

»56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022«

VPLIV TERMIČNE OBDELAVE NA VSEBNOST SOLANINA V KROMPIRJU

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje kemija ali kemijska tehnologija

Mentorici: dr. Petra Kotnik, Anita Mustać

Avtor: Jurij Šuman
II. gimnazija Maribor

Maribor, april 2022

Kazalo vsebine

1	UVOD	1
1.1	Ozadje	1
1.2	Namen	1
1.3	Hipoteze	1
1.4	Metodologija dela	2
2	TEORIJA	3
2.1	Solanin	3
2.1.1	Kemijska sestava solanina	3
2.1.2	Zastrupitev s solaninom	4
2.2	Krompir	5
2.2.1	Zgodovina krompirja	6
2.2.2	Solanin v krompirju	7
2.2.3	Izbira krompirja	7
2.3	Metode za ekstrakcijo in analizo solanina	9
2.3.1	Postopki v ekstrahiranjah	10
2.3.2	Ekstrahiranje	13
2.3.3	Metoda HPLC	14
2.3.4	Masna spektrometrija	16
2.4	Kemikalije uporabljene v eksperimentalnem delu naloge	16
3	METODOLOGIJA DELA	19
3.1	Priprava vzorcev krompirja	19
3.2	Ekstrahiranje	19
3.3	HPLC/MS	21
3.4	Umeritvena krivulja	23
4	REZULTATI IN INTERPRETACIJE REZULTATOV	26
4.1	Rezultati razliĝnih ekstrahiranj	26
4.2	Rezultati razliĝnih vzorcev krompirja	27
5	RAZPRAVA	29
5.1	Hipoteza 1	29
5.2	Hipoteza 2	29
5.3	Hipoteza 3	31

6	ZAKLJUČEK	33
6.1	Potrditev hipotez.....	33
6.2	Odgovori na raziskovalna vprašanja.....	33
6.3	Možnosti nadaljnega raziskavanja in izboljšav	34
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST	35
8	VIRI IN LITERATURA	36
8.1	Članki.....	36
8.2	Varnostni listi	37
8.3	Internetni viri	37
8.4	Viri slik.....	38

Seznam preglednic

Preglednica 1: Mase vzorcev krompirja.....	20
Preglednica 2: Vhodni podatki za umeritveno krivuljo	23
Preglednica 3: Masa solanina izolirana s posamezno ekstrakcijo.....	26
Preglednica 4: Koncentracija solanina pri različnih metodah ekstrakcije.....	26
Preglednica 5: Rezultati ekstrakcije različnih vzorcev krompirja.....	27

Seznam grafov

Graf 1: Spreminjanje koncentracije faze B v odvisnosti od časa.....	22
Graf 2: Vsebnost solanina v surovem krompirju	30
Graf 3: Povprečne vsebnosti solanina v analiziranih vzorcih krompirja	32

Seznam slik

Slika 1: Strukturna formula solanina (ChemSpider, 2022).....	3
Slika 2: Mercator krompir	8
Slika 3: Polonca krompir.....	8
Slika 4: Lidl krompir	9
Slika 5: Centrifuga (Dr. Meditech Surgical & Diagnostics, 2022)	10
Slika 6: Naprava Vorteks (Westlab Group Ltd., 2022).....	11
Slika 7: Rotavapor (BÜCHI Labortechnik AG., 2022).....	12
Slika 8: Shema delovanja SPE (Olivo et al., 2015).....	12
Slika 9: Shema HPLC (Czaplicki, 2013)	15
Slika 10: Agilent 1200 HPLC (Conquer Scientific, 2022).....	21
Slika 11: Grafični prikaz umeritvene krivulje.....	24

Kratice uporabljene v raziskovalni nalogi

HPLC - visoko zmogljiva tekočinska kromatografija (angl. High Performance Liquid Chromatography).

HPLC/MS - visoko zmogljiva tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (angl. High Performance Liquid Chromatography with mass spectrometry)

MeOH - metanol

EtCOOH - etanojska kislina

NaOAc - natrijev acetat

AcN - acetonitril

SPE - ekstrakcija na trdni fazi

POVZETEK

V raziskovalni nalogi ugotavljamo, katere ekstrakcije so najbolj primerne za ekstrahiranje solanina iz krompirja ter kateri načini priprave krompirja najbolj znižajo koncentracijo solanina v krompirju. Vrednost solanina v krompirju smo izmerili tako, da smo najprej solanin ekstrahirali, nato pa opravili HPLC analizo z masno spektrometrijo. Izmed treh izbranih ekstrakcij solanina je bila najučinkovitejša ekstrakcija z metanolom, druga najučinkovitejša ekstrakcija z natrijevim acetatom, najmanj učinkovita pa ekstrakcija s 5% oetno kislino. Poleg ekstrakcij smo primerjali vsebnosti solanina v surovem, kuhanem in pečenem krompirju. Po analizi smo ugotovili, da je največ solanina vseboval surov krompir, malo manj kuhan krompir najmanj pa pečen krompir.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem tako šolski kot zunanji mentorici za vse nasvete, podporo in pomoč predvsem pri eksperimentalnem delu. Iskreno se tudi zahvaljujem vodstvu šole, da je za potrebe izvedbe naloge nabavilo čisti solanin. Prav tako se zahvaljujem vodji analiznega laboratorija na Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru za dovoljenje uporabe laboratorija, kjer sem lahko izvedel ekstrakcije ter HPLC analizo. Nenazadnje se zahvaljujem tudi šolski koordinatorici za raziskovalno dejavnost.

1 UVOD

1.1 Ozadje

Krompir je velik del naše vsakdanje prehrane, torej je razumljivo, da hočemo o krompirju vedeti čim več. Ko je človek raziskoval krompir je ugotovil, da lahko v njemu najdemo tudi nekatere škodljive snovi, med katerimi je tudi solanin. Solanin je glikoalkaloid rastlinskega izvora, ki ga najdemo v nekaterih užitnih rastlinah, med ostalim tudi v krompirju ter v drugih rastlinah, kot sta na primer paradižnik in jajčevce. Solanin služi rastlini kot obramba pred rastlinojedci. Za človeka pa je pomembno, da zaužije čim manj solanina ter tako zmanjša možnosti za zastrupitev z njim.

1.2 Namen

Namen raziskovalne naloge je ugotoviti, kdaj oz. na kak način pripraviti krompir, da bo v njem najmanj solanina. To smo ugotavljali z izvedbo ekstrakcij solanina iz krompirja. Za vzorce smo uporabili isto sorto krompirja Marabel treh različnih slovenskih pridelovalcev krompirja. V sklopu eksperimentalnega dela smo krompir skuhalo ter spekli in z analiziranjem ugotovili, kdaj je v krompirju najmanj solanina. Na osnovi dobljenih rezultatov in ugotovitev bomo pripomogli k boljši izbiri načina priprave krompirja. Prav tako smo na vzorcih primerjali tri vrste ekstrakcije (ekstrakcijo z metanolom, ekstrakcijo z 5% etanojsko kislino ter ekstrakcijo z natrijevim acetatom), s čemer smo ugotavljali katera je primernejša za ekstrakcijo glikoalkaloidov.

Cilj raziskovalne naloge je odgovoriti na naslednja vprašanja:

1. Kateri vzorec krompirja bo imel najmanj solanina?
2. S katerim načinom priprave krompirja bomo najbolj zmanjšali količino solanina?
3. Katera vrsta ekstrakcije bo najbolj učinkovito ekstrahirala glikoalkaloide?

1.3 Hipoteze

Pred raziskovanjem smo postavili naslednje raziskovalne hipoteze:

Hipoteza 1. Izmed izvedenih ekstrakcij bo najbolj učinkovita ekstrakcija z metanolom, malo manj učinkovita bo ekstrakcija z natrijevim acetatom, najmanj učinkovita pa ekstrakcija s 5% etanojsko kislino.

Hipoteza 2. Vsi vzorci krompirja bodo imeli manjšo vsebnost solanina od najvišje priporočene meje.

Hipoteza 3. V surovem krompirju bo največ solanina, malo manj ga bo v kuhanem krompirju, najmanj pa v pečenem krompirju.

1.4 Metodologija dela

Raziskovalnega dela smo se najprej lotili s prebiranjem in preučevanjem literature. Nato smo na osnovi prebrane literature določili tri najbolj izvedljive ter primerne vrste ekstrakcije solanina iz krompirja. Ko smo določimo vrste ekstrakcij, ki smo jih teoretično medsebojno primerjali, smo izbrali primerno vrsto krompirja in pridelovalce. Nato smo pričeli z laboratorijskim delom, kjer smo krompir olupili in nasekljali na manjše koščke in opravili tri vrste ekstrakcij: prva ekstrakcija je opravljena z metanolom, druga s 5% očetno kislino in tretja ekstrakcija z natrijevim acetatom. Ekstrakte smo analizirali z metodo tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo (HPLC/MS).

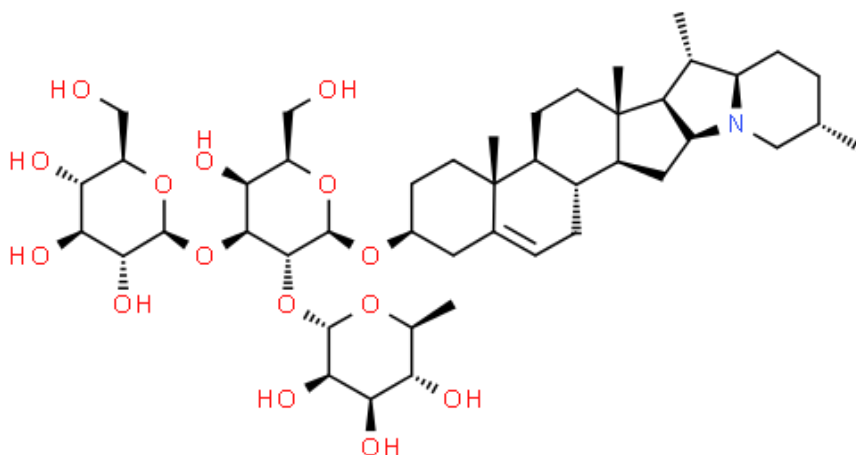
2 TEORIJA

2.1 Solanin

Solanin je organska molekula rastlinskega izvora, ki jo najdemo predvsem v družini razhudnikovk. Rastline družine razhudnikovk sintetizirajo solanin pod vplivom sončne svetlobe in je verjetno stranski produkt njihovega metabolizma. Solanin torej uvrščamo med naravne pesticide. Njegova vsebnost se zviša ob prisotnosti plenilcev. Solanin se najbolj zgosti na površini rastlin, saj tako najhitreje vpliva na plenilce. Za človeka je solanin nevaren že v majhnih dozah. Solanin spada med glikoalkaloide in je bil prvič izoliran leta 1820 iz plodov pasjega zelišča. Spada tudi med saponine - grenke in strupene molekule rastlinskega izvora, ki se penijo v vodi. Vrelišče ima med 271 °C in 273 °C in je pri sobnih pogojih brezbarven kristal. Solanin ni dobro topen v vodi, je pa dobro topen v metanolu. (Wikipedija, 2021)

2.1.1 Kemijska sestava solanina

Solanin ima molekulska formulo $C_{45}H_{73}NO_{15}$ in molsko maso 868,06 g/mol. Slika 1 prikazuje strukturno formulo solanina. Solanin oziroma α -solanin je glikoalkaloid. Glikoalkaloidi so alkaloidi, na katere so vezane sladkorne skupine. Alkaloiden del molekule imenujemo solanidin, sladkorni del molekule pa solatrioza. Medtem ko je α -solanin glikoalkaloid, je β -solanin njegov aglikon. Aglikon je alkaloiden ostanek molekule, ko glikoalkaloid razpade na alkaloidni ter sladkorni del. Glikoalkaloidi so večinoma strupeni in rastlinskega izvora. (Wikipedija, 2021)



Slika 1: Strukturna formula solanina (ChemSpider, 2022)

Sladkorni del solanina je sestavljen iz treh monosaharidov, ti monosaharidi so med seboj povezanih z glikozidnimi vezmi. Prav tako pa so z glikozidno vezjo povezani z alkaloidnim delom molekule. Alkaloidi se klasificirajo kot molekule, ki vsebujejo dušik, kateri je ponavadi vezan v heterociklično strukturo. Solanin ima tako kot večina alkaloidov heterociklični alkaloidni del molekule. Večina alkaloidov ima bazične lastnosti. Alkaloidi so po večini strupene molekule, vendar lahko nekatere uporabljamo tudi v zdravstvene namene. Prav tako pa alkaloidne najdemo v drogah. Med bolj znane alkaloidne sodijo: kofein, morfin, nikotin, kokain, strihnin in kinin. (Wikipedija, 2022)

Solanin rastline sintetizirajo tako, da z zaporedjem hidroksilacij, transaminacij, dehidracij, oksidacij ter redukcij iz holesterola naredijo solandin, na katerega pa z glikozilacijo vežejo tri sladkorne molekule. Glikozilacija je katalizirana s pomočjo encimov. Hidroksilacija je proces, v katerem se na substrat vežejo OH skupine. Transaminacija je proces, pri katerem se amino skupina iz ene aminokisliline prenese na drugo. Dehidracija je proces, pri katerem iz substrata odpade voda. Pri oksidaciji se vsaj enemu atomu v molekuli poveča oksidacijsko število pri redukciji pa zmanjša. (Wikipedija, 2021)

2.1.2 Zastrupitev s solaninom

Solanin je človeku strupena snov, saj v celicah poveča aktivni transport Ca^{2+} ionov iz mitohondrija, kar vodi v povečano membransko napetost mitohondrija in presežek Ca^{2+} ionov v citoplazmi, kar vodi v apoptozo. Zaradi množične apoptoze pride do simptomov kot so: omotičnost, bruhanje in driska. V hujših primerih pa se pojavijo tudi: zlatenica, delna paraliza ter podhladitev. Prve simptome občutimo že po dozi 2 do 5 mg na kg telesne mase. Smrtna doza pa znaša 3 do 6 mg na kg telesne mase. Simptomi se pojavijo 8 do 12 ur po zaužitju, če pa smo pojedli zelo veliko solanina pa že po 10 minutah.¹ (Wikipedija, 2021)

V zgodovini je bilo več smrti zaradi zastrupitve s solaninom. V preteklosti je prišlo do več zastrupitev s solaninom med drugim tudi v Nemčiji leta 1899, ko je 56 nemških vojakov zaužilo vsak po 1 do 1,5 kg kuhanega krompirja. Vojaki so dobili zlatenico in bili delno paralizirani, a so čez nekaj časa vsi okrevali. Povprečen vnos solanina na vojaka naj bi tako znašal 3,4 do 5,1 mg/kg. Nadalje, na Škotskem se je leta 1918, kar 61 ljudi zastrupilo s solaninom preko

¹ Apoptoza je nadzorovana celična smrt, kjer se celica skrči, DNA razreže na manjše kose ter jedro in mitohondriji razpadejo.

»slabega« krompirja, med temi 61 ljudmi je bila 1 smrtna žrtev in sicer je umrl 5-leten deček. Znanstveniki so leta 1933 ocenili, da so ljudje zaužili okoli 3,4 mg solanina na kg telesne mase. Za najbolj množičen primer zastrupitve s solaninom pa verjetno velja zastrupitev iz leta 1979, ko se je preko kuhanega krompirja zastrupilo kar 78 dečkov od katerih jih je bilo kar 17 hospitaliziranih. Ker so bili še dečki, je težko oceniti njihovo povprečno maso in koliko mg solanina so zaužili na kg telesne mase. (Integrated Laboratory Systems, 1998, str. 13-14)

2.2 Krompir

Krompir je trajnica, ki spada v družino razhudnikovk. Poimenovanje krompir smo Slovenci prevzeli iz nemščine, kjer se krompir imenuje *grund Birne*, kar v slovenščini pomeni talna hruška. Krompir je človeku pomemben, saj so njegovi gomolji za človeka užitni in predstavljajo znaten del naše vsakdanje prehrane. Krompir je bil kultiviran nekje pred 7000 do 10000 leti. Danes je četrta najpomembnejša kultivirana rastlina po količini pridelane hrane. Največ krompirja na prebivalca je pridelanega v severni in vzhodni Evropi, medtem ko številčno največ krompirja pridelajo v Indiji in na Kitajskem. Trenutno poznamo okoli 5000 vrst krompirja. V letu 2020 je bilo na svetu pridelanih 359 milijonov ton krompirja, od česar ga je kitajska pridelala kar 22%. (Wikipedija, 2022)

Krompir je ponavadi gojen iz gomoljev, da je klon svojega predhodnika, saj je tako zagotovljeno, da ne prihaja do genskih napak in bolezni, do katerih bi lahko prišlo, če bi krompir gojili iz ploda. Največji problem, ki se pojavlja pri zdravju krompirja je krompirjeva plesen in pa seveda zajedavci kot so koloradski hrošči. Za zaščito pred zajedavci uporablja krompir solanin in druge glikoalkaloide, ki so zelo strupeni in jih zgošči po svoji površini. Seveda pa krompir pred zajedavci tudi umetno brani človek s pesticidi. Po raziskavi opravljeni med letoma 2000 in 2008 je na kar 84% vseh vzorcev bilo možno zaznati sledove vsaj enega pesticida. Ko je krompir spravljeno, se za teden ali dva postavi v temno in razmeroma toplo okolje med 10 °C in 16 °C, da se »popravi« vsa škoda, ki je bila narejena na krompirjev olup med pobiranjem. Pomembno je, da se v tem času olup pozdravi, da krompir kasneje ne izgublja vode ter da ne pride do infekcije. Krompir je nato shranjen v temnem in dobro prezračnem okolju pri temperaturi 4 °C. Če je temperatura okolja pod 4 °C začne škrob denaturirati na manjše enote, kar privede pri kasnejši toplotni obdelavi krompirja do večje količine akrilamida, še posebej, ko krompir pečemo v olju. Kaljenje krompirja je preprečeno z raznimi kemikalijami med njimi

tudi z etenom in 1,4-dimetilnaftalenom. Krompir shranjen na tak način lahko ostane užiten od 10 do 12 mesecev po pobiranju.² (Wikipedija, 2022)

2.2.1 Zgodovina krompirja

Potrebno se je tudi dotakniti zgodovine krompirja, da razumemo njegovo vlogo v razvoju moderne civilizacije in da bi lažje razumeli zakaj se moramo dobro osvestiti o krompirju. Krompir kot vrsta se je razvil na območju Andov od koder je bil po Kolumbovem odkritju Amerike leta 1492 prenesen povsod po svetu. Pred Kolumbovim odkritjem Amerike so na območju Andov živel Ameriška ljudstva, ki so se zaradi dovoljšnih zalog hrane, tudi krompirja, lahko razvila kot civilizacije, katerih ostanke lahko vidimo še danes. Krompir se je v časih pred Kolumbom zelo razlikoval od vasi do vasi po vrstah, saj so bile vasi na različnih nadmorskih višinah, imele so različne povprečne temperature ipd. Krompir je v novem veku odrešil Evropo lakote in tako omogočil, da so se Evropejci hitreje širili po svetu in ustanavljali kolonije. Krompir je bil torej gonilo hitrega vzpona zahodne civilizacije. Prav tako so zaradi krompirja nastali prvi umetni pesticidi, saj so ga ljudje morali zaščititi pred koloradskim hroščem, ki velja za enega izmed njegovih največjih zajedavcev. Začetni pesticidi so bili bazirani na arzeniku. (Mann, 2011)

Ko je krompir najprej prišel v Evropo, ga ljudje najprej niso upali zaužiti, saj je bil novost iz Amerike, prav tako pa se ni, kot druge znane kulturne rastline, razvijal samo iz semena, ampak lahko zraste tudi iz gomolja kot klon. Nekateri so govorili, da krompir povzroča gobavost drugi pa, da je to nezemeljska hrana. Filozof-kritičar Diderot je v svoji Enciklopediji (1751-65) zapisal, da je krompir brez okusa ne glede na način priprave, a je dovolj dober vir hrane za proletariat. V času Ludvika XVI., po osamosvojitvi Amerike, pa so Francozi zaradi pomanjkanja kruha pričeli pridelovati in jesti krompir in tako preprečili množično lakoto. V Evropi so kmetje za pridelovanje krompirja postopoma le začeli uporabljati njihove obdelovalne površine, tudi vse do polovice skupne površine njihovih njiv. Dandanes krompir predstavlja znaten del svetovne zaloge hrane. (Mann, 2011)

² Akrilamid je kancerogena snov, ki nastane pri termični obdelavi.

2.2.2 Solanin v krompirju

V krompirju najdemo solanin. Solanin se nahaja v vseh delih rastline vključno z gomolji, ki so eden izmed večjih virov hrane za človeštvo. Zgornja meja za človeka določene najvišje priporočene vsebnosti solanina v gomolju krompirja je 0,2 miligrama solanina na gram gomolja. Rastline iz družine razhudnikovk uporabljajo solanin za zaščito pred plenilci in zajedavci. Če je v okolju več zajedavcev oziroma rastlinojedih živali, bodo rastline tudi sintetizirale več solanina. Solanin se sintetizira ob sončni svetlobi, zato ga v gomoljih ni tako veliko in prav zato je pomembno, da krompir shranjujemo v temnem okolju. Povprečen gomolj vsebuje 75 µg solanina na gram krompirja s tem, da je med 35% in 96% vsega solanina v olupku gomolja, saj bi plenilci najprej zaužili olupek in bi jih ta že z grenkim okusom solanina in njegovo strupenostjo odvrnil od zaužitja. Če so gomolji med shranjevanjem izpostavljeni svetlobi se solanin začne še dodatno sintetizirati, z njim pa tudi klorofil in tako postane vsebnost solanina v gomolju višja, s tem pa je gomolj še bolj strupen. Bolj strupeni gomolji so torej tisti, ki so bolj zelenkaste barve, saj se je v njih sintetiziral tudi klorofil, ki daje značilno zeleno barvo. (Ostrý et al., 2010) (Wikipedija, 2021)

Z obdelavo krompirja se vsebnost solanina zmanjša. Če krompir kuhamo se vsebnost solanina zmanjša za 1,2%. Če pa krompir pečemo vsaj pri temperaturi 170 °C se začne solanin denaturirati in se njegova vsebnost začne manjšati in dlje kot krompir pečemo bolj se zniža vsebnost solanina. Ocenjeno je, da če krompir pečemo pri 210 °C približno 10 minut se vsebnost solanina zmanjša do 40%. Koncentracija solanina se v krompirjevih produktih zviša, če iz njih odstranimo vodo. (Distl et al., 2009) (Wikipedija, 2021)

2.2.3 Izbira krompirja

V eksperimentalnem delu raziskovalne naloge smo uporabili tri različne vzorce krompirja. Odločili smo se, da kupimo krompir treh različnih pridelovalcev, s ciljem da ugotovimo ali prihaja med posameznimi pridelovalci do velikih odstopanj v vsebnosti solanina, in da z uporabo večih vzorcev dobimo ustrezne podatke o povprečni vsebnosti solanina v krompirju. Da ne bi kupili popolnoma različnih krompirjev in tako dobili nepredvidljiva odstopanja v rezultatih, smo si pred izbiro krompirja zastavili dva kriterija in sicer:

- a) Poreklo izbranega krompirja mora biti Slovenija, da bo analiza solanina v krompirju koristna ter bi iz rezultatov lahko razbrali ali v Sloveniji pridelujemo krompir z nizko ali visoko vsebnostjo solanina.

- b) Krompir različnih pridelovalcev naj bo enake sorte, da bodo vzorci čim bolj sorodni in bomo lahko v primeru različnih rezultatov sklepali na razlike v pridelavi oziroma skladiščenju krompirja različnih pridelovalcev.

Z upoštevanjem navedenih kriterijev smo kupili naslednje krompirje:

1. Krompir sorte Marabel s kmetije Šlamberger iz Zrkovc pri Mariboru (slika 2). Krompir smo kupili v Mercatorju v 2,5 kilogramskem pakiranju. V nadaljevanju naloge bo krompir tega pridelovalca poimenovan kot Mercator krompir.



Slika 2: Mercator krompir

2. Krompir sorte Marabel pridelovalca Polonca, lokacija kmetije je Kranj (slika 3). Krompir smo prav tako kupili v Mercatorju v 2,5 kilogramskem pakiranju. V nadaljevanju naloge bo krompir tega pridelovalca poimenovan kot Polonca krompir.



Slika 3: Polonca krompir

3. Krompir sorte Marabel s kmetije Štular iz Strahinja (slika 4). Krompir smo kupili v Lidlju v 2 kilogramskem pakiranju. V nadaljevanju naloge bo krompir tega pridelovalca poimenovan kot Lidl krompir.



Slika 4: Lidl krompir

V raziskovalni nalogi smo uporabili krompir sorte Marabel, saj je le-ta najbolj pogosto na zalogi v trgovinah ter ga pridelujejo vsaj trije različni večji Slovenski pridelovalci. Krompir sorte Marabel je srednje zgodnja sorta krompirja, kar pomeni, da se pobira nekje od 70 do 85 dni po setvi. Sorta krompirja Marabel je občutljiva na virusne bolezni, gomolji pa so manj občutljivi na krompirjevo plesen. Krompir te sorte je tudi najbolj primeren za kuhanje ali pečenje, kar je njegova dobra lastnost, saj smo v eksperimentalnem delu primerjali vsebnost solanina v surovem, kuhanem in pečenem krompirju. (Dolničar, 2011)

2.3 Metode za ekstrakcijo in analizo solanina

Z namenom, da izmerimo vsebnost solanina v različno pripravljenih krompirjih, smo najprej opravili pregled literature in preučili, kako so do vsebnosti solanina v krompirju prišli drugi avtorji ter ugotavljali, kakšne postopke so pri tem uporabljali. Pri tem smo morali upoštevati omejitve glede možnosti izvedbe eksperimentalnega dela v našem laboratoriju. Po preučitvi virov smo ugotovili, da so avtorji do rezultatov po veliki večini prišli s pomočjo različnih ekstraktij solanina, nato pa so ekstrakte analizirali s HPLC metodo z masno spektrometrijo. (Distl et al., 2009), (Nielsen et al., 2020), (Liu et al., 2014), (Friedman et al., 2018)

V nadaljevanju podajmo opis posameznih postopkov za ekstrakcije uporabljene v pregledani literaturi, sledi opis ekstraktij v celoti ter nato še natančen opis metode HPLC in masne spektrometrije.

2.3.1 Postopki v ekstraktijah

1. Ultrasonifikacija je proces, ki lahko traja od 1 minute do nekaj ur odvisno od analita. Pri ultrasonifikaciji mora biti analit raztopljen oziroma v tekočini. Pri ultrasonifikaciji se v tekočino pošilja ultrazvok (zvok s frekvenco višjo od 20 kHz), ki ustvari v tekočini razredčine v obliki vakuumskih mehurčkov, ki so pod izjemnim tlakom ti pa, ko se sesedejo očistijo površinsko umazanijo. (Wikipedija, 2021)
2. Centrifugiranje je proces, pri katerem s centrifugalno silo ločimo delce z večjo molekulsko maso od delcev z manjšo molekulsko maso. Do ločitve pride, ker se delci z večjo molekulsko maso pri veliki centrifugalni sili prej začnejo usedati, kot delci z manjšo molekulsko maso. Delci z večjo molekulsko maso se oborijo na dnu posode, tekočini, ki ostane nad oborino po centrifugiranju, pa rečemo supernatant. Pri centrifugiranju lahko določamo tri spremenljivke: a) hitrost v obratih na enoto časa, b) čas centrifugiranja ter c) temperaturo med centrifugiranjem, saj temperatura vpliva na gostoto tekočine, ki jo centrifugiramo in včasih je potrebno gostoto tekočine zmanjšati, da se lahko delci sploh začnejo ločevati. Centrifuga je naprava, ki opravlja centrifugiranje in jo poganja elektromotor (slika 5). (Wikipedija, 2021)



Slika 5: Centrifuga (Dr. Meditech Surgical & Diagnostics, 2022)

3. Vorteksiranje je proces podoben ročnem mešanju le, da je opravljen strojno. Vorteks (naprava, ki opravlja vorteksiranje; slika 6) meša raztopino hitro, pri čemer lahko nastavimo intenziteto mešanja. Vorteksiranje lahko zmeša dve snovi, ki ju ročno ne bi zmogli, saj ne bi proizvedli dovolj kinetične energije. (Wikipedija, 2021)



Slika 6: Naprava Vorteks (Westlab Group Ltd., 2022)

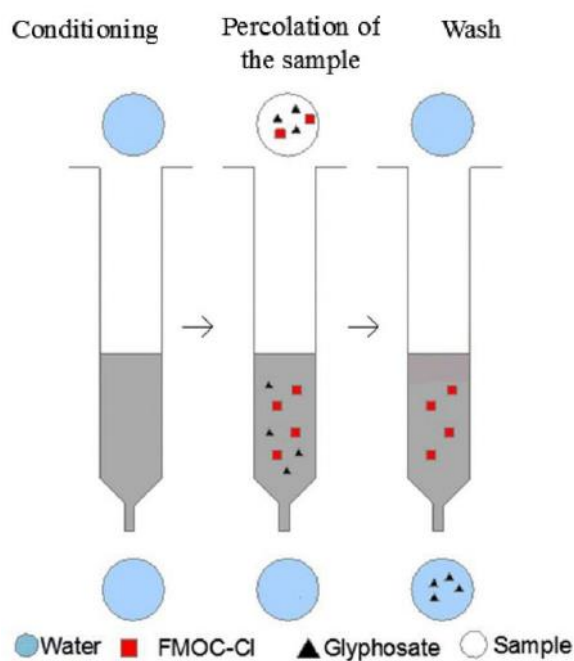
4. Vakuumsko uparjanje je proces, pri katerem izparimo topljence s pomočjo podtlaka. Izhlapovanje opravljamo v napravi, ki ji rečemo rotacijski uparjalnik in je sestavljena iz naslednjih delov (slika 7):
- motorja, ki vrti čaše, v katerih je raztopina, iz katerih želimo pridobiti topljence,
 - parnega kanala, okoli katerega se vzorci vrtijo in je vakuumsko tesen,
 - enote, ki postopoma ustvarja vedno večji podtlak,
 - tople kopeli, ki segreva čaše in vzorce v njih,
 - kondenzatorja, skozi katerega je speljana cev, v kateri je hladna snov, kot na primer suhi led in
 - zbirne posode, ki pobira kondenzirano snov.

Pri vakuumskem uparjanju želimo z ustvarjanjem podtlaka znižati temperaturo vrelišča topljencev ter jih tako upariti pri nižji temperaturi. Uparjeni topljenci potujejo po parnem kanalu do kondenzatorja, kjer se kondenzirajo in stečejo v zbirno posodo. Tako ločimo topljence od topila. V kolikor ima topilo nižje vrelišče pa najprej odparimo topilo, nato pa uparimo željene topljence oziroma željeni topljenci ostanejo v čašah v obliki suhe snovi. (Wikipedija, 2021)



Slika 7: Rotavapor (BÜCHI Labortechnik AG., 2022)

5. Čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) je proces, pri katerem filtriramo vzorec s pomočjo kromatografije. Vzorec spustimo skozi SPE kartušo (slika 8) in želene snovi se bodo ali absorbirale na stacionarno fazo (v tem primeru neželene snovi stečejo skozi kartušo) ali pa bodo nemoteno stele skozi kartušo (v tem primeru se na stacionarno fazo absorbirajo nezaželene snovi). (Wikipedija, 2021)



Slika 8: Shema delovanja SPE (Olivo et al., 2015)

2.3.2 Ekstrakcije

Prva ekstrakcija, ki smo jo zasledili v dostopni literaturi, je bila izvedena na različnih krompirjevih produktih na način, da so avtorji krompir najprej lizofilirali in ga nato speštali na manjše koščke s pomočjo terilnice in pestila. Odtehtali so od 3 do 10 g vzorca (odvisno od produkta in njegove predvidene vsebnosti solanina npr. popolnoma suhi produkti, kot so prašek za pire krompir, imajo visoke koncentracije solanina in zato ni potrebno zatehtati 10g vzorca), ga raztopili v 20 mL etanojske kisline in metanola v razmerju (70:30, V:V) ter ultrasonificirali 1 minuto. Nato so vzorec 5 minut centrifugirali pri sobni temperaturi s hitrostjo 4000 rotacij/minuto. V zadnji fazi so iz centrifugirne posode odmerili 1 mL supernatanta ter ga skozi SPE kartušo dali na analizo. (Distl et al., 2009)

Druga ekstrakcija, ki je bila preučena, je bila ekstrakcija solanina iz izoliranih krompirjevih beljakovin. V tej ekstrakciji so avtorji testirali 7 različnih izolatov krompirjevih beljakovin. Najprej so 10 mg izolata krompirjevih beljakovin dodali v 1,98 mL 5% etanojske kisline ter 0,02 mL internega standarda, iz katerega so kasneje pri analizi s tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo naredili umeritveno krivuljo. Ko so dodali izolat krompirjevih beljakovin v 5% etanojsko kislino in interni standard so raztopino mešali 15 minut, nato pa vzorec centrifugirali 15 minut z rotacijsko silo 14000g oziroma 14000 kratnikom sile težnostnega pospeška. Mešanje so izvajali pri 4 °C. Po centrifugiranju so vzorce filtrirali še s pomočjo SPE kartuše, mobilno fazo po izhodu iz kartuše so nato še filtrirali z 0,2 µm membranskim filtrom. S tem je bil vzorec pripravljen na analizo s HPLC metodo z masno spektrometrijo. (Nielsen et al., 2020)

Tretja ekstrakcija, ki je bila preučena, je bila ekstrakcija solanina iz komercialnega čipsa. Ekstrakcijo so začeli tako, da so 0,5 g čipsa vstavili v 50 mL teflonske centrifugirne posode, ki so vsebovale 5 mL vode ter vorteksirali zmes 1 minuto. Nato so dodali 25 mL acetonitrila (AcN) in metanojske kisline v razmerju (99:1, V:V) in zmes vorteksirali 3 minute. Zatem so dodali 2 g MgSO₄ in 1 g natrijevega acetata (NaOAc) in 30 sekund pretresali centrifugirno posodo, nato pa zmes še vorteksirali 1 minuto. Po tretjem vorteksiranju so zmes 8 minut centrifugirali pri 4 °C s hitrostjo 9000 rotacij/min. Po centrifugiranju so 0,5 mL supernatanta uparili do suhega pod dušikovo atmosfero pri 40 °C. Suh ostanek so nato raztopili z 10 mL vode in AcN v razmerju 1:1 ter 1 mL raztopine filtrirali skozi 0,22 µm membranski filter. S tem je bil vzorec

pripravljen na analizo z UPLC metodo z masno spektrometrijo. UPLC kromatografija je enaka HPLC kromatografiji le, da deluje pod še višjim tlakom. (Liu et al., 2014)

Četrta ekstrakcija, ki je bila preučena, je bila ekstrakcija solanina iz krompirjevih olupkov. Uporabljenih je bilo 100 mg strtih olupkov, katerim je bil dodan 1 mL 50% etanola z 0,5% etanojsko kislino. Vzorec je bil nato 6x vorteksiran na 10 minut. Po vorteksiranju je bil vzorec centrifugiran pri nedoločeni temperaturi s silo 10000g. Supernatant je bil nato očiščen s SPE kartušo in nato je bila uparjena še mobilna faza (filtrat), ki je prišla skozi SPE kartušo. Po uparitvi so trdni ostanek raztopili v 1 mL 50% etanolu. S tem je bil vzorec pripravljen na analizo s HPLC metodo z masno spektrometrijo. (Friedman et al., 2018)

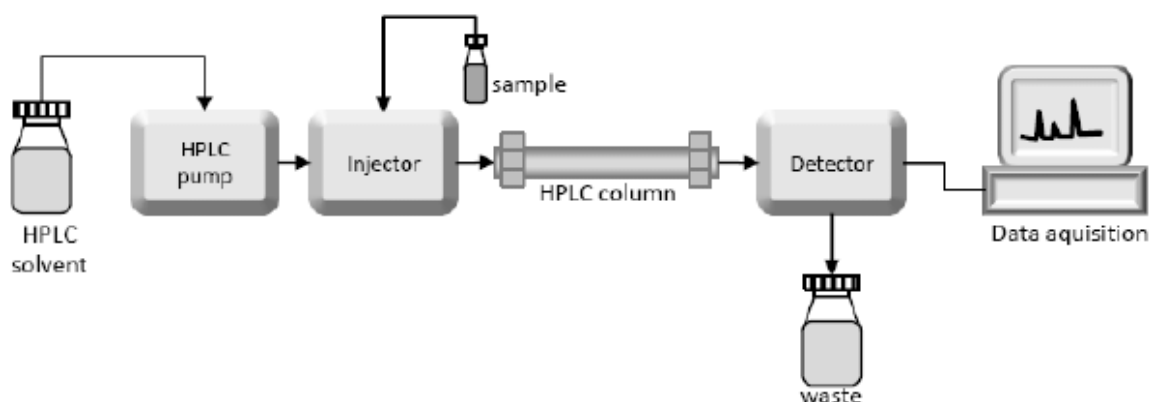
Izmed preučenih in zgoraj opisanih ekstraktov smo se odločili, da bomo v eksperimentalnem delu primerjali prve tri opisane ekstrakcije z manjšimi modifikacijami, saj nismo imeli na razpolago SPE kartuš. V raziskovalni nalogi smo te tri metode ekstrakcije z modifikacijami, poimenovali na kratko in sicer je prva od opisanih ekstraktov imenovana ekstrakcija z metanolom (MeOH), druga je imenovana ekstrakcija s 5% etanojsko kislino (EtCOOH) in tretja ekstrakcija z natrijevim acetatom (NaOAc).

2.3.3 Metoda HPLC

Kratice HPLC predstavlja okrajšavo za angleški prevod naziva metode to je *High Performance Liquid Chromatography*, kar v slovenščini pomeni visoko zmogljiva tekočinska kromatografija. HPLC deluje na principu adsorpcije vzorcev na kromatografsko kolono oziroma stacionarno fazo. Kolona je sestavljena iz različnih delcev, ki različno delujejo na vzorce. Skozi kolono pod visokim pritiskom tako pošljemo vzorce raztopljene v ustreznem topilu (npr. v MeOH, vodi ali AcN). Koncentracija topil se lahko skozi čas analiziranja spreminja, saj v različnih topilih različne molekule različno reagirajo s kolono. Topila se namreč obravnavajo kot mobilna faza. Naprava za HPLC analizo je sestavljena iz različnih modulov: razplinjevalca, črpalke, injektorja in detektorja. (Wikipedija, 2022)

Naprava HPLC deluje tako, da injektor vbrizga vzorec v mobilno fazo, ki vzorec prenese, v kolono. Črpalke poskrbijo za pravo sestavo topil v mobilni fazi in hitrost pretoka mobilne faze skozi kolono. Če lahko črpalke spreminjajo koncentracije topil v mobilni fazi, lahko izvajamo HPLC meritve z gradientno metodo. Detektorji zaznajo, koliko vzorca se je eluiralo iz kolone

in te podatke zajemamo z računalnikom, ki jih kvantificira (odziv poda v številkah). V našem primeru je detektor, ki podatke kvantificira masni spektrometer, vendar to ni edini možen detektor, uporabljajo se npr. tudi ultravijolično-vidna spektroskopija. V večini HPLC kolon lahko tudi spreminjamo temperaturo za različne interakcije vzorca s kolono. Ko vbrizgamo vzorec v mobilno fazo, se delci v vzorcu skozi kromatografsko kolono premikajo z različnimi hitrostmi, zaradi adsorbance kromatografske kolone. Čas, po katerem pride delec skozi kolono, se imenuje retenzijski čas. Obstaja veliko različnih kromatografskih kolon, ki se razlikujejo po velikosti delcev. Iz kolon z manjšimi delci dobimo bolj natančne rezultate, a morajo te kolone delovati pod višjim pritiskom. In bolje kot se delci topijo v mobilni fazi, hitreje gredo skozi kromatografsko kolono. Če uporabljamo gradientno metodo in spreminjamo koncentracijo mobilne faze, bodo delci potovali različno hitro glede na trenutno sestavo mobilne faze. Slika 9 prikazuje shematski prikaz delovanja naprave HPLC. (Wikipedija, 2022)



Slika 9: Shema HPLC (Czaplicki, 2013)

V primeru solanina je najbolj smiselna uporaba kromatografije z obratno fazo, kjer je kolona nepolarna vzorec pa malo polaren. Primer nepolarne kolone je kolona C_{18} , ki smo jo uporabili tudi v našem primeru. Pri kromatografiji z obratno fazo je mobilna faza ponavadi polarna ter tako še dodatno upočasni retenzijski čas delcev vzorca. Če je mobilna faza voda, se retenzijski čas delcev vzorca večja z njihovo hidrofobnostjo. V našem eksperimentu smo imeli najprej polarno mobilno fazo v obliki vode, a smo z gradientno metodo počasi povečevali koncentracijo acetonitrila ter tako zviševali hitrost potovanja analiziranih delcev skozi kolono. Pri kromatografiji z obratno fazo je potrebno biti pozoren na kontroliran pH, saj lahko v različnih pH-jih polarnost delcev variira. Če pri kromatografiji z obratno fazo interakcije z delci detektiramo z masnim spektrometrom, ponavadi dodamo v mobilno fazo majhno koncentracijo mravljične ali očetne kisline. (Wikipedija, 2022)

2.3.4 Masna spektrometrija

Z uporabo kromatografske kolone in HPLC metode lahko dobro razločimo posamezne delce v vzorcu glede na njihovo polarnost. Ko ločimo vzorec na posamezne delce, moramo te delce samo še zaznati in te zaznave kvantificirati. To smo v našem eksperimentu storili s masno spektrometrijo. Masna spektrometrija je način zaznave delcev, ki delce najprej ionizira z obstreljevanjem z ioni, elektroni ter fotoni in delci zato razpadejo na manjše ionizirane delce v plinastem stanju. Ti delci napredujejo v naslednji del masnega spektrometra, kjer masni spektrometer ionizirane delce loči glede na njihovo razmerje mase in naboja (m/e , v nekateri literaturi je naboj lahko označen tudi z malo črko z), nakar gredo ioni v tretji del masnega spektrometra, kjer masni spektrometer izmeri količino posameznih delcev z določenim razmerjem mase in naboja ter tako kvantificira podatke, ki se prikažejo na zaslonu masnega spektrometra. (Wikipedija, 2022)

2.4 Kemikalije uporabljene v eksperimentalnem delu naloge

Pred začetkom izvajanja eksperimenta smo se morali seznaniti s kemikalijami, ki smo jih kasneje uporabili, da zagotovimo varnost pri delu. V eksperimentu smo uporabljali naslednje kemikalije:

1. Metanol (MeOH): je snov, ki je pri sobnih pogojih v tekočem agregatnem stanju, ima vonj po alkoholu ter tališče pri -98 °C in vrelišče pri 65 °C (pod tlakom $101,3\text{ kPa}$). Metanol je pri sobnih pogojih redkejši od vode in ima molekulsko maso $32,04\text{ g/mol}$. Metanolovi H stavki so sledeči: metanol je strupen pri zaužitju, stiku s kožo ali pri vdihavanju (H301+H311+H331), prav tako pa lahko ob stiku škoduje očesu (H370). V skladu z navedenimi nevarnostmi metanola je potrebno upoštevati naslednje previdnostne stavke: ne jesti, piti ali kaditi med uporabo tega izdelka (P270), nositi zaščitne rokavice/zaščitno oči (P280), pri vdihavanju prenesti osebo na sveži zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje (P304+P340), pri izpostavljenosti ali sumu izpostavljenosti pokličite Center za zastrupitve/zdravnika (P308+P311). (Carl Roth GmbH + Co KG, 2021)
2. Acetonitril s 1% mravljično kislino (AcN s 1% HCOOH) je pri sobnih pogojih brezbarvna tekočina z malo sladkim vonjem, ki ima tališče pri $-45,7\text{ °C}$ in vrelišče pri $81,65\text{ °C}$ (pod normalnim tlakom $101,3\text{ kPa}$). Acetonitril s 1% mravljično kislino je pri sobnih pogojih redkejši od vode in ima povprečno molekulsko maso $41,10\text{ g/mol}$. H stavki acetonitrila s

1% mravljično kislino so sledeči: lahko vnetljiva tekočina in hlapi (H225), zdravju škodljivo pri zaužitju, stiku s kožo ali pri vdihavanju (H302+H312+H332), povzroča hudo draženje oči (H319). V skladu z navedenimi nevarnostnimi stavki moramo pri uporabi te kemikalije upoštevati naslednje previdnostne stavke: hraniti ločeno od vročine, vročih površin, isker, odprtega ognja in drugih virov vžiga, kajenje prepovedano (P210), nositi zaščitne rokavice/zaščito za oči (P280), pri stiku z očmi previdno izpirati z vodo nekaj minut, odstraniti kontaktne leče in nadaljevati z izpiranjem (P305+P351+P338). (Carl Roth GmbH + Co KG, 2021)

3. 5% očetna kislina (EtCOOH) je pri sobnih pogojih brezbarvna tekočina jedkega vonja in ima tališče pri 16,64 °C in vrelišče pri 117,9 °C (pod normalnim tlakom 101,3 kPa). 5% očetna kislina ima pH nižji od 7 in ima kisle lastnosti. Očetna kislina je pri sobnih pogojih gostejša od vode za 0,04 g/cm³. Očetna kislina ima molsko maso 60,05 g/mol. H stavki 5% očetne kisline se glasijo: povzroča draženje kože (H315), povzroča hudo draženje oči (H319). Zaradi navedenih stavkov o nevarnosti se moramo pri uporabi te kemikalije ravnati po naslednjih previdnostnih stavkih: nositi zaščitne rokavice/zaščito za oči (P280), po uporabi temeljito umiti izpostavljeno kožo (P264), pri stiku s kožo umiti z veliko vode (P302+P352), pri stiku z očmi previdno izpirati z vodo nekaj minut, odstraniti kontaktne leče in nadaljevati z izpiranjem (P305+P351+P338), če nastopi draženje kože poiskati zdravniško pomoč/oskrbo (P332+P313), če draženje oči ne preneha poiskati zdravniško pomoč/oskrbo (P337+P313), sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo (P362+P364) (LabChem Inc, 2018)
4. Natrijev acetat (NaOAc) je pri sobnih pogojih brezbarven prah brez specifičnega vonja v vodni raztopini je bazičen in ima pH višji od 7. Natrijev acetat ima tališče pri 324 °C in vrelišče pod 400 °C (pod navadnim zračnim tlakom 101,3 kPa). Natrijev acetat ima gostoto manjšo od vode in ni posebej nevarna snov ter nima stavkov o nevarnosti in previdnosti. (Kemika d.d., 2004)
5. Magnezijev sulfat (MgSO₄) je trdna belkasta snov, ki je v našem primeru strta v prah. Magnezijev sulfat nima vonja in je rahlo bazičen v vodni raztopini pri sobnih pogojih s pH 7,9. Magnezijev sulfat je gostejši od vode in ima molekulska maso 120,40 g/mol.

Magnezijev sulfat ni posebej nevarna snov ter nima stavkov o nevarnosti in previdnosti.
(Carl Roth GmbH + Co KG, 2020)

Z upoštevanjem previdnostnih stavkov za zgoraj navedene kemikalije smo se s primerno zaščito lotili eksperimentalnega dela naloge.

3 METODOLOGIJA DELA

3.1 Priprava vzorcev krompirja

Pred ekstrakcijo solanina in analizo ekstrakta smo najprej pripravili vzorce krompirja. Kot že omenjeno v teoretičnem delu, smo izbrali krompir sorte Marabel treh različnih slovenskih pridelovalcev. Krompir smo pripravljali na tri različne načine:

- Pri prvem načinu smo krompir pustili surov in ga le olupili, nasekljali na majhne koščke ter iztisnili krompirjev sok s pomočjo noža.
- Pri drugem načinu smo krompir najprej olupili in nasekljali na majhne koščke ter ga nato kuhali okoli 2 uri v vreli vodi.
- Pri tretjem načinu smo krompir olupili, narezali na večje kose in ga pekli 70 minut pri 180 °C, nato pa smo pečen krompir še speštali.

3.2 Ekstrakcije

V raziskovalni nalogi smo primerjali tri vrste ekstrakcije. Primerjali pa smo jih tako, da smo vse tri ekstrakcije izvedli na istem vzorcu (surov Mercator krompir) ter primerjali, kolikšne vsebnosti solanina smo uspeli izmeriti s posameznimi ekstrakcijami.

Prva opravljena ekstrakcija je bila ekstrakcija z MeOH. Pri tej ekstrakciji smo najprej zatehtali 4,9886 g krompirja v 25 mL metanola. Nato smo to raztopino postavili v ultrazvočno kopel za 32 minut. Po 32 minutah smo vzeli raztopino iz ultrazvočne kopeli ter jo prefiltrirali v čašo skozi 0,2 µm membranski filter. Iz čaše smo nato s pomočjo pipete prenesli 10 mL vzorca v bučko, in uparili topilo, dokler ni ostala le še suha snov. Suhi snovi je nato bilo dodano 2 mL metanola, v katerem smo suho snov s pomočjo 30 minutne ultrasonifikacije raztapljali, vendar se vse ni raztopilo. Raztopile se niso komponente, ki niso topne v metanolu, kar pa ne vpliva na koncentracijo solanina. Po raztapljanju z ultrasonifikacijo smo raztopino še enkrat prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. Po filtraciji je filtrat bil pripravljen na analizo. Po analizi smo ugotovili, da se pri tem načinu ekstrakcije ne izločijo ogljikovi hidrati, ki lahko motijo analizo, zato je tudi nismo izbrali za nadaljnje delo.

Druga opravljena ekstrakcija je bila ekstrakcija s 5% EtCOOH. Pri tej ekstrakciji smo najprej zatehtali 4,9907 g krompirja v 25 mL 5% očetne kisline. Nato smo to raztopino postavili v ultrazvočno kopel za 32 minut. Po 32 minutah smo vzeli raztopino iz ultrazvočne kopeli ter jo prefiltrirali v čašo skozi 0,2 μm filter. Iz čaše smo nato s pomočjo pipete prenesli 10 mL vzorca v bučko, in uparili topilo z rotacijskim uparjalnikom, dokler ni ostala samo še suha snov. Zaradi velike vsebnosti vode, ki je težko uparljiva pri temperaturi 40 °C, smo raztopino pri vakuumu uparjali dlje časa, da je ostala samo še suha snov. Suho snov smo nato raztopili v 2 mL metanola s pomočjo 30 minutne ultrasonifikacije, a se kot pri prvi ekstrakciji vsa suha snov ni raztopila v metanolu. Po raztapljanju s ultrasonifikacijo smo raztopino še enkrat prefiltrirali skozi 0,2 μm filter. Pri tej ekstrakciji so bile izmerjene vsebnosti solanina najnižje in zato te ekstrakcije nismo uporabljali pri nadaljnjem delu.

Tretja opravljena ekstrakcija je bila ekstrakcija z NaOAc. Pri tej ekstrakciji smo najprej zatehtali 0,4954 g krompirja v centrifugirno posodo s 5 mL vode in zmes 1 minuto vorteksirali. Nato smo dodali 25 mL AcN z 1% HCOOH in zmes vorteksirali 3 minute. Nato smo v zmes zatehtali 2 g MgSO_4 in 1 g NaOAc. Potem, ko smo dodali MgSO_4 in NaOAc, smo 30 sekund zmes mešali ročno, nato pa še 1 minuto vorteksirali. Po vorteksiranju smo zmes 8 minut centrifugirali pri 4 °C s hitrostjo 9000 r/min. Po centrifugiranju smo 10 mL supernatanta odmerili v bučko za uparjanje. Nato smo uparili raztopino, da je ostala samo še suha snov. Suho snov smo nato raztopili v 2 mL metanola s 30 minutno ultrasonifikacije. Ko se je suha snov raztopila v metanolu, je bila pripravljena za analizo. To metodo ekstrakcije smo tudi izbrali za nadaljnje delo primerjanja različnih vzorcev krompirja. To ekstrakcijo smo izbrali zato, ker smo z njo izmerili drugo najvišjo vsebnost solanina, hkrati pa so se s to ekstrakcijo izločili ogljikovi hidrati, ki bi lahko motili analizo. Torej smo opravili vse nadaljnje ekstrakcije po tem postopku.

V naslednji preglednici 1 so zapisane vse točne mase vzorcev krompirja, ki so bili uporabljeni v ekstrahiranjah za primerjavo vzorcev, in predstavljajo vhodne podatki za natančno računanje rezultatov.

Preglednica 1: Mase vzorcev krompirja

vzorci	masa (mg)
Surov Mercator	495,6

Surov Lidl	491,2
Surov Polonca	512,6
Pečen Mercator	494,5
Pečen Lidl	526,4
Pečen Polonca	481,6
Kuhan Mercator	506,5
Kuhan Lidl	495,8
Kuhan Polonca	504,5

3.3 HPLC/MS

Po ekstrakciji smo opravili še analizo vzorcev s HPLC metodo z masno spektrometrijo. V postopku je bila uporabljena kromatografska kolona Phenomenex Kinetex C18 dimenzije $2,1 \times 50$ mm. Velikost delcev kolone pa je bila $2,6 \mu\text{m}$. Za ločitev je bil uporabljen aparat Agilent 1200 HPLC s kvarterno črpalko (najvišji tlak 400 bar) (slika 10), avtomatskim vzorčevalnikom ter termostatom. Za detektiranje delcev smo uporabili masni spektrometer. Za analizo vzorca smo uporabili vir ionizacijske energije Agilent 6460 JetStream. Programska oprema, ki je vodila napravo se imenuje Agilent MassHunter Workstation (Agilent technologies, Inc.), s katero je bila izvedena kvantifikacija solanina.

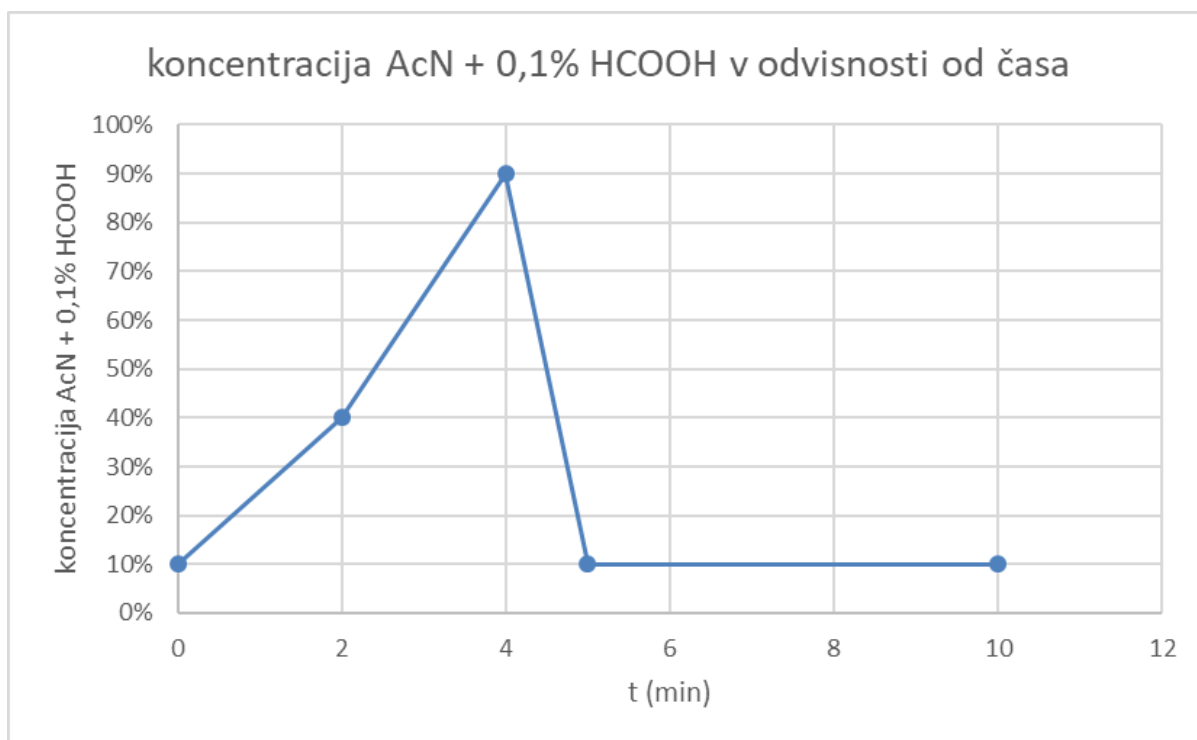


Slika 10: Agilent 1200 HPLC (Conquer Scientific, 2022)

Po končani ekstrakciji smo ekstrakt raztopljen v 2 mL metanola prelili v vialo. Pri HPLC kromatografiji smo uporabili dve mobilni fazi in sicer fazo A, ki jo je sestavljala H₂O z 0,1% mravljične kisline, ter fazo B, ki jo je sestavljala acetonitril z 0,1% mravljične kisline.

Pri HPLC je bila uporabljena gradientna metoda, kjer se je linearno višala koncentracija faze B ter tako povečevala hitrost pretoka solanina skozi kromatografsko kolono. Na grafu 1 je podan prikaz uporabe gradientne metode za koncentracijo faze B v odvisnosti od časa.

Graf 1: Spreminjanje koncentracije faze B v odvisnosti od časa



Iz grafa 1 je razvidno zviševanje koncentracije faze B, ki doseže svoj vrh z 90% pri 4 minutah, nakar prične koncentracija ponovno padati na 10%. Na 10% pade ob času 5 minut.

Pretok mobilne faze pri analizi solanina je bil 0,3 mL/min, injiciran volumen vzorca pa je bil velik 5 μ L. Čas metode je bil 10 minut. Temperatura kolone je bila 35 °C. Vsi solaninovi delci v masnem spektrometru so se ionizirali pozitivno. Kromatografsko smo poleg vzorcev analizirali tudi čisti solanin (eksterni standard), da smo lahko določili umeritveno krivuljo.

3.4 Umeritvena krivulja

Po opravljeni HPLC analizi z masno spektrometrijo smo prišli do rezultatov v obliki odzivov, ki jih je zaznal masni spektrometer. Prvo opažanje, ki se nanaša na sam proces kromatografije je, da je retenzijski čas solanina bil 5,4 minute, kar pomeni, da je solanin prepotoval celotno dolžino kolone v 5,4 minute. Na koncu kolone je solanin vstopil v masni spektrometer, kjer smo dobili naslednje odzive spektrometra na solanin. Da lahko osmislimo te odzive smo najprej iz čistega solanina, ki smo ga vzeli za standard, naredili umeritveno krivuljo s pomočjo katere smo lahko iz odzivov masnega spektrometra izračunali koncentracije solanina v vzorcih, ki so bili analizirani z masno spektrometrijo. Umeritveno krivuljo smo izrisali iz podatkov, kot so podani v preglednici 2.

Preglednica 2: Vhodni podatki za umeritveno krivuljo

koncentracija (ng/mL)	odziv detektorja
12,3	15388,86
12,3	15347,09
12,3	15518,21
12,3	15611,26
12,3	15803,94
12,3	15290,39
24,6	29423,54
24,6	29595,88
24,6	29362,62
123	124033,52
123	124048,55
246	233477,13
246	228790,23

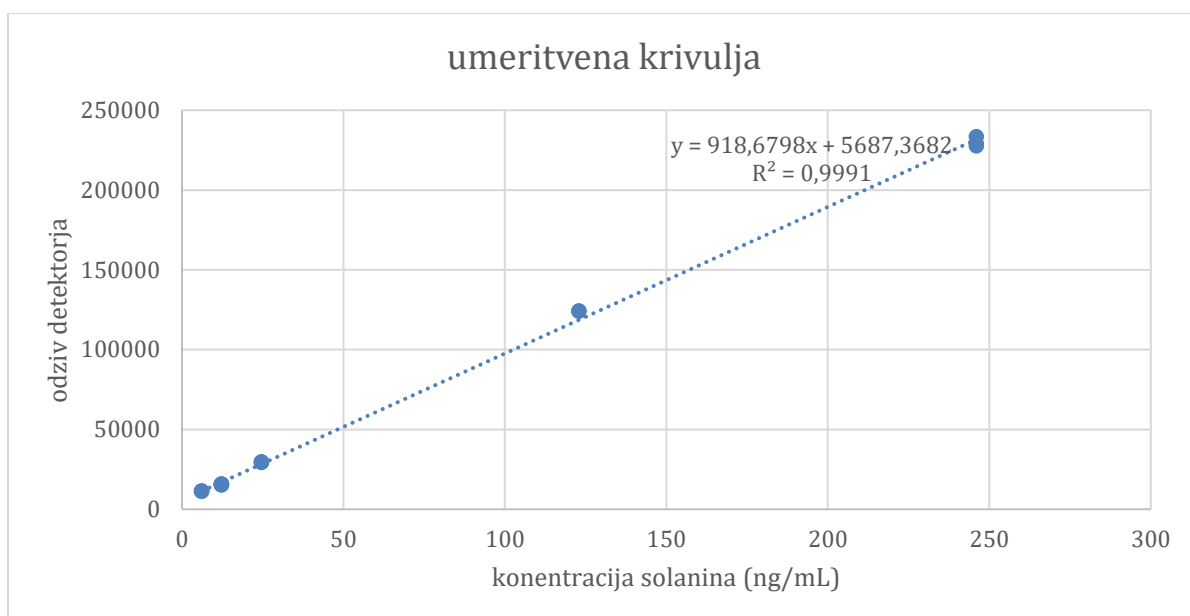
246	227520,64
6,15	11509,40
6,15	11198,58
6,15	11293,10

Koncentracija je podana v ng/ml in predstavlja koncentracijo čistega solanina, odziv detektorja pa v številkah prikazuje površino pod krivuljo količine zaznanih ionov solanina. S temi vhodnimi podatki lahko preračunamo enačbo odziva v odvisnosti od koncentracije solanina in dobimo naslednjo enačbo 1:

$$\text{odziv} = k \times \text{koncentracija solanina} + n \quad (\text{enačba 1})$$

Iz zgornje enačbe premice (enačba 1) lahko za odzive v odvisnosti od koncentracije solanina izračunamo vrednosti konstant k in n ($k=918,6798$; $n=5687,3682$) s koeficientom ujemanja $R^2=0,9991$. Ko izračunamo k in n lahko s pomočjo zgornje enačbe iz odzivov masnega spektrometra na vzorce, ki smo jih ekstrahirali iz krompirja, izračunamo koncentracijo solanina v krompirju.

Na spodnji sliki 11 podajamo grafični prikaz umeritvene krivulje za odzive masnega spektrometra v odvisnosti od solanina v snovi.



Slika 11: Grafični prikaz umeritvene krivulje

Iz izrisane umeritvene krivulje lahko izračunamo koncentracijo solanina v ekstraktu v ng/ml, nato pa moramo to količino še pretvoriti v maso solanina na enoto mase krompirja z upoštevanjem začetne mase krompirja, ki smo jo uporabili za ekstrakcijo (vsebnost je podana v ng/g krompirja).

4 REZULTATI IN INTERPRETACIJE

REZULTATOV

4.1 Rezultati različnih ekstrakcij

Prvi rezultati o masi ekstrahiranega solanina, do katerih smo prišli, so bili rezultati primerjave treh metod ekstrakcije. Preglednica 3 prikazuje kolikšne mase solanina smo ekstrahirali iz vzorca krompirja (surov Mercator krompir), ki je za posamezno ekstrakcijo imel različne mase.

Preglednica 3: Masa solanina izolirana s posamezno ekstrakcijo

metoda ekstrakcije	masa vzorca krompirja (g)	vsebnost ekstrahiranega solanina (ng/mL)
MeOH	4,9886	818,7
5% EtCOOH	4,9907	570,9
NaOAc	0,4954	76,93

Da ugotovimo, katera ekstrakcija je najučinkovitejša moramo ekstrahirano maso deliti z maso vzorca krompirja, kot je bila uporabljena pri posamezni ekstrakciji. Upoštevati moramo točne mase vzorcev, ki smo jih natehtali (navedeno v preglednici 3). Tako pridemo do enačbe 2:

$$\frac{\text{masa ekstrahiranega solanina v ng}}{\text{masa vzorca krompirja v g}} = \text{masa solanina v krompirju v } \frac{\text{ng}}{\text{g}} \quad (\text{enačba 2})$$

Z uporabo enačbe 2 pridemo do rezultatov koncentracije solanina v ng na gram krompirja (ng/g), kot so za posamezno ekstrakcijo podani v preglednici 4.

Preglednica 4: Koncentracija solanina pri različnih metodah ekstrakcije

metoda ekstrakcije	masa solanina (ng/g)
MeOH	164,11
5% EtCOOH	114,39
NaOAc	155,29

Iz rezultatov v preglednici 4 lahko razberemo, da je ekstrakcija z MeOH najbolj učinkovita, najmanj učinkovita je ekstrakcija s 5% EtCOOH, ekstrakcija z NaOAc pa je druga najbolj učinkovita ekstrakcija. Za nadaljnje delo smo se odločili za uporabo ekstrakcije z NaOAc, saj je skoraj tako učinkovita kot ekstrakcija z MeOH, hkrati pa s to ekstrakcijo odstranimo ogljikove hidrate, ki bi lahko motili analizo. Prav tako so bile pri ekstrakciji z MeOH netopne komponente, kar bi tudi lahko vplivalo na analizo.

4.2 Rezultati različnih vzorcev krompirja

Po primerjavi ekstraktov smo začeli s primerjavo različnih vzorcev krompirja obdelanih na različne načine in dobili na masnem spektrometru odzive za vse vzorce, kot so vidni v preglednici 5. Iz odzivov smo po enačbi premice (enačba 1), ki smo jo dobili iz umeritvene krivulje, izračunali koncentracije solanina v ng na gram krompirja (enačba 2). Nato smo z razmerjem masa:koncentracija izračunali maso solanina v ekstraktu. Preden smo opravili ekstrakcijo, smo natančno izmerili maso vzorcev krompirja. Maso vzorcev smo pretvorili iz mg v g in nato izračunali maso solanina na enoto mase krompirja. V preglednici 5 so razvidni odzivi detektorja, masa posameznih vzorcev, preračunana koncentracija solanina v ekstraktu s pomočjo umeritvene krivulje, preračunana vsebnost solanina v krompirju v ng/g za vsak vzorec ter povprečne vsebnosti solanina ng/g s standardnimi deviacijami po posameznem pridelovalcu in načinu priprave. Kot je razvidno iz preglednice 5 smo za vsak ekstrakt opravili 3 analize, da so rezultati bolj natančni.

Preglednica 5: Rezultati ekstrakcije različnih vzorcev krompirja

vzorci	masa (mg)	odziv detektorja	koncentracija iz umeritvene krivulje (ng/mL)	vsebnost solanina (ng/g)	povprečne vsebnosti solanina (ng/g)
Surov Mercator	495,6	78758,46	79,54	160,49	161,15 ± 1,08
Surov Mercator	495,6	79625,66	80,48	162,40	
Surov Mercator	495,6	78798,14	79,58	160,58	
Surov Lidl	491,2	105464,37	108,61	221,11	224,84 ± 3,37
Surov Lidl	491,2	107562,98	110,89	225,76	
Surov Lidl	491,2	108418,09	111,82	227,66	

Surov Polonca	512,6	118619,74	122,93	239,81	244,25 ± 4,42
Surov Polonca	512,6	120724,24	125,22	244,28	
Surov Polonca	512,6	122784,99	127,46	248,66	
Pečen Mercator	494,5	23142,42	19,00	38,42	35,29 ± 2,76
Pečen Mercator	494,5	21229,21	16,92	34,21	
Pečen Mercator	494,5	20784,89	16,43	33,23	
Pečen Lidl	526,4	51052,81	49,38	93,81	95,20 ± 1,31
Pečen Lidl	526,4	52314,47	50,75	96,42	
Pečen Lidl	526,4	51806,37	50,20	95,37	
Pečen Polonca	481,6	84170,65	85,43	177,39	177,02 ± 0,64
Pečen Polonca	481,6	84170,21	85,43	177,39	
Pečen Polonca	481,6	83677,64	84,89	176,27	
Kuhan Mercator	506,5	27458,20	23,70	46,79	47,01 ± 0,31
Kuhan Mercator	506,5	27726,46	23,99	47,36	
Kuhan Mercator	506,5	27498,68	23,74	46,87	
Kuhan Lidl	495,8	84334,98	85,61	172,67	176,98 ± 3,82
Kuhan Lidl	495,8	86904,55	88,41	178,31	
Kuhan Lidl	495,8	87655,08	89,22	179,96	
Kuhan Polonca	504,5	109922,87	113,46	224,90	228,71 ± 3,30
Kuhan Polonca	504,5	112559,69	116,33	230,59	
Kuhan Polonca	504,5	112576,46	116,35	230,63	

5 RAZPRAVA

Solanin je strupen glikoalkaloid, ki ga sintetizirajo rastline iz družine razhudnikovk med katere spadajo tudi rastline, ki so del človekove prehrane npr. krompir, paradižnik in paprika. Krompir je človeku najpomembnejša rastlina iz družine razhudnikovk, zato je pomembno, da poznamo vsebnosti solanina v krompirju. Vsebnosti solanina v krompirju določamo s pomočjo različnih ekstrakcij, ki so različno učinkovite.

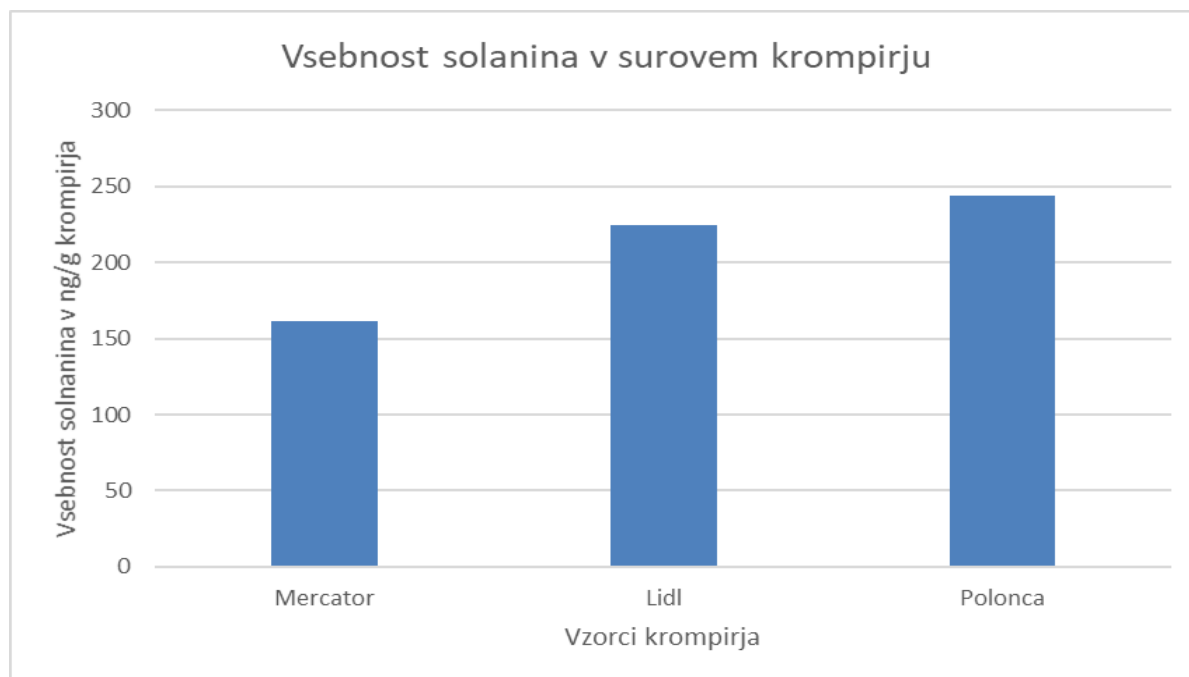
5.1 Hipoteza 1

Rezultati so pokazali, da je izmed opravljenih ekstrakcij bila najbolj učinkovita ekstrakcija z metanolom (MeOH), ki je ekstrahirala 164,11 ng/g solanina v krompirju, vendar kot je že bilo omenjeno v poglavju 3.2 ta ekstrakcija ni odstranila ogljikovih hidratov iz ekstrakta in ti so motili analizo s HPLC/MS. Druga najbolj učinkovita ekstrakcija je bila ekstrakcija z natrijevim acetatom (NaOAc). Ta ekstrakcija je bila le za 5,4% manj učinkovita od ekstrakcije z metanolom, a je iz ekstrakta izločila tudi ogljikove hidrate, da je analiza ekstrakta lahko potekala nemoteno. Najmanj učinkovita ekstrakcija je bila ekstrakcija s 5% etanojsko kislino (EtCOOH), ki je bila za kar 30,3% manj učinkovita od ekstrakcije z metanolom. S pomočjo te primerjave lahko torej potrdimo hipotezo 1, ki pravi, da bo najučinkovitejša ekstrakcija z metanolom, malo manj učinkovita bo ekstrakcija z natrijevim acetatom, najmanj učinkovita pa ekstrakcija s 5% etanojsko kislino. Prav tako pa je potrebno upoštevati dejstvo, da se pri ekstrakciji z metanolom in 5% etanojsko kislino po izparevanju vsa suha snov v metanolu ni raztopila, kar bi lahko privedlo do dodatnih izgub solanina med procesom ekstrakcije.

5.2 Hipoteza 2

Rezultati so pokazali, da je bila povprečna izmerjena vsebnost solanina v vzorcih surovega krompirja veliko manjša od za človeka določene najvišje priporočene vsebnosti solanina v krompirju. Rezultate povprečnih vrednosti vsebnosti solanina v surovem krompirju podajamo na grafu 2.

Graf 2: Vsebnost solanina v surovem krompirju



Kot je razvidno iz grafa 2 je največ solanina vseboval krompir pridelovalca Polonca, najmanj pa Mercatorjev krompir. In sicer je Mercatorjev krompir vseboval za kar 34% manj solanina kot krompir pridelovalca Polonca. Lidlov krompir pa je vseboval 7,9% manj solanina kot krompir pridelovalca Polonca. Iz podatkov o vsebnosti solanina lahko sklepamo, da je Mercatorjev krompir skladiščen pri najbolj optimalnih pogojih, krompir pridelovalca Polonca pa pri najmanj optimalnih pogojih. Nadalje lahko sklepamo, da je Lidlov krompir skladiščen pri malo boljših pogojih, kot krompir pridelovalca Polonca, a še vedno v precej slabših pogojih kot Mercatorjev krompir.

Izmerjene vsebnosti solanina v surovem krompirju so variirale med 161,15 ng/g in 244,25 ng/g, medtem ko je najvišja priporočena vsebnost solanina 0,2 mg na gram gomolja krompirja. S temi rezultati in primerjavo z najvišjo priporočeno vsebnostjo solanina smo potrdili hipotezo 2, ki pravi, da bodo vsi vzorci imeli nižje vsebnosti solanina kot je najvišja priporočena vsebnost solanina. Najvišja priporočena vsebnost solanina v krompirju je torej dosti večja od naše izmerjene vsebnosti. Dobljene rezultate analize, ki kažejo, da so naše izmerjene vsebnosti solanina v krompirju dosti manjše od najvišje priporočene vsebnosti, upravičujemo z naslednjima dejstvoma: a) najvišja priporočena vsebnost solanina je nekajkrat večja od povprečne vsebnosti solanina v krompirju in b) velika večina solanina se nahaja v olupku, ki pa smo ga mi iz krompirja v postopku ekstrakcije odstranili, zato so rezultati sprejemljivi.

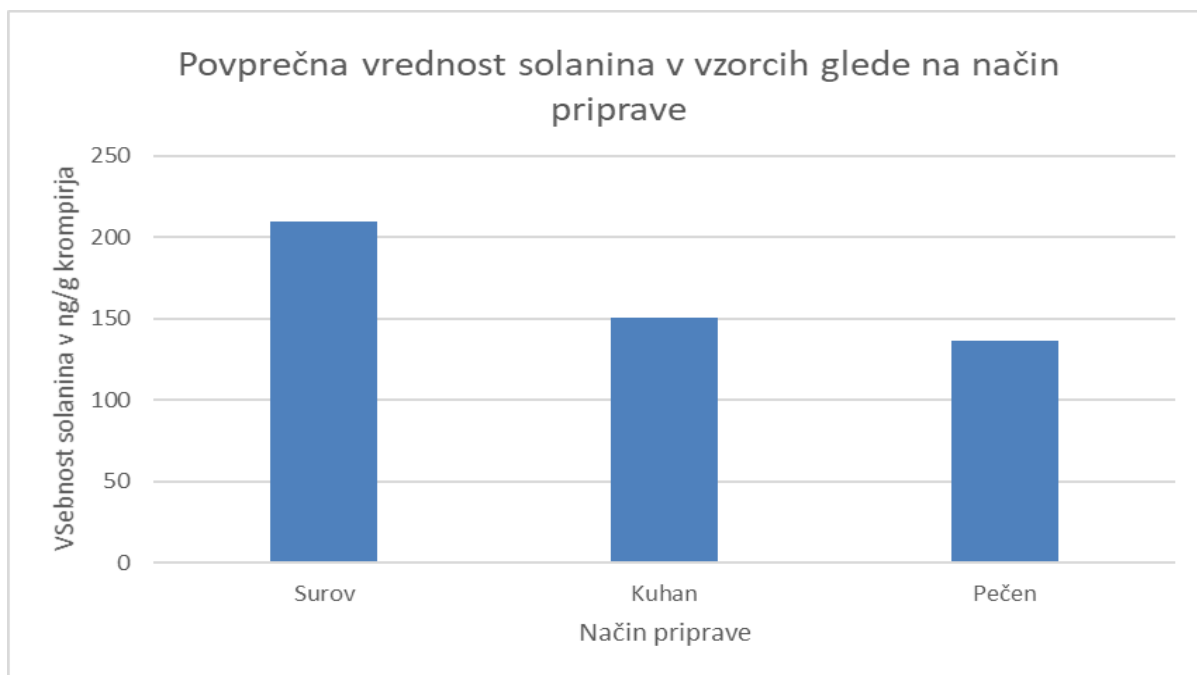
5.3 Hipoteza 3

Iz rezultatov podanih v poglavju 4.2 je razvidno, da je izmed izbranih najbolj učinkovita ekstrakcija z MeOH, a kot je bilo predhodno že komentirano le-te za nadaljnje delo nismo uporabili, saj so po tej ekstrakciji ostale nekatere netopne komponente, kar bi lahko vplivalo na analizo s HPLC metodo. Iz rezultatov ekstrakcije različnih vzorcev krompirja (Preglednica 5) smo ugotovili, kot je bilo pričakovano glede na teorijo, da je največ solanina vseboval surov krompir najmanj pa pečen. Pri tem so imeli najnižje vsebnosti solanina (ng/g) vzorci Mercatorjevega krompirja (kmetija Šlamberger iz Zrkovc pri Mariboru) in sicer tako za surov, pečen in kuhan krompir. Slabše rezultate so dosegli vzorci Lidlovega krompirja (kmetija Štular iz Strahinja). Najslabši rezultat pa so dosegli vzorci Polonca krompirja (kmetija iz Kranja).

Za dobljene mase solanina na gram krompirja smo po posameznih pridelovalcih izračunali še povprečne vrednosti mas solanina na gram krompirja ter njihove standardne deviacije za posameznega predelovalca (preglednica 5). Spodaj podajamo glavne ugotovitve rezultatov za izračunane povprečne vrednosti vsebnosti solanina za krompir pred in po termični obdelavi vzorcev.

Kot pričakovano iz teorije je pri vseh pridelovalcih krompirja vsebnost solanina padla po termični obdelavi, kar je prikazano na grafu 3.

Graf 3: Povprečne vsebnosti solanina v analiziranih vzorcih krompirja



Iz grafa 3 lahko razberemo, da je pri kuhanju povprečna vsebnost solanina padla za okoli 28%, kar je več kot je pričakovano v literaturi, vendar je potrebno upoštevati, da smo krompir kuhali okoli 2 uri, medtem, ko se krompir običajno kuha le okoli 15 do 20 minut, če je narezan na manjše koščke. Pri pečenju je povprečna vsebnost solanina padla za okoli 35%, kar pa je primerljivo s teorijo in tako je rezultat sprejemljiv. S pomočjo te primerjave količine solanina v krompirju obdelanem na različne načine lahko potrdimo hipotezo 3, ki pravi, da bo največ solanina v surovem krompirju, malo manj v kuhanem, najmanj pa v pečenem.

6 ZAKLJUČEK

6.1 Potrditev hipotez

Na začetku raziskovalne naloge smo si postavili tri raziskovalne hipoteze:

Hipoteza 1. Izmed izvedenih ekstrakcij bo najbolj učinkovita ekstrakcija z metanolom, malo manj učinkovita bo ekstrakcija z natrijevim acetatom, najmanj učinkovita pa ekstrakcija s 5% etanojsko kislino.

Hipoteza 2. Vsi vzorci krompirja bodo imeli manjšo vsebnost solanina od najvišje priporočene meje.

Hipoteza 3. V surovem krompirju bo največ solanina, malo manj ga bo v kuhanem krompirju, najmanj pa v pečenem krompirju.

Vse hipoteze so bile potrjene na osnovi preučevanja raznih dostopnih virov, hkrati pa smo jo potrdili tudi sami z izvedenim eksperimentom za analiziranje vsebnosti solanina v različnih vzorcih krompirja, ki smo ga pripravili na tri različne načine. Podrobnejši opisi potrditve hipotez so podani v poglavju 5 Razprava.

6.2 Odgovori na raziskovalna vprašanja

Na začetku raziskovalne naloge smo si zastavili naslednja raziskovalna vprašanja.

1. Kateri vzorec krompirja bo imel najmanj solanina?
2. S katerim načinom priprave krompirja bomo najbolj zmanjšali količino solanina?
3. Katera vrsta ekstrakcije bo najbolj učinkovito ekstrahirala glikoalkaloide?

Skozi raziskovanje in z eksperimentalnim delom smo prišli do odgovorov na navedena vprašanja. Na vprašanje, kateri krompir bo imel najmanj solanina, se odgovor glasi Mercator krompir. Iz tega lahko sklepamo, da ima Mercator krompir najboljše pogoje skladiščenja, v primerjavi z Lidlovim krompirjem in Polonca krompirjem.

Nadalje smo dobili odgovor tudi na drugo raziskovalno vprašanje in sicer se količina solanina najbolj zmanjša s pečenjem, saj so temperature dovolj visoke, da solanin že začne delno denaturirati. Ob kuhanju se vsebnost solanina sicer tudi zniža za nekaj odstotkov, vendar ne za toliko kot pri pečenju.

Prav tako smo dobili odgovor na raziskovalno vprašanje, katera vrsta ekstrakcije bo bolj učinkovito ekstrahirala glikoalkaloide. Kot najbolj učinkovita se je izkazala ekstrakcija z MeOH, druga najbolj učinkovita je bila ekstrakcija z NaOAc in najmanj učinkovita ekstrakcija s 5% EtCOOH. Ekstrakcija z NaOAc je bila za 5,4% manj učinkovita, a je v postopku odstranila ogljikove hidrate, medtem ko ekstrakcija z MeOH ni odstranila ogljikovih hidratov. Ekstrakcija s 5% EtCOOH je bila kar za 30,3% manj učinkovita od ekstrakcije z MeOH. Pri ekstrakciji z MeOH in 5% EtCOOH se pri zadnjem raztapljanju del suhe snovi ni raztopil, kar je lahko razlog za nižjo izmerjeno vsebnost solanina, saj bi lahko del solanina ostal v neraztopljeni snovi.

6.3 Možnosti nadaljnjega raziskavanja in izboljšav

Raziskavo na področju solanina bi lahko razširili še na druge užitne rastline iz družine razhudnikovk, kot so npr. paprika, jajčevc in paradižnik. To bi izvedli tako, da bi medsebojno primerjali in ugotavljali razlike v vsebnosti solanina v teh različnih rastlinah iz družine razhudnikovk. Druga možnost bi bila primerjava različnih vrst krompirja ter ugotavljanje, katere vrste sodijo med najbolj strupene (vsebujejo največ solanina) ter katere med najmanj strupene (vsebujejo najmanj solanina). Kot primerjalni kriterij bi lahko vključili tudi značilnosti lokacije pridelave krompirja, kot npr. lastnosti kmetijskega zemljišča ipd. Nadalje bi se lahko ukvarjali tudi z vprašanjem o kemijski sestavi tistega dela suhe snovi, ki se ni raztopil pri ekstrakcijah z MeOH in 5% EtCOOH.

Izboljšave pa vidimo v možnostih izboljšanja samega procesa ekstrakcije, ki bi bilo usmerjeno v ugotavljanje najbolj optimalne ekstrakcije, ki bi iz krompirja ekstrahirala največ solanina ter čim manj drugih primesi. V ta namen bi seveda bilo potrebno preučiti najnovejšo dostopno literaturo.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z raziskovalno nalogo želimo predstaviti in javnosti približati tako zavedanje o vsebnosti solanina v krompirju, kot tudi splošno zavedanje, da je v naši hrani mnogo strupenih snovi tudi tam, kjer tega ne bi pričakovali. Upamo, da bo na osnovi ugotovitev raziskovalne naloge širša javnost lažje prepoznala krompir z visoko vsebnostjo solanina ter tako posredno morda preprečimo kakšno zastrupitev s solaninom. Prav tako upamo, da bomo ljudem pomagali, da bodo bolj premislili kaj jedo vsak dan ter se začeli prehranjevati bolj zdravo.

8 VIRI IN LITERATURA

8.1 Članki

Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. In book: Column Chromatography, 99-122. Dostopno na: <https://www.intechopen.com/chapters/44034>

Distl, M., Sibum, M. & Wink, M. (2009). Combination of On-Line Solid-Phase Extraction with LC-MS for the Determination of Potentially Hazardous Glycoalkaloids in Potato Products. *Potato Research*, 52, 39–56. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9106-1>

Dolničar, P. Sortni izbor krompirja v letu 2011, Kmetijski inštitut Slovenije. Dostopno na: https://arhiv.kis.si/datoteke/File/kis/SLO/POL/Sel-center-krompir/sortni_izbor_2011.pdf

Friedman, M., Huang, V., Quiambao, Q., Noritake, S., Liu, J., Kwon, O., Chintalapati, S., Young, J., Levin, C. E., Tam, C., Cheng, L. W., & Land, K. M. (2018). Potato Peels and Their Bioactive Glycoalkaloids and Phenolic Compounds Inhibit the Growth of Pathogenic Trichomonads. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(30), 7942–7947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01726>

Integrated Laboratory Systems. (1998). Review of Toxicological Literature. Dostopno na: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/chaconinesolanine_508.pdf

Liu, W., Zhang, N, Li, B., Fan, S., Zhao, R., Li, L., Wu, G., Zhao, Y. (2014). Determination of α -chaconine and α -solanine in commercial potato crisps by QuEChERS extraction and UPLC-MS/MS. *Chemical Papers*, 68(11), 1498-1504. <https://doi.org/10.2478/s11696-014-0617-8>

Mann, C.C. (2011). How the Potato Changed the World, *Smithsonian magazine*. Dostopno na: <https://www.smithsonianmag.com/history/how-the-potato-changed-the-world-108470605/>

Nielsen, S. D., Schmidt, J. M., Kristiansen, G. H., Dalsgaard, T. K., & Larsen, L. B. (2020). Liquid Chromatography Mass Spectrometry Quantification of α -solanine, α -chaconine, and Solanidine in Potato Protein Isolates. *Foods*, 9(4), 416. <https://doi.org/10.3390/foods9040416>

Olive, V., Tansini, A., Carasek, F., Cordenuzzi, D., Fernandes, S., Fiori, M., Fragoso, A., Dal M. J. (2015). Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 10(2), 287-297. Dostopno na: <https://www.scielo.br/j/ambiagua/a/f6jzRc9Sn45Rr7hWQ3JHDwB/abstract/?lang=en>

Ostrý V., Ruprich J., Skarkova J. (2010). Glycoalkaloids in potato tubers: The effect of peeling and cooking in salted water, *Acta Alimentaria*, 39(2), 130-135. <https://doi.org/10.1556/aalim.39.2010.2.4>

8.2 Varnostni listi

Carl Roth GmbH + Co KG, Magnezijev sulfat ≥ 99 %, p.a. , brezvodni, Varnostni list, Verzija: 3.0 sl, 23.3.2020. Dostopno na: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-0682-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyMzY3OTR8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oY2UvaDI4Lzg5Nzk4MzA2NjkzNDIucGRmfDAwMmNkMGMzM2E0M2I5ZTUxZGJjMDQ3ZGYwZTFmYzNjOWVhZmRjMmIzMDg5YTEzZjMzYjNlZjQ1MzhmMGRIODY> (citirano 24.2. 2022)

Carl Roth GmbH + Co KG, Acetonitril $\geq 99,5$ %, za sintezo, Varnostni list, Verzija: 4.1 sl, 6.4.2021. Dostopno na: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-4380-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNzY0MDR8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oM2UvaGRILzkwMjMwNjE3MjExMTgucGRmfGRmNDQzMzQxYjIxNDUzNTQzMzQzMzU4NTY3ZGJkZjIhM2VkNDk0MDVknThkZDQyOWJjNWM5NGE3NmVmNzlhNTk> (citirano 24.2. 2022)

Carl Roth GmbH + Co KG, Metanol ≥ 99 %, za sintezo. Varnostni list, Verzija: 6.0 sl, 16.6.2021. Dostopno na: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8388-SI-SL.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzNjI5Nzd8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oYWUvaGI2LzkwMzE2NTQ0MDgyMjIucGRmfDdlOTQ0OTU3ODQxN2ZmZjM2MDBiODg2OWQzODU1M2Q1Yjk4ZjgwMjcwNDQ0ZGIwNjIjY2IxNThkNDUyZDhhYWI> (citirano 24.2. 2022)

Kemika d.d., Natrij-acetat, bezvodni p.a., Varnostni list, 20.5.2004. Dostopno na: https://www.zd-lj.si/zdlj/skripte/varnostne_liste/pdf/K_natrij_acetat.pdf (citirano 24.2. 2022)

LabChem Inc., Acetic Acid, 5% v/v (1+19), Safety Data Sheet, Version: 1.3, 3.9.2018. Dostopno na: <http://www.labchem.com/tools/msds/msds/LC10180.pdf> (citirano 24.2. 2022)

8.3 Internetni viri

Agilent technologies, Inc. MassHunter WorkStation - Quantitative Analysis. Dostopno na: <https://www.agilent.com/en/products/software-informatics/masshunter-suite/masshunter-quantitative-analysis> (citirano 28.2. 2022)

Alkaloid. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 21.1.2022. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Alkaloid> (citirano 28.2. 2022)

Apoptoza. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 3.7.2021. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Apoptoza> (citirano 24.2. 2022)

BÜCHI Labortechnik AG. Rotavapor® R-100. Dostopno na: <https://www.buchi.com/en/products/instruments/rotavapor-r-100> (citirano 24.2. 2022)

Centrifugiranje. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 26.2.2021. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Centrifugiranje> (citirano 20.2. 2022)

Conquer Scientific. Agilent 1200 HPLC System with RID and Isocratic Pump. Dostopno na: <https://conquerscientific.com/shop/agilent-1200-hplc-system-with-rid-and-isocratic-pump/> (citirano 20.2. 2022)

Dr. Meditech Surgical & Diagnostics India Pvt. Ltd. Types And Uses Of Centrifuge Machine. Dostopno na: <http://labequipmentsale.com/types-and-uses-of-centrifuge-machine/> (citirano 20.2. 2022)

Glycoalkaloid. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 30.3.2021. Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycoalkaloid> (citirano 20.2. 2022)

High-performance liquid chromatography. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 21.1.2022. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography (citirano 24.2. 2022)

Mass spectrometry. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 16.2.2022. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry (citirano 20.2. 2022)

Potato. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 7.2.2022. Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Potato> (citirano 28.2. 2022)

Rotary evaporator. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 23.7.2021. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Rotary_evaporator (citirano 24.2. 2022)

Royal Society of Chemistry, ChemSpider. Solanine. Dostopno na: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7828094.html?rid=3f097cfd-c3b3-42ce-a8a0-bf27a2416f14&page_num=0 (citirano 20.2. 2022)

Solanine. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 12.12.2021. Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Solanine> (citirano 20.2. 2022)

Solid-phase extraction. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 29.5.2021. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Solid-phase_extraction (citirano 24.2. 2022)

Ultrasonic cleaning. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 26.2.2021. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonic_cleaning (citirano 23.2. 2022)

Vortex mixer. Wikipedija, prosta enciklopedija. Zadnja sprememba 12.7.2021. Dostopno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Vortex_mixer (citirano 20.2. 2022)

Westlab Group Ltd. Vortex Mixer – ISG. Dostopno na: <https://www.westlab.com/equipment/equipment-m-z/mixers-rollers-shakers/153-010c-vortex-mixer---isg> (citirano 14.2. 2022)

8.4 Viri slik

Slika 1: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7828094.html?rid=3f097cfd-c3b3-42ce-a8a0-bf27a2416f14&page_num=0; pridobljeno 28.2.2022.

Slika 2: Lastni arhiv.

Slika 3: Lastni arhiv.

Slika 4: Lastni arhiv.

Slika 5: <http://labequipmentsale.com/types-and-uses-of-centrifuge-machine>; pridobljeno 26.2.2022.

Slika 6: <https://www.westlab.com/equipment/equipment-m-z/mixers-rollers-shakers/153-010c-vortex-mixer---isg>, pridobljeno 28.2.2022.

Slika 7: <https://www.buchi.com/en/products/instruments/rotavapor-r-100>, pridobljeno 26.2.2022.

Slika 8: https://www.researchgate.net/figure/SPE-cartridge-extraction-overview_fig2_275222001, pridobljeno 28.2.2022.

Slika 9: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-High-Performance-Liquid-Chromatography-HPLC-system_fig2_236146377, pridobljeno 25.2.2022.

Slika 10: <https://conquerscientific.com/shop/agilent-1200-hplc-system-with-rid-and-isocratic-pump/>, pridobljeno 28.2.2022.

Slika 11: Lastni arhiv.