

POVZETEK

V preteklosti smo se v Sloveniji srečali s kar številnimi zastrupitvami z rastlinskimi alkaloidi, predvsem zaradi nenamernega uživanja rastlinskih delov jesenskega podleska, zaradi prisotnosti alkaloidov navadnega kristavca v živilih iz ajdove moke in zaradi uporabe skorje korenine grma iboge, z namenom prekinitve odvisnosti. Doktorskega dela sem se lotila s ciljem, da bi preučila možnosti za kvalitativno in kvantitativno določitev najbolj aktualnih alkaloidov, atropina, skopolamina, kolhicina, ibogaina in njegovega metabolita noribogaina, v bioloških vzorcih.

Med raziskovanjem sem ugotovila, da je vse te spojine mogoče identificirati v ekstraktu telesnih tekočin z rutinsko GC-MS metodo (kapilarna HP-5MS kolona), pri čemer sta bila termično razgradljiva le atropin in skopolamin. Sistematično sem preučila nastanek razgradnih produktov v odvisnosti od temperature in ugotovila, da z ustreznim znižanjem temperature injektorja lahko razgradnjo večinoma preprečimo. Vseh pet spojin sem uspešno identificirala tudi z metodo LC-MS/MS na kolonah Zorbax XDB-C8 in Zorbax XDB-CN. Slednjo sem uporabila pri razvoju kvantitativne metode. Zaradi manjše verjetnosti istočasne pojavnosti vseh petih spojin v bioloških vzorcih, sem razvila tri optimizirane in validirane metode za njihovo določitev. Razvoj metod je potekal v skladu z mednarodno sprejetimi priporočili in je obsegal optimizacijo delovanja MS/MS, kromatografske ločbe, volumna in sestave injicirane raztopine, preverjanje selektivnosti in območja linearnosti, izbiro kalibracijskega modela, določitev ponovljivosti in pravilnosti znotraj dneva kot tudi med dnevi, določitev LLOQ in LOD. Metode sem validirala za kri (plazma, serum) v območju terapevtskih in toksičnih koncentracij in sicer pri tropanih v območju 0,10 do 50 ng/mL (IS levobupivakain), kolhicinu 0,50 do 100 ng/mL (IS prazepam) in pri ibogainu ter noribogainu od 0,25 do 100 ng/mL (IS prazepam); spodnji kalibrator je tudi LLOQ. Pri vseh alkaloidih in vseh treh metodah, časi ene analize so le 7 min, sem izpolnila zahtevane kriterije za ponovljivost ($RSD < 15\%$ in $< 20\%$ pri LLOQ) in pravilnost (odstopanje $\pm 20\%$ od prave vrednosti). Kljub majhni porabi vzorcev (100 do 170 μ L) in enostavni deproteinizaciji sem dosegla LLOQ, primerljive s tistimi iz literature. Nisem zasledila predhodnih objav, kjer bi za določitev skopolamina, kolhicina ali ibogaina v krvi uporabili le pripravo vzorca z razbeljakovinjenjem. Med validacijo metode sem posebno pozorno preučila učinkovitost procesa (PE) in raznolike učinke matrice (ME), pri slednjem pojavu sem uporabila tudi nov, modificiran pristop in njegovo upravičenost potrdila z eksperimentom. Spojine sem izpostavila tudi dnevni in UV svetlobi ter ugotovila, da je potrebno po odvzemu pred svetlobo zaščititi vzorce, ki vsebujejo kolhicin in ibogain z metabolitom. So pa spojine dovolj stabilne, da je mogoče vzorce po vpeljanem hitrem postopku pripravljati tudi pri normalni dnevni svetlobi. Vse spojine so dobro obstojne med kratkoročnim (več dni pri 4 °C) in dolgoročnim shranjevanjem (leto pri -20 °C). Razvila sem hitre, občutljive in robustne metode, ki zahtevajo minimalno količino in pripravo vzorca, tako da sem v veliki meri izkoristila zmogljivosti instrumenta. Vse metode sem že uspešno uporabila za analizo več kot 600 avtentičnih vzorcev.

Ključne besede: alkaloidi, biološki vzorci, validirana kvantitativna metoda, LC-MS/MS, GC-MS