

POVZETEK

Rastlinska vrsta navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi* L.) predstavlja dober vir različnih biološko aktivnih metabolitov, zato je za varno in učinkovito uporabo potrebna podrobna karakterizacija le-teh v različnih delih rastline. S presejalnimi analizami kutikularnih voskov rastline *P. alkekengi* L. var. *franchetii* smo pokazali, da so v njih poleg za voske značilnih lipidov, fitosterolov in triterpenoidov prisotni tudi karotenoidi in flavonoidi. Razvili smo ne-ciljan pristop za ločbo, izolacijo in identifikacijo metiliranih flavonoidov v kutikularnih voskih navadnega volčjega jabolka. Na silikagelni stacionarni fazi smo razvili hitro in enostavno HPTLC metodo za presejalne analize metiliranih flavonoidov. Razvili smo tudi HPLC–UV–MSⁿ in HPLC–UV metodi z uporabo C6-fenil oziroma C18 stacionarne faze, pri čemer je bil za ločbo metiliranih flavonoidov na bazni liniji ključen vpliv temperature in tetrahidrofurana kot modifikatorja mobilne faze. S semi-preparativno kromatografijo na C18 stacionarni fazi smo izolirali spojine v čisti obliki in jih z NMR spektroskopijo identificirali kot štiri 3-*O*-metilirane flavanole: miricetin 3,7,3'-trimetil eter, kvercetin 3,7-dimetil eter, miricetin 3,7,3',5'-tetrametil eter in kvercetin 3,7,3'-trimetil eter. Razvita izokratska HPLC–UV–MSⁿ metoda je hitra in omogoča kromatografsko profiliranje eksternih metiliranih flavanolov, kar je primerno tudi za nadzor kakovosti *P. alkekengi* L. var. *franchetii*. Razložili smo mehanizem HPLC ločbe teh metabolitov, kar predstavlja temelje za prihodnji razvoj kromatografskih metod za določanje metiliranih flavonoidov in sorodnih spojin.

Za karakterizacijo strukturno podobnih in kompleksnih farmakološko aktivnih fizalinov v navadnem volčjem jabolku smo razvili prvi HPTLC in HPTLC–MS/MS metodi za njihovo določanje v neprečiščenih rastlinskih ekstraktih. Med preizkušenimi HPTLC adsorbenti (silikagel, RP-18, RP-18 W, ciano) smo najboljšo selektivnost in ločljivost ter najkrajši čas analize dosegli z uporabo silikagela. Denzitometrično smo večino fizalinov detektirali v načinu absorpcija-reflektanca, nekatere pa šele po derivatizaciji z detekcijskim reagentom z 2,5 % žveplove(VI) kisline v načinu fluorescenca-reflektanca. Prav z uporabo derivatizacije smo s HPTLC metodo odkrili nečistoto v edinem komercialno dostopnem standardu (fizalin L). Te nečistote s HPLC–UV metodami ni možno detektirati, z (U)HPLC–MS/MS metodami pa smo potrdili tudi, da je z obstoječimi (U)HPLC metodami ni možno ločiti od fizalina L. S HPTLC–MS/MS metodo smo nečistoto identificirali kot 2,3,25,27-tetrahidrofizalin A. S tem smo potrdili, da HPTLC in HPTLC–MS/MS metodi omogočata alternativno selektivnost, boljše občutljivost in višjo ločljivost kot objavljene (U)HPLC–UV–MS/MS metode za določanje fizalinov. Občutljivost HPTLC–MS/MS metode smo znatno izboljšali z uvedbo dveh zaporednih predrazvijanj plošč, kar je učinkovito zmanjšalo visoko spektralno ozadje in supresijo ionizacije analitov, ki sta posledici uporabe silikagelnih plošč in topila za razvijanje s kislinskim modifikatorjem. Uvedli smo inovativno sočasno sklopitev HPTLC z dvema različnima MS analizatorjema, in sicer s trojnim kvadrupolom in z ionsko pastjo, kar nam je omogočilo zanesljivo in nedvoumno ne-ciljano karakterizacijo fizalinov in določitev njihovih tipov. Uporabnost razvite HPTLC-denzitometrične in HPTLC–MS/MS metode smo potrdili z določanjem fizalinov v neprečiščenih vodnih ekstraktih navadnega volčjega jabolka, pripravljenih z optimizirano hitro in enostavno ekstrakcijo pod refluksom. V različnih delih rastline *P. alkekengi* L. var. *franchetii*, požete v različnih stopnjah zrelosti, smo odkrili razlike v profilih fizalinov. Za nadzor kakovosti rastline *P. alkekengi* L. var. *franchetii* so najbolj primerne povečane čaše, ker imajo spojine iz njih najbolj značilne MS² fragmentacijske vzorce z minimalnimi interferencami.

Ključne besede: *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, fizalini, metilirani flavonoidi, TLC, HPTLC, TLC–MS, HPLC–MSⁿ, UHPLC, NMR, masna spektrometrija, denzitometrija.