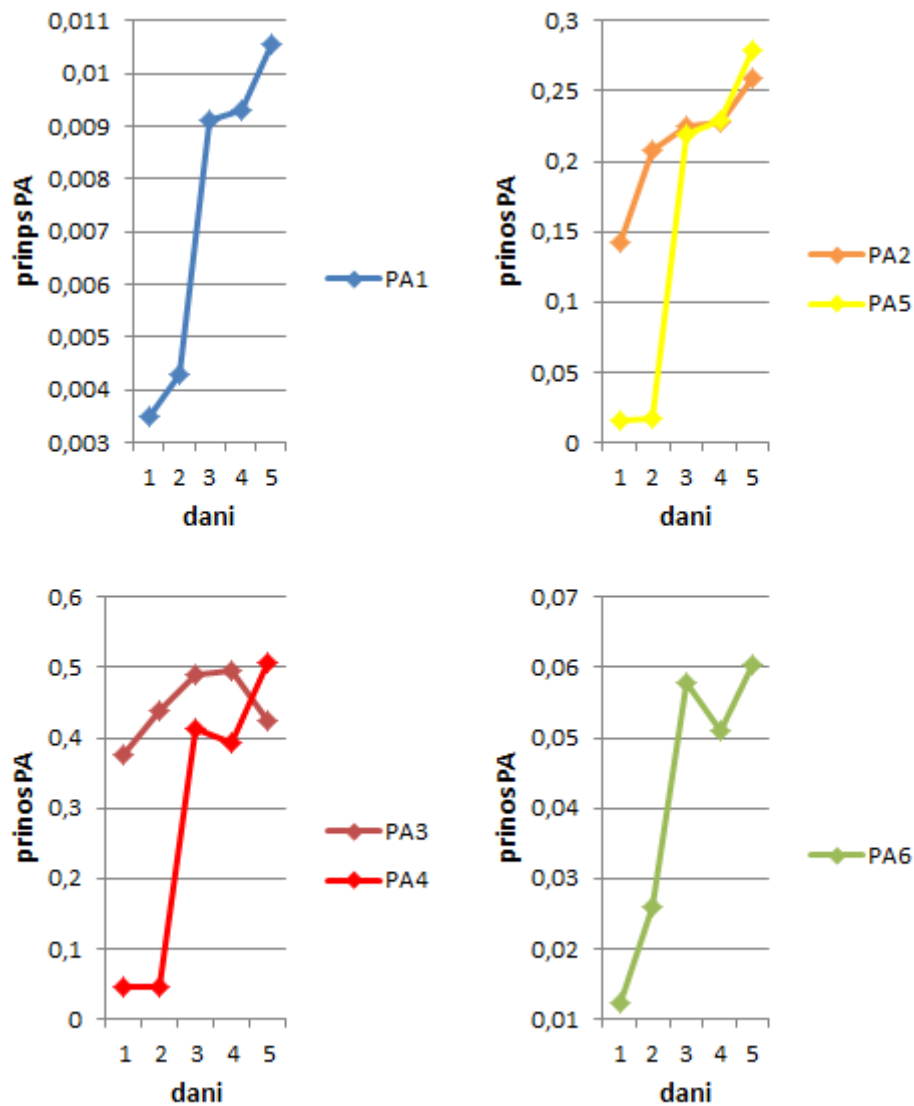
Tabela 9. Relativne standardne devijacije (%) prinosa **PA1-PA6**, dobivene tokom optimizacije vremena trajanja maceracije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline (C=1 mol/L). Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

Vreme trajanja maceracije (dani)	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
1	18,32	12,08	6,77	11,23	16,43	13,42
2	12,41	14,45	11,01	13,07	19,01	10,17
3	10,02	9,76	9,43	9,41	14,43	12,36
4	8,11	13,01	10,08	10,10	12,01	10,88
5	9,67	10,12	14,20	11,63	10,76	16,72

4.3.3.2.2. *Ultrazvučna ekstrakcija biljnog materijala*

U literaturi je zabeleženo da prinos alkaloida pri ekstrakciji biljnog materijala na ultrazvučnom kupatilu može da raste, ali i da opada sa vremenom trajanja^{74,96}. Zato je cilj ovog eksperimenta bio da se utvrdi optimalno vreme ekstrakcije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline (C=1 mol/L) na ultrazvučnom kupatilu, na osnovu prinosa svih šest praćenih alkaloida u ekstrahovanoj smeši. Biljni materijal je ekstrahovan u trajanju od 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Ultrazvučno kupatilo je tokom svakog dana bilo uključeno deset sati. Prinosi alkaloida u zavisnosti od vremena trajanja ekstrakcija prikazani su na slici 46, a relativne standardne devijacije prinosa u tabeli 10.

Najveći porast u prinosu svih šest praćenih alkaloida (**PA1-PA6**) dobijen je posle tri dana ekstrakcije biljnog materijala na ultrazvučnom kupatilu. Prinosi dobijeni posle četiri, odnosno pet dana ekstrakcije nisu se značajno promenili u odnosu na prinose postignute nakon trećeg dana. Dakle, optimalno vreme za ultrazvučnu ekstrakciju biljnog materijala sa rastvorom sumporne kiseline (C=1 mol/L) iznosi tri dana.



prinos PA = površina pika PA/površina pika inertnog standarda

Slika 46. Prinosi pirolizidinskih alkaloida (PA1–PA6) dobiveni u zavisnosti od vremena trajanja ultrazvučne ekstrakcije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline (C=1 mol/L).

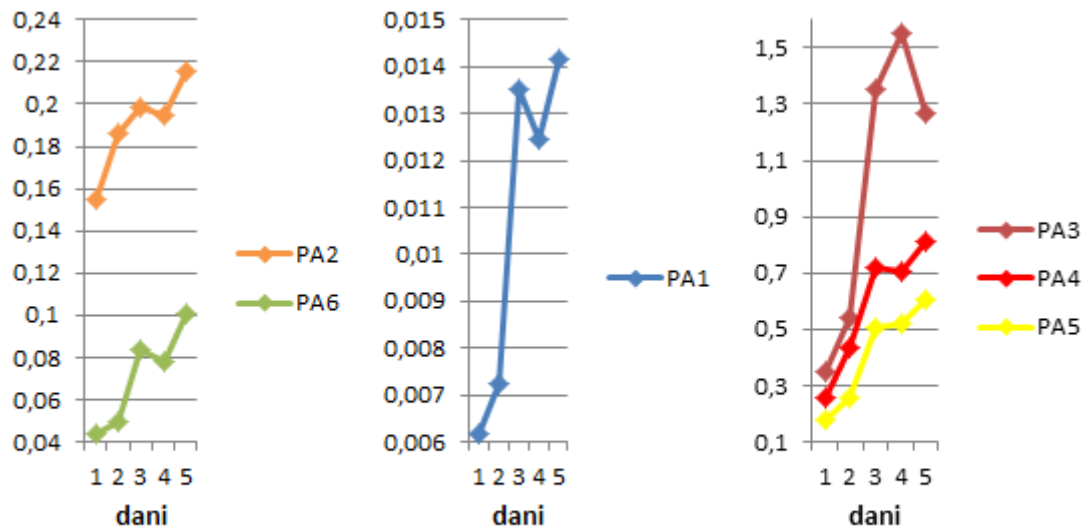
Tabela 10. Relativne standardne devijacije (%) prinosa **PA1-PA6**, dobivene tokom optimizacije vremena trajanja ultrazvučne ekstrakcije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline ($C=1$ mol/L). Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

Vreme trajanja ekstrakcije (dani)	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
1	17,39	29,57	23,37	25,07	22,67	25,07
2	28,24	20,21	21,09	21,27	10,84	28,47
3	29,66	29,91	11,20	25,76	14,72	29,75
4	27,77	17,89	12,49	29,23	24,11	10,75
5	26,90	18,32	4,27	15,94	19,31	28,95

4.3.3.2.3. Ekstrakcija biljnog materijala pomoću rotacionog miksera

Ekstrakcije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline ($C=1$ mol/L) rađene su pomoću rotacionog miksera u toku 1, 2, 3, 4 i 5 dana. Dobijeni rezultati za svaki od šest praćenih alkaloida prikazani su na slici 47 i u tabeli 11.

Promene prinosa PA sa vremenom trajanje ekstrakcije imale su sličan trend kao promene dobijene pri ultrazvučnoj ekstrakciji. Izraziti porast prinosa (za oko dva puta) dobiven je za svih šest alkaloida posle trećeg dana ekstrakcije biljnog materijala u odnosu na prinose dobivene prvog i drugog dana. Trajanje ekstrakcije četiri, odnosno pet dana nije dovelo do značajnih promena u prinosima svih praćenih pirolizidinskih alkaloida u odnosu na tri dana ekstrakcije. Stoga je zaključeno da je optimalno vreme za ekstrakciju biljnog materijala u sumpornoj kiselini ($C=1$ mol/L) pomoću rotacionog miksera tri dana.



$$\text{prinos PA} = \text{površina pika PA} / \text{površina pika inertnog standarda}$$

Slika 47. Prinosi pirolizidinskih alkaloida (PA1–PA6) dobiveni u zavisnosti od vremena trajanja ekstrakcije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline (C=1 mol/L) pomoću rotacionog miksera.

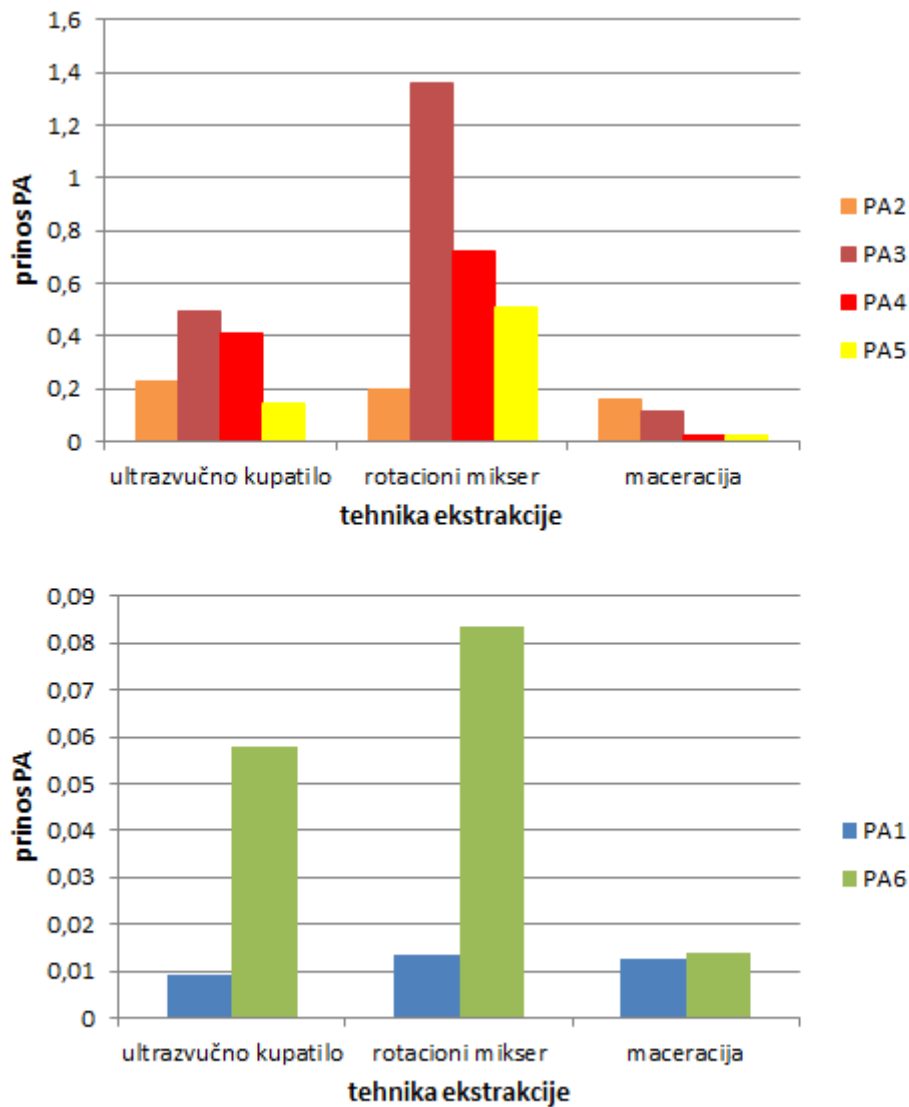
Tabela 11. Relativne standardne devijacije (%) prinosa praćenih PA, dobivene pri optimizaciji vremena trajanja ekstrakcije biljnog materijala u rastvoru sumporne kiseline (C=1mol/L) pomoću rotacionog miksera. Eksperimenti su rađeni u tri probe.

Vreme trajanja ekstrakcije (dani)	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
1	24,64	6,82	24,82	7,96	11,18	29,49
2	0,81	22,36	17,56	4,95	26,83	21,11
3	21,61	3,97	13,76	14,71	19,57	24,49
4	22,64	13,63	8,09	3,09	1,61	26,79
5	19,12	16,30	4,06	19,88	23,46	25,53

4.3.3.2.4. Poređenje efikasnosti različitih tehnika ekstrakcije

Optimizacija vremena trajanja ekstrakcije biljnog materijala u sumpornoj kiselini koncentracije 1 mol/L pomoću različitih tehnika imala je za cilj postizanje maksimalnih prinosa izolovanih i okarakterisanih pirolizidinskih alkaloida (PA1-PA6) iz *R. umbellata*. Utvrđeno je da je optimalno vreme maceracije biljnog materijala u sumpornoj kiselini četiri dana, a optimalno vreme ekstrakcije ultrazvukom i pomoću rotacionog miksera tri dana. U cilju sagledavanja koja od primenjenih tehnika je najefikasnija poređeni su prinosi svih šest pirolizidinskih alkaloida dobiveni pri ekstrakciji u vremenu koje je bilo optimalno za svaku tehniku (Slika 48).

Za pet od šest praćenih pirolizidinskih alkaloida (**PA1, PA3, PA4, PA5 i PA6**) najveći prinosi su postignuti pri ekstrakciji biljnog materijala pomoću rotacionog miksera u toku tri dana i oni su bili za 1,5 do 3 puta veći u odnosu na prinose dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom, odnosno 3 do 20 puta veći u odnosu na maceraciju biljnog materijala. Prinosi **PA2** postignuti primenom sve tri tehnike ekstrakcije nisu se značajno razlikovali. Efikasnost tehnika primenjenih za ekstrakciju PA, u odnosu na dobivne prinose alkaloida, opada u nizu: ekstrakcija pomoću rotacionog miksera > ultrazvučna ekstrakcija > maceracija. Dakle, ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala u sumpornoj kiselini (C=1 mol/L) je najefikasnija kada se ekstrakcija radi pomoću rotacionog miksera tokom tri dana.



prinos PA = površina pika PA/površina pika inertnog standarda

Slika 48. Poređenje prinosa pirolizidinskih alkaloida (PA1–PA6) dobivenih nakon tri dana ekstrakcije na ultrazvučnom kupatilu, tri dana ekstrakcije pomoću rotacionog miksera i četiri dana maceracije biljnog materijala u sumpornoj kiselini (C=1 mol/L).

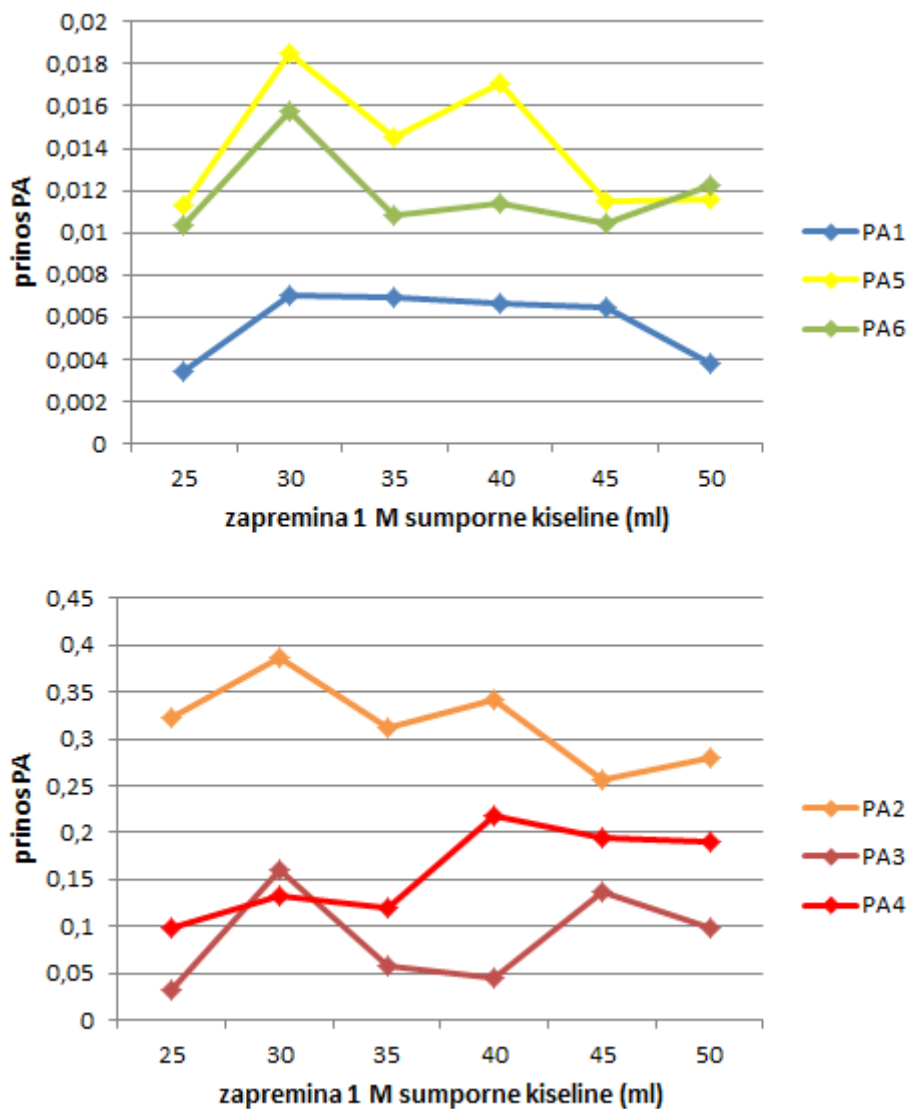
4.3.3.3. Zapremina rastvora sumporne kiseline

Nakon što je utvrđena optimalna koncentracija sumporne kiseline ($C=1$ mol/L), vreme (tri sata) i tehnika ekstrakcije pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, određena je i optimalna zapremina rastvora kiseline u odnosu na masu uzorka biljke. Odmereni uzorci suve, usitnjene i homogenizovane biljke, mase 1,00 g, su ekstrahovani pomoću rotacionog miksera tokom tri dana sa različitim zapreminama sumporne kiseline ($C=1$ mol/L): 25 ml, 30 ml, 35 ml, 40 ml, 45 ml i 50 ml. Zavisnost prinosa od upotrebene zapremine sumporne kiseline za svaki od šest alkaloida, i vrednosti relativnih standardnih devijacija, dobijenih za eksperimente rađene kao tri probe, prikazani su na slici 49 i u tabeli 12.

Najveći prinosi za pet od šest praćenih pirolizidinskih alkaloida (**PA1**, **PA2**, **PA3**, **PA5** i **PA6**) su dobijeni pri ekstrakciji 1,00 g biljnog materijala sa 30 ml 1 M sumporne kiseline. Sa povećanjem zapremine kiseline prinosi ovih pet alkaloida su opadali. Za **PA4** najveći prinos je dobiven pri ekstrakciji 1,00 g biljke sa 40 ml kiseline. Na onovu navedenog zaključeno je da optimalna zapremina sumporne kiseline ($C=1$ mol/L), neophodna za ekstrakciju 1,00 g suvog biljnog materijala, iznosi 30 ml.

Tabela 12. Vrednosti relativnih standardnih devijacija (%) prinosa praćenih PA, koje su dobivene pri optimizaciji zapremine rastvora sumporne kiseline ($C=1$ mol/L), neophodne za ekstrakciju 1,0 g suvog biljnog materijala pomoću rotacionog miksera. Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

Zapremina rastvora sumporne kiseline ($C=1$ mol/L)	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
25 ml	18,94	29,60	16,06	20,10	27,42	9,22
30 ml	15,88	20,86	13,78	15,08	29,84	20,58
35 ml	16,44	9,22	15,49	3,47	29,80	23,34
40 ml	13,14	22,65	17,64	5,25	2,78	26,62
45 ml	19,76	21,67	17,20	20,94	12,28	14,59
50 ml	11,54	6,57	24,50	2,05	25,80	17,43



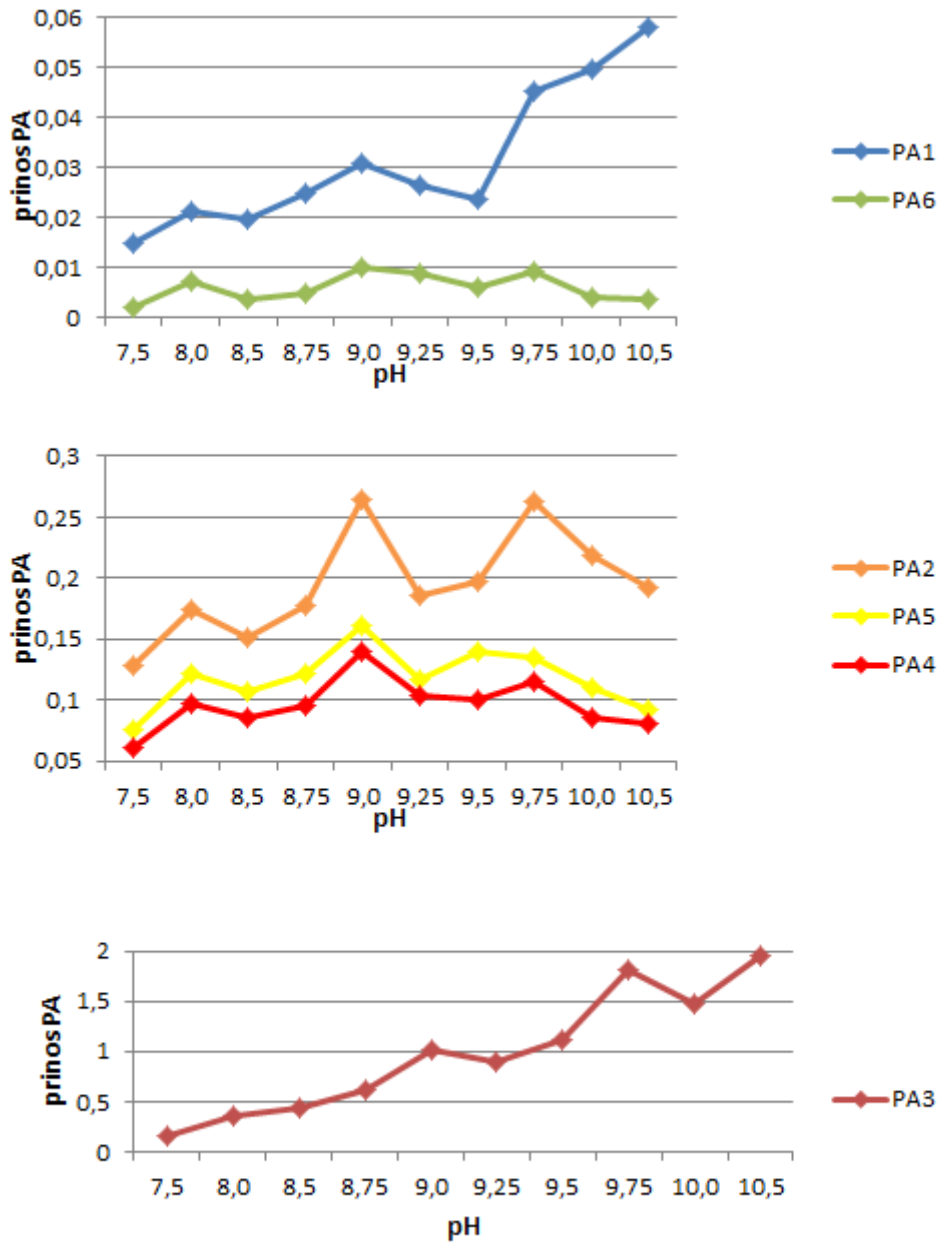
$prinos\ PA = \frac{površina\ pika\ PA}{površina\ pika\ inertnog\ standarda}$

Slika 49. Zavisnost prinosa PA1–PA6 od zapremine rastvora sumporne kiseline ($C=1\ mol/L$), koja je primenjivana za ekstrakciju 1,00 g suvog biljnog materijala pomoću rotacionog miksera, u periodu od tri dana.

4.3.4. Ekstrakcija alkaloida iz alkalnog rastvora metilen-hloridom

Nakon ekstrakcije biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline ($C=1$ mol/L) (pomoću rotacionog miksera), rastvor alkaloida se ceđenjem odvaja od biljnog ostatka. U kiselom rastvoru pirolizidinski alkaloidi su protonovani, odnosno nalaze se u obliku soli i stoga su lako rastvorni u vodi. U sledećem koraku se kiselu rastvor ekstrahuje metilen-hloridom, što omogućava da se iz rastvora uklone jedinjenja koja su nepolarnija od alkaloida. U prečišćeni kiselu rastvor alkaloida dalje se dodaje rastvor amonijum-hidroksida do alkalne reakcije rastvora. Pirolizidinski alkaloidi se u alkalnoj sredini nalaze u deprotonovanom obliku i stoga se mogu ekstrahovati metilen-hloridom. Cilj ovog eksperimenta je optimizacija pH vrednosti alkalnog rastvora pri kome bi se postigao maksimalan prinos izolovanih pirolizidinskih alkaloida. Stoga je ekstrakcija pirolizidinskih alkaloida metilen-hloridom izvođena pri različitim pH vrednostima rastvora: 7,50; 8,00; 8,50; 8,75; 9,00; 9,25; 9,50; 9,75; 10,00 i 10,50. Zavisnost prinosa svakog od šest okarakterisanih alkaloida od pH vrednosti alkalnog rastvora prikazane su na slici 50, a relativne standardne devijacije prinosa u tabeli 13.

Za alkaloidne **PA2**, **PA4**, **PA5** i **PA6** najveći prinosi su dobiveni kada su oni ekstrahovani iz rastvora čiji je pH bio 9. Sa porastom pH vrednosti rastvora prinosi ovih alkaloida su se smanjivali. Prinosi alkaloida **PA1** i **PA3** su bili dvostruko veći kada su ekstrahovani iz rastvora čiji je pH bio 10,5 u odnosu na rastvor čiji je pH 9. Zbog strukturnih razlika pirolizidinskih alkaloida ovaj korak u izolovanju po potrebi može biti prilagođen strukturnom tipu pirolizidinskih alkaloida. Takođe je moguće da se ekstrakcije metilen-hloridom rade iz rastvora na dve pH vrednosti ili da se alkaloidi ekstrahuju iz rastvora podešenog na jednu pH vrednost, ali sa većim brojem ponovljenih ekstrakcija metilen-hloridom, sve do negativne reakcije na alkaloidne sa Dragendorff-ovim reagensom. Budući da je za većinu analiziranih alkaloida maksimalan prinos dobijen iz rastvora čiji je pH 9, ova vrednost je uzeta kao optimalna.



$$\text{prinos PA} = \frac{\text{površina pika PA}}{\text{površina pika inertnog standarda}}$$

Slika 50. Zavisnost prinosa svakog od šest okarakterisanih PA od pH vrednosti alkalnog rastvora iz koga se alkaloidi ekstrahuju metilen-hloridom.

Tabela 13. Relativne standardne devijacije (%) prinosa PA dobivenih tokom optimizacije pH vrednosti rastvora za ekstrakciju metilen-hloridom. Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

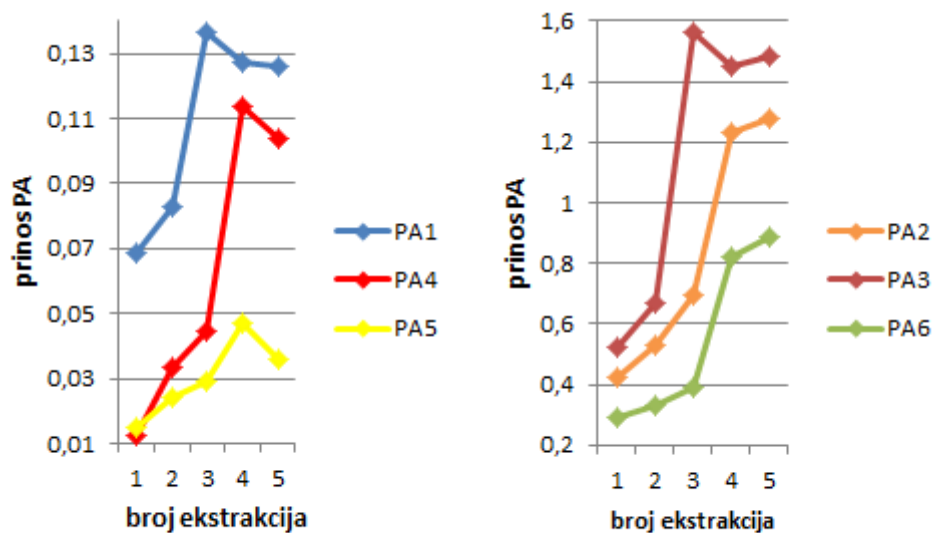
pH vrednost	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
7,50	14,31	18,23	8,76	13,44	11,58	11,66
8,00	15,12	14,33	12,99	11,81	8,77	24,31
8,50	11,43	17,26	9,88	9,82	13,22	12,88
8,75	8,76	12,33	17,47	10,13	16,47	7,46
9,00	11,88	21,14	11,68	13,14	14,57	11,83
9,25	20,01	19,76	6,46	8,77	9,11	14,76
9,50	13,44	13,13	12,77	19,26	11,08	21,13
9,75	7,99	28,31	19,16	24,01	8,51	14,03
10,00	11,48	10,17	21,44	17,37	18,34	17,19
10,50	6,43	15,34	18,93	19,77	16,27	11,18

4.3.5. Broj ponovljenih ekstrakcija alkaloida iz alkalnog rastvora sa metilen-hloridom

Pirolizidinski alkaloidi se iz baznog rastvora najčešće ekstrahuju metilen-hloridom sve do negativne reakcije na alkaloidne sa Dragendorff-ovim reagensom. U ovom eksperimentu ispitana je zavisnost prinosa pirolizidinskih alkaloida ekstrahovanih iz alkalnog rastvora (pH 9) od broja ponovljenih ekstrakcija sa porcijama od 30 ml metilen-hlorida. Ekstrakcije metilen-hloridom su rađene: 1, 2, 3, 4 i 5 puta. Prinosi svakog od šest praćenih alkaloida u zavisnosti od broja reekstrakcija prikazani su na slici 51, a relativne standardne devijacije prinosa u tabeli 14.

Za alkaloidne **PA1** i **PA3** maksimalni prinosi postignuti su sa tri uzastopne ekstrakcije sa po 30 ml metilen-hlorida, a za **PA4** i **PA5** sa četiri ekstrakcije. U slučaju **PA2** i **PA6** prinosi postignuti nakon pet reekstrakcija su veći u odnosu na četiri, ali razlika nije značajna. Zato je zaključeno da je optimalni broj ponovljenih ekstrakcija

pirolizidinskih alkaloida iz alkalnog rastvora (pH 9), sa porcijama od po 30 ml metilen-hlorida, četiri.



$$\text{prinos PA} = \text{površina pika PA} / \text{površina pika inertnog standarda}$$

Slika 51. Prinosi PA-PA6 u zavisnosti od broja ekstrakcija metilen-hloridom, iz alkalnog rastvora (pH 9).

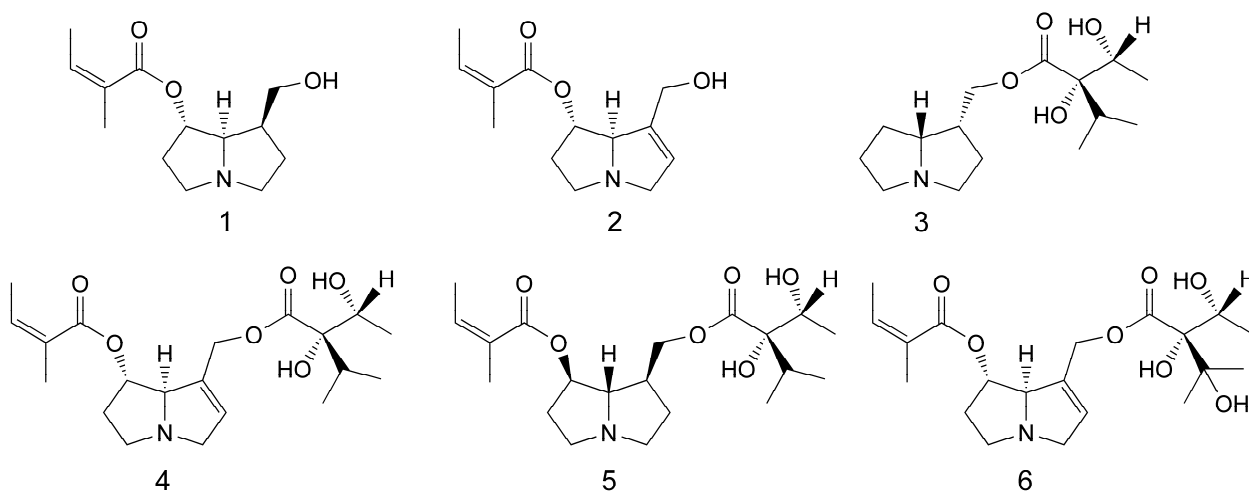
Tabela 14. Vrednosti RSD (%) za prinose PA, koji su dobiveni pri optimizaciji broja uzastopnih ekstrakcija metilen-hloridom iz alkalnih rastvora na pH 9. Eksperimenti su rađeni kao tri probe.

Broj ekstrakcija metilen-hloridom	RSD (%)					
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6
1	8,08	12,42	24,18	15,20	13,36	25,37
2	4,01	38,27	16,75	22,53	23,83	10,80
3	8,35	4,68	9,41	29,66	14,41	12,35
4	18,75	20,74	29,74	26,48	29,48	16,45
5	17,19	9,68	17,82	21,37	19,61	16,22

5.ZAKLJUČAK

Do sad su opisani brojni postupci za izolovanje i prečišćavanje pirolizidinskih alkaloida, ali zbog raznolikosti njihovih struktura i hemijskih svojstava, ni jedan od njih nije našao široku primenu u praksi. Stoga jer cilj ove doktorske teze bila optimizacija svih faza postupka za izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljnog materijala, koji omogućava da se ova jedinjenja sa značajnim strukturnim razlikama izoluju sa maksimalnim prinosom, što je veoma značajno za određivanje često veoma toksičnih PA nekom od instrumentalnih metoda, kao i za izolovanje PA u cilju određivanja njihove strukture i biološke aktivnosti. Kao model-sistem upotrebljena je biljna vrsta *R. umbellata* Bunge. Pored toga, cilj teze je i izolovanje pojedinačnih alkaloida iz pomenute biljne vrste, njihova karakterizacija, odnosno određivanje struktura.

U cilju praćena prinosa PA tokom optimizacije postupka izolovanja utvrđen je pirolizidinski sastav *R. umbellata* Bunge i izolovano je šest PA (7-angeloilheliotridan, 7-angeloilheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktancin i heliosupin, **1 – 6**, redom), čije su strukture određene NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom:



Različiti uslovi i tehnike izolovanja PA iz biljnog materijala ispitani su i poređeni: vreme ekstrakcije maceracijom biljnog materijala u metanolu, efikasnost ekstrakcija metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline, ekstrakcija sumpornom kiselinom (koncentracija i zapremina sumporne kiseline, različite tehnike za ekstrakciju (maceracija na sobnoj temperaturi, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija pomoću rotacionog miksera), vreme

trajanja ekstrakcije, pH vrednost rastvora za ekstrakcije PA u baznoj sredini metilen-hloridom, broj ponovljenih ekstrakcija metilen-hloridom iz alkalnog rastvora. Sadržaj i prinos pirolizidinskih alkaloida u izolovanim i prečišćenim smešama praćen je pomoću GC-MS/FID. Za izračunavanje prinosa upotrebljavan je pentakozan kao inertni standard. Na osnovu dobivenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Pri ekstrakciji PA iz osušenog, usitnjenog i homogenizovanog biljnog materijala mase 1,00 g maceracijom u metanolu, na sobnoj temperaturi, za svih šest izolovanih pirolizidinskih alkaloida (**PA1-PA6**) najveći prinosi se dobivaju nakon četiri dana maceracije.
- Poređenjem prinosa svih šest PA, dobivenih pri ekstrakciji metanolom, etanolom i rastvorom sumporne kiseline, u toku četiri dana na sobnoj temperaturi, utvrđeno je da je ekstrakcija rastvorom sumporne kiseline najefikasnija.
- Ekstrakcija PA sumpornom kiselinom omogućava izolovanje većeg broja pirolizidinskih alkaloida u odnosu na ekstrakcije etanolom i metanolom. Pored toga, pri upotrebi sumporne kiseline smanjuje se broj koraka u celokupnom postupku izolovanja, što je veoma značajno za laboratorijsku praksu.
- Pri maceraciji biljnog materijala na sobnoj temperaturi, rastvorima sumporne kiseline različitih koncentracija (0,05 mol/L; 0,1 mol/L; 0,25 mol/L; 0,5 mol/L; 0,75 mol/L; 1 mol/L; 1,25 mol/L i 1,5 mol/L), utvrđeno je da je optimalna koncentracija za ekstrakciju svih šest PA 1 mol/L.
- Primenom različitih tehnika za ekstrakciju PA iz biljnog materijala (maceracija, ekstrakcija na ultrazvučnom kupatilu, ekstrakcija pomoću rotacionog miksera) rastvorom sumporne kiseline koncentracije 1 mol/L, i određivanjem vremena ekstrakcije koje omogućava najveće prinose za svaku tehniku, utvrđeno je da je optimalno vreme za maceraciju biljnog materijala četiri dana, a za ekstrakciju ultrazvukom i pomoću rotacionog miksera tri dana.

- Efikasnosti tehnika primenjenih za ekstrakciju PA (maceracija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija pomoću rotacionog miksera) poređene su u odnosu na prinose svih šest alkaloida (**PA1- PA6**), koji su dobiveni pri optimalnim vremenima ekstrakcija. Ekstrakcija pomoću rotacionog miksera je najefikasnija. Prinosi alkaloida dobiveni ovom tehnikom su 1,5 do 3 puta veći u odnosu na prinose dobijene ultrazvučnom ekstrakcijom, odnosno 3 do 20 puta veći u odnosu na maceraciju biljnog materijala.

- Kada se polazi od 1,00 g suvog, usitnjenog i homogenizovanog biljnog materijala, za ekstrakciju pirolizidinskih alkaloida optimalno je upotrebiti 30 ml rastvora sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$) (uz primenu rotacionog miksera, u trajanju od tri dana).

- Posle ekstrakcije biljnog materijala rastvorom sumporne kiseline ($C=1 \text{ mol/L}$), odvajanja kiselog ekstrakta od ostatka biljnog materijala, uklanjanja jedinjenja koja su nepolarnija od alkaloida metilen-hloridom, prečišćenim kiselim rastvorima se doda amonijak i alkaloidi ekstrahuju metilen-hloridom. Optimalno pH vrednost rastvora za izolovanje većine okarakterisanih PA sa maksimalnim prinosom iznosi 9.

- Ekstrakciju PA iz alkalnog rastvora (pH 9) trebalo bi ponoviti četiri puta (optimalni broj ekstrakcija) sa po 30 ml metilen-hlorida, što omogućava maksimalne prinose.

Dakle, optimizovani postupak omogućava da se u svakoj fazi izolovanja za većinu okarakterisanih pirolizidinskih alkaloida (7-angeloiheliotridan, 7-angeloiheliotridin, lindelofin, 7-angeloilrinderin, punktanečin i heliosupin) iz biljnog materijala *R. umbellata* Bunge postignu maksimalni prinosi. Ovo je veoma važno za izolovanje i karakterizaciju pirolizidinskih alkaloida, za ispitivanje njihove biološke aktivnosti, ali i za pripremu uzoraka biljnog materijala u cilju pouzdanog određivanja njihovog sadržaja.

6. LITERATURA

1. Liddell J. R. (2001) Pyrrolizidine alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 441-447.
2. Huong D. T. T., Martin M-T., Litaudon M., Sevenet T., Pais M. (1998) Pyrrolizidine alkaloids from *Amphorogyne spicata* *J. Nat. Prod.* **61**, 1444-1446.
3. Logie C. G., Grue M.R., Liddell J.R. (1994) Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* **37**, 43-109.
4. Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E., Seawright A.A. (1999) Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res.* **443**, 53-67.
5. Stegelmeier B.L., Edgar J.A., Colegate S.M., Gardner D.R., Schoch T.K., Coulombe R.A., Molyneux R.J. (1999) Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J. Nat. Toxins* **8**, 95-116.
6. Woo Y.-T., Lai D.Y., Arcos J.C., Argus M.F. *Chemical Induction of Cancer*. San Diego: Academic Press Inc. (1988)
7. Tandon H. D., Tandon B. N., Mattocks A. R. (1978). An epidemic of veno-occlusive disease of the liver in Afghanistan. Pathologic features. *Am. J. Gastroenterol.* **70**, 607-613.
8. Tandon B. N., Tandon H. D., Tandon R. K., Narndranathan M., Joshi Y. K. (1976) An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *Lancet* **2**, 271-272.
9. Selzer M. B., Parker R. G. (1951). Senecio poisoning exhibiting as Chiari's syndrome. *Am. J. Pathol.* **27**, 805-907.

10. Huxtable, R. J. (1989). Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. In: Cheeke, P. R., ed. *Toxicants of Plant Origin*. Vol.1. Boca Raton: CRC Press Inc., 41-86.
11. Sperl, W., Stuppner, H., Gassner, I., Judmaier, W., Dietze, O., Vogel, W. (1995) Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur. J. Pediatr.* **154**, 112-116.
12. Langel, D.; Ober, D.; Pelsler, P. (2011) The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochem. Rev.* **10**, 3-74.
13. Edgar, J. A., Lin, H. J., Kumana, C. R., Ng, M. M. (1992) Pyrrolizidine alkaloid composition of three Chinese medicinal herbs, *Eupatorium cannabinum*, *E. japonicum* and *Crotalaria assamica*. *Am. J. Chin. Med.* **20**, 281-288.
14. Roeder E. (1995). Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, **50**, 83-98.
15. Betz J.M., Eppley R.M., Taylor W.C., Andrezejewski D. (1994) Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum spp.*). *J Pharm Sci* **83**, 649-653.
16. Arzt J., Mount M.E. (1999). Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria spp.*) ingestion in a horse on Easter Island. *Vet. Hum. Toxicol.* **41**, 96-99.
17. Backer D.C., Pfister J.A., Molyneux R.J., Kechele P. (1991) *Cynoglossum officinale* toxicity in calves. *J. Comp. Pathol.* **104** 403-410.

18. de Lanux-Van Gorder V. (2000) Tansy ragwort poisoning in a horse in southern Ontario. *Can. Vet. J.* **41**, 409-410.
19. W.H.O. (WHO). Pyrrolizidine alkaloids. *International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria*. Vol. 80. Geneva: World Health Organization, (1988), p. 337.
20. Creeper, J. H., Mitchell, A. A., Jubb, T. F., Colegate, S. M. (1999). Pyrrolizidine alkaloid poisoning of horses grazing a native heliotrope (*Heliotropium ovalifolium*). *Aust. Vet. J.* **77**, 401-402.
21. Peterson, J.E.; Culvenor, C.C.J. *Plant and fungal toxins*, (eds. Keeler, R. F.; Tu, A.T.) Handbook of natural toxins, Vol. 1, Marcel Dekker, New York (1983), p. 637.
22. Chan P.C., Mahler J., Bucher J.R., Travlos G.S., Reid J.B. (1994) Toxicity and carcinogenicity of riddelliine following 13 weeks of treatment to rats and mice. *Toxicol* **32**, 891-908.
23. Chan P.C., Haseman J.K., Prejean J.D., Nyska A. (2003) Toxicity and carcinogenicity of riddelliine in rats and mice. *Toxicol. Lett.* **144**, 295-311.
24. Fu P.P., Yang Y.C., Xia Q., Chou M.W., Cui Y.Y., Lin G. (2002) Pyrrolizidine Alkaloids - tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements. *J. Food Drug Anal.* **10**, 198-210.
25. Schoental R. (1975) Pancreatic islet-cell and other tumors in rats given heliotrine, a monoester pyrrolizidine alkaloid, and nicotinamide. *Cancer Res.* **35**, 2020–2024.

-
26. R. Schoental. Carcinogens in plants and microorganisms. In: Searle, C.E. ed. *Chemical Carcinogens*. Vol. 173. Washington DC: ACS Monograph American Chemical Society, DC (1976)
27. Smith R.A., Panariti E. (1995) Intoxication of Albanian cattle after ingestion of *Senecio subalpinus*. *Veterinary and human toxicology*, **37**(5), 478- 479.
28. Cheeke P.R. Alkaloids. In: *Toxicants of Plant Origin*. Vol.1. CRC Press: Boca Raton, Florida (1989)
29. Cheeke P.R., Huan J. In: Gustine DL, Flores HE (eds) *Phytochemicals and health. current topics in plant physiology*. American Society of Plant Physiologists, Rockville (1995)
30. Cheeke P.R. (1994) A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. *Vet Human Toxicol.* **36**(3), 240-247.
31. Fu P., Xia Q. Lin, G., Chou, M.W. (2004) Pyrrolizidine alkaloids– genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation and mechanisms. *Drug Metabolism Reviews*, **36**, 1–55.
32. Anon. *Environmental Health Criteria* 80, Pyrrolizidine Alkaloids, WHO, Geneva (1988)
33. Mattocks A.R. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. London: Academic Press. (1986)
34. Brink N.G. (1982) Somatic and teratogenic effects induced by heliotrine in *Drosophila*. *Mutat. Res.* **104**, 105-111.

35. Carballo M., Mudry M.D., Larripa I.B., Villamil E., D'Aquino M. (1992) Genotoxic action of an aqueous extract of *Heliotropium curassavicum* var. *argentinum*. *Mutat. Res.* **279**, 245-253.
36. Pereira, T. N., Webb, R. I., Reilly, P. E., Seawright, A. A., Prakash, A. S. (1998) Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5441-5447.
37. Coulombe, R. A. Jr., Drew, G. L., Stermitz, F. R. (1999). Pyrrolizidine alkaloids Crosslink DNA with actin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 198-202.
38. Fu, P. P., Chou, M. W., Xia, Q., Yang, Y. C., Yan, J., Doerge, D. R., Chan, P. C. (2001) Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides-Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. *Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **19**, 353-386.
39. Yang, Y. C., Yan, J., Doerge, D. R., Chan, P. C., Fu, P. P., Chou, M. W. (2001) Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelline, leading to DNA adduct formation *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.* **14**:101-109.
40. Frei, H., Luthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wurgler, F. E., Schlatter, C. (1992) Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem. Biol. Interact.* **83**, 1-22.
41. Hirono, I., Haga, M., Fujii, M., Matsuura, S., Matsubara, N., Nakayama, M., Furuya, T., Hikichi, M., Takanashi, H., Uchida, E., Hosaka, S., Ueno, I. (1979) Induction of hepatic tumors in rats by senkirkine and symphytine. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**, 469-472.

-
42. Schoental, R., Cavanagh, J. B. (1972) Brain and spinal cord tumors in rats treated with pyrrolizidine alkaloids. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 665-671.
43. Furuya, T., Hikichi, M., Iitaka, Y. (1976) Fukinotoxin, a new pyrrolizidine alkaloid from *Petasites japonicus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **24**, 1120-1122.
44. Schoental, R., Head, M. A., Peacock, P. R. (1954) Senecio alkaloids: primary liver tumours in rats as a result of treatment with (1) a mixture of alkaloids from *S. jacobaea* L.; (2) retrorsine; (3) isatidine. *Br. J. Cancer* **8**, 458-465.
45. Schoental, R., Hard, G. C., Gibbard, S. (1971) Histopathology of renal lipomatous tumors in rats treated with the "natural" products, pyrrolizidine alkaloids and unsaturated aldehydes. *J. Natl. Cancer Inst.* **47**, 1037-1044.
46. Harris, P. N., Chen, K. K. (1970) Development of hepatic tumors in rats following ingestion of *Senecio longilobus*. *Cancer Res.* **30**, 2881-2886.
47. Hirono, I., Mori, H., Culvenor, C. C. (1976) Carcinogenic activity of coltsfoot, *Tussilago farfara* L. *Gann* **67**, 125-129.
48. Buhler, D. R., Kedzierski, B. (1986). Biological reactive intermediates of pyrrolizidine alkaloids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **197**, 611-620.
49. Chung, W. G., Buhler, D. R. (1994) The effect of spironolactone treatment on the cytochrome P450-mediated metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine by hepatic microsomes from rats and guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 314-319.

50. Kasahara, Y., Kiyatake, K., Tatsumi, K., Sugito, K., Kakusaka, I., Yamagata, S., Ohmori, S., Kitada, M., Kuriyama, T. (1997) Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **30**, 124-129.
51. Lin, G., Cui, Y. Y., Hawes, E. M. (1998) Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of clivorine. Firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 181-184.
52. Lin, G., Cui, Y. Y., Hawes, E. M. (2000) Characterization of rat liver microsomal metabolites of clivorine, an hepatotoxic otonecine-type pyrrolizidine alkaloid. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1475-1483.
53. Reid, M. J., Lame, M. W., Morin, D., Wilson, D. W., Segall, H. J. (1998) Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of ¹⁴C-monocrotaline in rat liver microsomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **12**, 157-166.
54. Lin, G., Cui, Y. Y., Liu, X. Q., Wang, Z. T. (2002) Species differences in the *in vitro* metabolic activation of the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid clivorine. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1421-1428.
55. Dueker, S. R., Lame, M. W., Morin, D., Wilson, D. W., Segall, H. J. (1992) Guinea Pig and rat hepatic microsomal metabolism of monocrotaline. *Drug Metab. Dispos.* **20**, 275-280.
56. Chung, W. G., Buhler, D. R. (1995) Major factors for the susceptibility of guinea pig to the pyrrolizidine alkaloid jacobine. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1263-1267.
57. Miranda, C. L., Chung, W., Reed, R. E., Zhao, X., Henderson, M. C., Wang, J. L., Williams, D. E., Buhler, D. R. (1991) Flavin-containing monooxygenase: a major

- detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 546-552.
58. Yang, Y., Yan, J., Churchwell, M., Beger, R., Chan, P., Doerge, D. R., Fu, P. P., Chou, M. W. (2001) Development of a ³²P-postlabeling/HPLC method for detection of dehydroretronecine-derived DNA adducts *in vivo* and *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 91-100.
59. Huxtable, R. J., Wild, S. L. (1994) Relationship between *in vitro* metabolism of pyrrolizidine alkaloids and extrahepatic toxicity *in vivo*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **37**, 109-111.
60. Griffin, D. S., Segall, H. J. (1986) Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids, and related alkenals. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**, 227-234.
61. Griffin, D. S., Segall, H. J. (1989) Effects of the pyrrolizidine alkaloid senecionine and the alkenals trans-4-OH-hexenal and trans-2-hexenal on intracellular calcium compartmentation in isolated hepatocytes. *J. Biochem. Pharmacol.* **38**, 391-397.
62. Winter, C. K., Segall, H. J., Haddon, W. F. (1986) Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal *in vitro*. *Cancer Res.* **46**, 5682-5686.
63. Miranda, C. L., Reed, R. L., Cheeke, P. R., Buhler, D. R. (1981) Protective effects of butylated hydroxyanisole against the acute toxicity of monocrotaline in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 424-430.
64. Yan, C. C., Huxtable, R. J. (1995). The effect of the pyrrolizidine alkaloids, monocrotaline and trichodesmine, on tissue pyrrole binding and glutathione metabolism in the rat. *Toxicol.* **33**, 627-634.

65. Yan, C. C., Huxtable, R. J. (1995) Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **130**, 132-139.
66. Smith, L. W., Culvenor, C. C. (1981) Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *J. Nat. Prod.* **44**, 129-152.
67. Langel, D.; Ober, D.; Pelsler, P. (2011) The evolution of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis and diversity in the Senecioneae. *Phytochem. Rev.* **10**, 3-74.
68. Mandic, B.; Godevac, D.; Beskoski, V.; Simic, M.; Trifunovic, S.; Tesevic, V.; Vajs, V.; Milosavljevic, S. (2009) Pyrrolizidine alkaloids from seven *Senecio* species wild-growing in Serbia and Montenegro. *J. Serbian Chem. Soc.* **74**, 27-34.
69. Mandic, B.; Godevac, D.; Vujsic, L.J.; Trifunovic, S.; Tesevic, V.; Vajs, V.; Milosavljevic, S. (2011) Semicoumarin and phenol compounds from seven *Senecio* species. *Chem. Papers* **65**, 90-92.
70. Christov, V.; Kostova, N.; Evstatieva, L. (2005) 6-Angeloylplatynecine: A new alkaloid from *Senecio nemorensis* subsp. *fuchsii* (C.C. Gmelin) celak. *Nat. Prod. Res.* **19**, 389-392.
71. Kostova, N.; Christov, V.; Cholakova, M.; Nikolova, E.; Evstatieva, L. (2006) Pyrrolizidine alkaloids from Bulgarian species of the genus *Senecio*. *J. Serbian Chem. Soc.* **71**, 1275-1280.
72. Dreger, M.; Stanisławska, M.; Krajewska-Patan, M.; Mielcarek, S.; Łukasz Mikołajczak, P.; Buchwald, W. (2009) Pyrrolizidine alkaloids-Chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. *Herba Pol.* **55**, 127-147.

73. Flora Europaea, <http://rbg-web2.rbge.org.uk/FE/fe.html>
74. Roeder E. (1999) Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Curr. Org. Chem.* **3**, 557-576.
75. Mroczek T., Widelski J., Glowniak K. (2006) Optimization of extraction of pyrrolizidine alkaloids from plant material. *Chem. Anal.* **51**, 567-580.
76. Hosch G., Wiedenfeld H., Dingermann T., Roder E. (1996) A new high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in plant materials. *Phytochem. Anal.* **7**, 284-288.
77. Wuilloud J.C.A., Gratz S.R., Gamble B.M., Wolnik K.A. (2004) Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. *Analyst* **129**, 150 -156.
78. Stelljes M.E., Kelley R.B., Molyneux R.J., Seiber J.N. (1991) GC-MS determination of pyrrolizidine alkaloids in four *Senecio* species. *J. Nat. Prod.* **54**, 759-773.
79. Witte L., Rubiolo P., Bicchi C., Hartmann T. (1993) Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry* **32**, 187-196.
80. Boppre M., Colegate S.M., Edgar J.A., Fischer O.W. (2008) Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5662-5672.
81. Roeder E., Liu K., Mutterlein R. (1992) Quantitative photometric determination of pyrrolizidine alkaloids in *Symphyti radix*. *Fresenius J. Anal. Chem.* **343**, 621-624.

82. Chizzola R. (1994) Rapid sample preparation technique for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant extracts. *J. Chromatogr. A* **668**, 427-433.
83. Zhang F., Wang C.H. Wang, Chen W., Ma L.X., Zhang H.Y., Zhang C.F., Bligh M., Wang Z.T. S.W.A. (2008) Quantitative analysis by HPLC–MS2 of the pyrrolizidine Alkaloid adonifoline in *Senecio scandens*. *Phytochem. Anal.* **19**, 25-31.
84. Brauchli J., Luthy J., Zweifel U., Schlatter C. (1982) Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L and their percutaneous absorption in rats. *Experientia* **38**,1085-1087.
85. Weber S., Eisenreich W., Bacher A., Hartmann T. (1999) Pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type: biosynthesis of trachelanthic acid. *Phytochemistry* **50**,1005-1014.
86. Mroczek T., Glowniak K., Wlaszczyk A. (2002) Simultaneous determination of N-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **949**, 249-26.
87. Gray D.E., Porter A., O'Neill T., Harris R.K., Rottinghaus G.E. (2004) A rapid cleanup method for the isolation and concentration of pyrrolizidine alkaloids in comfrey root. *J AOAC Int* **87**,1049-1057.
88. Mattocks A.R. (1961) Extraction of heat-labile alkaloids from plants. *Nature* **191**,1281-1282.
89. Witte L., Ernst L., Adam H., Hartmann T. (1992) Chemotypes of 2 pyrrolizidine alkaloid-containing *Senecio* species. *Phytochem.* **31**,559–565.

90. Hartmann T., Toppel G. (1987) Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochem.* **26**, 1639-1643.
91. Pelsler P.B., de Vos H., Theuring C., Beuerle T., Vrieling K., Hartmann T. (2005) Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae). *Phytochem.* **66**, 1285-1286.
92. Altamirano J.C., Gratz S.R., Wolnik K.A. (2005) Investigation of pyrrolizidine Alkaloids and their N-oxides in commercial comfrey-containing products and botanical materials by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *JAOAC Int* **88**, 406-412.
93. Deinzer M.L., Thomson P.A., Burgett D.M., Isaacson D.L. (1977) Pyrrolizidinealkaloids: their occurrence in honey from tansy ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Science* **195**, 497- 499.
94. Dickinson J.O., Cooke M.P., King R.R., Mohamed P.A. (1976) Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *J Am. Vet. Med. Assoc.* **169**, 1192-1196.
95. Edgar J.A., Smith L.W. Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: food safety implications. In: Tu AT, Gaffield W (eds) Natural and selected synthetic toxins: biological implications. *American Chemical Society*, Washington (2000).
96. Crews C., Driffield M., Berthiller F., Krska R. (2009) Loss of pyrrolizidine alkaloids on decomposition of ragwort (*Senecio jacobaea*) as measured by LC-TOF-MS. *J Agric. Food Chem.* **57**, 3669-3673.
97. Boppre M., Colegate S.M., Edgar J.A. (2005) Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 594-600.

98. Colegate S.M., Gardner D.R. (2008) LC–MS of alkaloids: qualitative profiling quantitative analysis and structural identification. *Mod. Alkaloids* 369-409.
99. Betteridge K., Cao Y., Colegate S.M. (2005) Improved method for extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in honey: application to *Echium vulgare* honeys. *J Agric. Food Chem.* **53**, 1894–1902.
100. Roeder E. (1990) C-13 NMR-Spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* **29**, 11-29.
101. Logie C.G., Grue M.R., Liddell J.R. (1994) Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* **37**:43-109.
102. Molyneux R.J., Roitman J.N., Benson M., Lundin R.E. (1982) 13C NMR-Spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* **21**, 439-443.
103. Mandić, B.M.; Simić, M.R.; Vučković, I.M.; Vujisić, L.V.; Novaković, M.M.; Trifunović, S.S.; Nikolić-Mandić, S.D.; Tešević, V.V.; Vajs, V.V.; Milosavljević, S.M. (2013) Pyrrolizidine Alkaloids and Fatty Acids from the Endemic Plant Species *Rindera umbellata* and the Effect of Lindelofine-N-oxide on Tubulin Polymerization. *Molecules* **18**, 10694-10706.
104. Lebada R., Schreier A., Scherz S., Resch C., Krenn L., Kopp B. (2000) Quantitative analysis of the pyrrolizidine alkaloids senkirkine and senecionine in *Tussilago farfara* L. by capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal.* **11**, 366-369.
105. Asibal, C.F.; Gelbaum, L.T.; Zalkow, L.H. (1989) Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium rotundifolium*. *J. Nat. Prod.* **52**, 726-731.

106. Crews C., Startin J.R., Clarke P.A. (1997) Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid-phase extraction and HPLC-MS. *Food Addit. Contam.* **14**, 419- 428.
107. Cao Y., Colegate S.M., Edgar J.A. (2008) Safety assessment of food and herbal products containing hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: interlaboratory consistency and the importance of N-oxide determination. *Phytochem. Anal.* **19**, 526-533.
108. Colegate S.M., Edgar J.A., Knill A.M., Lee S.T. (2005) Solid-phase extraction and HPLC-MS profiling of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides: a case study of *Echium plantagineum*. *Phytochem. Anal.* **16**, 108-119.
109. Beales K.A., Betteridge K., Colegate S.M., Edgar J.A. (2004) Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. *J Agric. Food Chem.* **52**, 6664-6672.
110. Rajagopalan, T.R.; Batra, V. (1977) Alkaloidal constituents of *Heliotropium curassavicum*. *Ind. J. Chem.* **15B**, 494.
111. Subramaniam Mohanraj, Werner Herz. (1982) Separation of diastereomeric pyrrolizidine alkaloids by chromatography on alkalised silica gel. *J. Chromatogr. A* **238**(2), 530-534
112. Furuya, T.; Araki, K. (1968) Studies on constituents of crude drugs. Alkaloids of *Symphytum officinale*. *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 2582-2516.
113. Furuya, T.; Hikichi, M. (1971) Alkaloids and triterpenoids of *Symphytum officinale*. *Phytochemistry* **10**(9), 2217-2220.

114. Ulubelen, A.; Doganca, S. (1991) Alkaloidal and other constituents of *Symphytum orientale*. *Phytochemistry* **10**(2), 441-442.
115. Zalkow, L.H.; Gelbaum, L.; Keinan, E. (1978) Isolation of the pyrrolizidine alkaloid europine N-oxide from *heliotropium maris-mortui* and *H. Rotundifolium*. *Phytochemistry* **17**(1), 172-172.
116. Siddiqi, M.A.; Suri, K.A.; Suri, O.P.; Atal, C.K. (1978) A new pyrrolizidine alkaloid from *Caccinia glauca*. *Phytochemistry* **17**, 2049-2050.
117. Frahn, J.L.; Culvenor, C.C.J.; Mills, J.A. (1980) Preparative separation of the pyrrolizidine alkaloids, intermedine and lycopsamine, as their borate complexes. *J. Chromatogr.* **195**, 379-383.
118. Mohanraj, S.; Herz, W.; Subramanian, P.S. (1982) High resolution proton NMR and carbon-13 NMR spectra of saturated pyrrolizidine monoester alkaloids. *J.Chromatogr.* **238**, 530.
119. Mattocks A.R. (1967) Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr. A* **27**, 505-508.
120. Baerheim Svendsen, A.; Verpoorte, R. Chromatography of alkaloids. In: *Journal of Chromatography Library*. vol. 23A:Amsterdam-Oxford-New York: Elsevier Scientific Publishing Company (1983) p. 57.
121. Roeder, E.; Neuberger, V. (1988) Pyrrolizidin alkaloid in *Symphytum*-Arten. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **128**, 1991-1994.
122. Huizing H.J., Deboer F., Hendriks H., Balraadjsing W., Bruins A.P. (1986) Positive and negative-ion chemical ionization massspectrometry of trimethylsilyl

- derivatives of pyrrolizidine alkaloids using (NH)₄⁺ and (OH)⁻ as the reactant ions. *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **13**, 293-298.
123. Culvenor C.C.J., Edgar J.A., Smith L.W. (1981) Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 958-960.
124. Edgar J.A., Lin H.J., Kumana C.R., Ng M.M. (1992) Pyrrolizidine alkaloid composition of three Chinese medicinal herbs *Eupatorium cannabinum*, *E. Japonicum* and *Crotalaria assamica*. *Am. J. Chin. Med.* **20**, 281-288.
125. Luthy J., Zweifel U., Karlhuber B., Schlatter C. (1981) Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio alpinus* L. and their detection in feedingstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 302-305.
126. McCoy J.W., Roby M.R., Stermitz F.R. (1983) Analysis of plant alkaloid mixtures by ammonia chemical ionization mass spectrometry. *Nat. Prod.* **46**, 894-901.
127. Hendriks H, Balraadjsing W, Huizing HJ, Bruins AP (1987) Investigation into the presence of pyrrolizidine alkaloids in *Eupatorium-cannabinum* by means of positive and negative-ion chemical ionization GC-MS. *Planta Med.* **5**, 456-461.
128. Dreifuss PA, Brumley WC, Sphon JA, Caress EA (1983) Negative ion chemical ionization mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids with hydroxide reactant ion. *Anal. Chem.* **55**, 1036-1040.
129. Neuner-Jehle N., Nesvadba H., Spitteller G. (1965) Anwendung der Massenspektrometrie zur strukturaufklärung von alkaloiden. 6. Mitt pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. *Monatsh Chem.* **96**, 321-338.

130. Bicchi C., Caniato R., Tabacchi R., Tsoupras G. (1989) Capillary gas-chromatography positive and negative-ion chemical ionization mass-spectrometry on pyrrolizidine alkaloids of *Senecioinaequidens* using ammonia and hydroxyl ions as the reagent species. *J. Nat. Prod.* **52**, 32-41.
131. El-Shazly A. (2002) Pyrrolizidine alkaloid profiles of some *Senecio* species from Egypt. *Verl Z Naturforsch* **57**, 429-433.
132. Schoch T.K., Gardner D.R., Stegelmeier B.L. (2000) GC/MS-MS detection of pyrrolic metabolites in animals poisoned with the pyrrolizidine alkaloid riddelliine. *J Nat. Toxins* **9**, 197-206.
133. Qi X., Wu B., Cheng Y., Qu H. (2009) Simultaneous characterization of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in *Gynura segetum* by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 291-302.
134. Beales K., Colegate S.M., Edgar J.A. Experiences with the quantitative trace analysis of pyrrolizidine alkaloids using GC-MS and LCMS. In: Acamovic T, Stewart CS, Pennycott TW (eds) *Poisonous plants and related toxins*. CAB International, Wallingford (2003)
135. Segall H.J., Dallas J.L. (1983) H-1-NMR Spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* **22**, 1271-1273.
136. Azadbakht M., Talavaki M. (2003) Qualitative and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids of wheat and flour contaminated with *Senecio* in Mazandaran Province farms. *Iranian J. Pharm. Res.* **2**, 179-183.

137. Birecka H., Catalfamo J.L., Eisen R.N. (1981) A sensitive method for detection and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* **20**, 343-344.
138. Steenkamp V., Stewart M.J., Zuckerman M. (2000) Clinical and analytical aspects of pyrrolizidine poisoning caused by South African traditional medicines. *Ther Drug Monit.* **22**, 302-306.
139. Yu L.J., Li S.F.Y. (2005) Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis for online preconcentration of toxic pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicine. *Electrophoresis* **26**, 4360-4367.
140. Gorman B.A., Barnett N.W., Bos R. (2005) Detection of pyrrolizidine alkaloids using flow analysis with both acidic potassium permanganate and tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* **541**, 119-124.
141. Vdoviko, E.A.; Pryakhin, O.R.; Pokhmelkina, S.A. (1979) Polarographic determination of alkaloids of the pyrrolizidine series in plant raw material. *Khim. Prir. Soedin.* **5**, 674-676.
142. Temizer, A.; Onar, A.N.; Sener, B.; Temizer, H.; Karakaya, A.E. (1985) Determination of alkaloids by differential pulse polarography, I. *Senecio* alkaloids. *J. Pharm. Belg.* **40**, 75-78.
143. Langer T., Mostl E., Chizzola R., Gutleb R. (1996) A competitive enzyme immunoassay for the pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type. *Planta Med.* **62**, 267-271.
144. Zundorf I, Wiedenfeld H, Roeder E, Dingermann T (1998) Generation and characterization of monoclonal antibodies against the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. *Planta Med.* **64**, 259-263.

-
145. Lee S.T., Schoch T.K., Stegelmeier B.L., Gardner D.R., Than K.A., Molyneux R.J. (2001) Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the hepatotoxic alkaloids riddelliine and riddelliine N-oxide. *J Agric. Food Chem.* **49**, 4144-4151.
146. Bober M.A., Milco L.A., Miller R.B., Mount M., Wicks B., Kurth M.J. (1989) A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect retronecine and monocrotaline *in vitro*. *Toxicol* **27**(9), 1059-1064.
147. Huang, C.-H.; Chan, Y.-Y.; Kuo, P.-C.; Chen, Y.-F.; Chang, R.-J.; Chen, I.-S.; Wu, S.-J.; Wu, T.-S. (2014) The Constituents of Roots and Stems of *Illigera luzonensis* and Their Anti-Platelet Aggregation Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13424-13436.
148. Petigny, L.; Périno-Issartier, S.; Wajsman, J.; Chemat, F. Batch (2013) Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 5750-5764.
149. Bournine, L.; Bensalem, S.; Wauters, J.-N.; Iguer-Ouada, M.; Maiza-Benabdesselam, F.; Bedjou, F.; Castronovo, V.; Bellahcène, A.; Tits, M.; Frédérich, M. (2013)
150. Identification and Quantification of the Main Active Anticancer Alkaloids from the Root of *Glaucium flavum*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 23533-23544.
151. NIST 11 Library

BIOGRAFIJA

Mr Boris M. Mandić rođen je 30. jula 1976. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Školske 1995/96. godine upisao se na Hemijski fakultet u Beogradu, na studijsku grupu Diplomirani hemičar, i diplomirao je 2002. godine. Magistarske studije upisao je školske 2004/05. godine na Hemijskom fakultetu u Beogradu, na Odeljenju za instrumentalnu analizu pri Katedri za organsku hemiju kod mentora prof. dr Veleta Teševića.

Magistarsku tezu, pod naslovom: „Uporedno ispitivanje sekundarnih metabolita iz biljnih vrsta roda Senecio“, odbranio je 2008. godine na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

U toku magistarskih i doktorskih studija pohađao je više kurseva i letnjih škola, organizovanih u Zemlji i inostranstvu, koji su se bavili MS, GC MS, HPLC-ESI TOF MS, HPLC-ESI QQQ MS, X-Ray metodama. Bio je polaznik i kursa “Analysis chemicals related to the chemical weapons convention in the framework of OPCW proficiency testing” na Institutu VERIFIN u Finskoj.

Novembra 2003. zaposlen je u Centru za hemiju IHTM-a. U zvanje asistenta pripravnika na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabran je 2004. godine, a u zvanje asistenta 2008. godine. Držao je vežbe iz više predmeta na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta.

Od 2004. godine angažovan je na naučnim projektima finansiranim od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj. U okviru svog naučno-istraživačkog rada bavi se hemijom sekundarnih metabolita biljaka, hromatografskim i spektroskopskim tehnikama analize njihove strukture, ispitivanjem njihove aktivnosti, kao i razvojem metoda za njihovo izolovanje i prečišćavanje.

Koautor je 16 radova sa SCI liste, od toga 9 u vodećim međunarodnim časopisima (4 u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorija M21 i 5 u istaknutim međunarodnim časopisima kategorije M22), a 7 u međunarodnim časopisima (kategorija M23).

Član je Srpskog hemijskog društva Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Борис М. Мандић

Број индекса: /

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Оптимизација поступка за изоловање и одређивање пирилизидинских алкалоида у биљном материјалу”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 19.01.2015.

Борис Мандић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Борис М. Мандић

Број индекса: /

Студијски програм: /

Наслов рада: “Оптимизација поступка за изоловање и одређивање
пиролизидинских алкалоида у биљном материјалу”

Ментори: проф. др Снежана Нииколић-Мандић и проф. др Веле Тешевић

Потписани: Борис М. Мандић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 19.01.2015.

Борис Мандић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

““Оптимизација поступка за изоловање и одређивање пиролизидинских алкалоида у биљном материјалу””

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19.01.2015.

Борис Мануш