

Primjena spektrometrije masa u analizi biljnih pripravaka s ciljem pronalaska ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari

Vrabec, Anamarija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:419932>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Anamarija Vrabec

7734/BT

**Primjena spektrometrije masa u analizi biljnih pripravaka s ciljem pronalaska
ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari**

Završni rad

Predmet: Fizikalna kemija

Mentor: doc.dr.sc. Anita Horvatić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Primjena spektrometrije masa u analizi biljnih pripravaka s ciljem pronalaska
ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari**

Anamarija Vrabec, 0125162544

Sažetak: Zbog sve veće potražnje za biljnim dodacima prehrani, kao i biljnim lijekovima, porastao je i broj njihovih ilegalnih, neodobrenih te zabranjenih sastojaka, kao što su inhibitori fosfordiesteraze tipa 5 (PDE-5), anabolički steroidi te hipoglikemična i antihipertenzivna sredstva. Interakcija s drugim lijekovima te prekomjerna i nepravilna upotreba mogu uzrokovati nuspojave kao što su srčani ili moždani udar, halucinacije, tahikardija, povraćanje, grčevi i uzrujanost. Praćenjem proizvodnje i razvoja biljnih pripravaka žele se zaštititi zdravlje i sigurnost potrošača. Neke od metoda koje se koriste u kontroli kvalitete ovih proizvoda su tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (LC-MS) i plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Ovaj rad će se pobliže dotaknuti same tehnike spektrometrije masa (MS) kao i njene primjene u analizi biljnih pripravaka s ciljem pronalaska ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari.

Ključne riječi: biljni dodaci prehrani, biljni pripravci, krivotvorine, LC-MS, spektrometrija masa

Rad sadrži: 30 stranica, 19 slika, 37 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Pomoć pri izradi:

Datum obrane: Rujan, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

**Mass spectrometric analysis of illegal pharmaceutical adulterants in botanical
dietary supplements and herbal remedies**

Anamarija Vrabec, 0125162544

Abstract: Due to the high demand for botanical dietary supplements and herbal remedies, there is an increase in illegal, unapproved and prohibited ingredients such as phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors, anabolic steroids, hypoglycemic and antihypertensive agents adulterated within these products. Interaction with other medications, overuse and misuse can lead to serious side effects, such as heart attack, hallucinations, tachycardia, vomiting, convulsions, agitation and seizures. Monitoring the development of these products will ensure the health and safety of consumers. Some of the analytical techniques used for the aforementioned monitoring are liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This thesis will address mass spectrometry (MS) and its application in the analysis of botanical dietary supplements and herbal remedies in order to detect illegal pharmaceutical adulterants.

Keywords: botanic dietary supplements, herbal remedies, mass spectrometry, LC-MS, pharmaceutical adulterants

Thesis contains: 30 pages, 19 figures, 37 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Technical support and assistance:

Defence date: September, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Zakonske regulative tradicionalnih biljnih lijekova i pripravaka	2
2.2. Dodavanje farmaceutskih tvari u biljne pripravke ili dodatke prehrani	3
2.3. Metode detekcije ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari u biljnim pripravcima	4
2.3.1. Tekućinska kromatografija	4
2.3.1.1. Faktor zadržavanja i faktor razdvajanja	6
2.3.1.2. Broj teorijskih tavana N	6
2.3.1.3. Razlučivanje	7
2.3.1.4. Tekućinski kromatograf	7
2.3.2. Spektrometrija masa	8
2.3.2.1. Razlučivanje	9
2.3.2.2. Točnost mjerenja masa	10
2.3.2.3. Područje mjerenja masa	11
2.3.2.4. Osjetljivost	11
2.3.2.5. Granica detekcije	11
2.3.2.6. Brzina snimanja spektara	12
2.3.3. Ionizacija u spregnutom sustavu LC-MS	12
2.3.3.1. Ionizacija elektroraspršivanjem (ESI)	12
2.3.4. Analizatori u spregnutom sustavu LC-MS	13
2.3.4.1. Kvadrupol	13
2.3.4.2. Trostruki kvadrupol (QqQ)	14
2.3.4.3. Orbitrap	15
2.3.4.4. Analizator vremena leta (TOF)	15
3. PRIMJENA SUSTAVA LC-MS ZA ANALIZU ILEGALNIH TVARI U BILJNIM PRIPRAVCIMA 17	
3.1. Priprema uzorka	18
3.2. Analitičke strategije za otkrivanje ilegalnih tvari u biljnim pripravcima	19
3.2.1. Odabir analizatora masa	19
3.2.2. Odabir ciljanog ili neciljanog pristupa	20
3.2.2.1. Neciljana analiza	20
3.2.2.2. Ciljane analize	21
3.2.2.2.1. Praćenje odabranih iona (SIM)	22
3.2.2.2.2. Praćenje višestrukih reakcija (MRM)	22
4. ZAKLJUČAK	25
5. LITERATURA	26

1. UVOD

U posljednjih desetak godina u svijetu se povećala proizvodnja i potrošnja dodataka prehrani, posebice onih označenih kao biljni pripravci. Korištenje biljnih pripravaka je povezano s različitim spojevima biljnog podrijetla za koje je poznat fiziološki učinak na ljude, uključujući vitamine, minerale, hranjive sastojke, kao i razne biološki aktivne tvari (Rocha i sur., 2016). Zbog svog prirodnog podrijetla i niže cijene, biljni pripravci se sve više koriste kao dodaci prehrani, homeopatski pripravci, alternativa uobičajeno propisanim lijekovima te kod proizvodnje kozmetičkih proizvoda, biocida ili ekstrakata spojeva za farmaceutsku industriju. Biljni pripravci primjenjivali su se od davnina, naročito u Indiji i Kini, dok u određenim državama nije dozvoljeno njihovo korištenje (Vaclavik i sur., 2014).

Budući da se s pravnog aspekta biljni pripravci smatraju hranom, kako u Europskoj uniji (EU), tako i u Sjedinjenim Američkim Državama, prema Direktivi 2002/46 / EC i Zakonu o zdravlju i obrazovanju o dodacima prehrani, njihovo stavljanje na tržište nije zahtijevalo procjenu sigurnosti prije same komercijalizacije (Rocha i sur., 2016). No, različita istraživanja su ukazala na prisutnost neovlaštenog dodavanja lijekova ili njihovih analoga (farmaceutski aktivnih tvari) što značajno utječe na sigurnost hrane i ima izravne učinke na zdravlje. Razvojem tehnologije, kao i osjetljivih i specifičnih analitičkih tehnika poput spektrometrije masa, u posljednjem desetljeću objavljeno je mnogo znanstvenih radova koji opisuju razvoj i primjenu spomenute tehnike u praćenju kvalitete biljnih pripravaka.

Cilj ovog završnog rada bio je pobliže opisati samu metodu spektrometrije masa (MS), kao i temeljem pretraživanja dostupne znanstvene literature istaknuti njenu primjenu u analizi biljnih pripravaka s ciljem pronalaska ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Zakonske regulative tradicionalnih biljnih lijekova i pripravaka

Sve većom potrošnjom dodataka prehrani biljnog podrijetla, na važnosti dobiva sigurnost ovih proizvoda, radi čega je osnovana regulatorna agencija fokusirana isključivo na biljne proizvode, njihovu kvalitetu, količinu unosa, proizvodnju i etiketiranje. Osim navedenog, rad agencije uključuje i praćenje tehničkih zahtjeva i osiguravanje sigurnih sastojaka vezano za količinu aditiva i kontaminanata (Vaclavik i sur., 2014). Jedna od najbitnijih direktiva Europske agencije za sigurnost hrane, 2002/46/EC, definira dodatke prehrani i dopuštene vitamine i minerale, biljnog ili fungalnog podrijetla te one dobivenih od algi (Vaclavik i sur., 2014).

Slijedeći europske regulative, i u Republici Hrvatskoj je 2007. godine izdan Zakon o lijekovima koji jasno definira razliku između biljnih pripravaka i biljnog lijeka. Naime, biljni pripravci su pripravci dobiveni različitim postupcima iz biljnih tvari (usitnjavanje, ekstrakcija, fermentacija, destilacija, pročišćavanje, ukoncentriravanje) te obuhvaćaju usitnjene ili praškaste biljne tvari, tinkture, ekstrakte, esencijalna ulja, istisnute sokove i prerađene izlučine biljaka (Zakon o lijekovima, 2007). Biljni lijek jest lijek koji kao djelatne tvari sadrži isključivo jednu ili više tvari biljnog podrijetla ili jedan ili više biljnih pripravaka, ili jednu ili više biljnih tvari u kombinaciji s jednim ili više biljnih pripravaka (Zakon o lijekovima, 2007).

Nadalje, prema Članku 19. Zakona o lijekovima tradicionalni biljni lijek mora ispunjavati sljedeće uvjete:

- 1) indikacije su prikladne isključivo za tradicionalne biljne lijekove, koji se zbog svog sastava i namjene primjenjuju bez nadzora liječnika,
- 2) namijenjeni su isključivo za primjenu u skladu s naznačenom jačinom i doziranjem,
- 3) namijenjeni su za vanjsku ili peroralnu primjenu ili za inhaliranje,
- 4) razdoblje tradicionalne uporabe je u skladu sa stavkom 2. podstavkom 1. ovoga članka,
- 5) postoji dovoljno podataka o tradicionalnoj uporabi lijeka, osobito dokaza o sigurnosti primjene lijeka u naznačenim uvjetima primjene i dokaza da je djelotvornost lijeka vjerojatna na temelju dugotrajne primjene i iskustva.

Tradicionalni biljni lijekovi mogu sadržavati i vitamine i minerale, dobro poznate sigurnosti primjene, čije djelovanje potpomaže djelovanju sadržanih biljnih djelatnih tvari s obzirom na

naznačenu indikaciju (Zakon o lijekovima, 2007). Bitno je istaknuti da sama kategorizacija proizvoda biljnog podrijetla određuje razinu kontrole istog.

2.2. Dodavanje farmaceutskih tvari u biljne pripravke ili dodatke prehrani

Korištenje nekontroliranih biljnih pripravaka ili dodataka prehrani može imati štetne posljedice, pogotovo ako su izmijenjeni, kontaminirani ili pogrešno brendirani, pri čemu negativno utječu na zdravlju potrošača. Naime, kontaminacija biljnim toksinima, pesticidima ili mikotoksinima može izazvati razne alergijske reakcije i nuspojave (Vaclavik i sur., 2014). Osim navedenog, u preparate se u različitim fazama proizvodnje mogu dodati sintetske farmaceutski aktivne tvari (jedna ili više njih) radi prikrivanja nuspojava ili pojačanja učinka neke od komponenata.

Takvi proizvodi često se reklamiraju u medijima kao što su televizija i internet oglasi, a najčešće uključuju pripravke za mršavljenje (Carvalho i sur., 2011), artritis, hipertenziju, lijekove za erektilnu disfunkciju, ili se pak odnose na razne pripravke za sportaše (Vaclavik i sur., 2014). Ukoliko se radi o prisutnosti nedopuštenih tvari u sportu, tj. kod dodataka prehrani koji su modificirani stimulansima i anaboličkim androgenim steroidima, profesionalni sportaši mogu biti optuženi za kršenje antidopinških pravila radi pozitivnog doping testa (Geyer i sur., 2008).

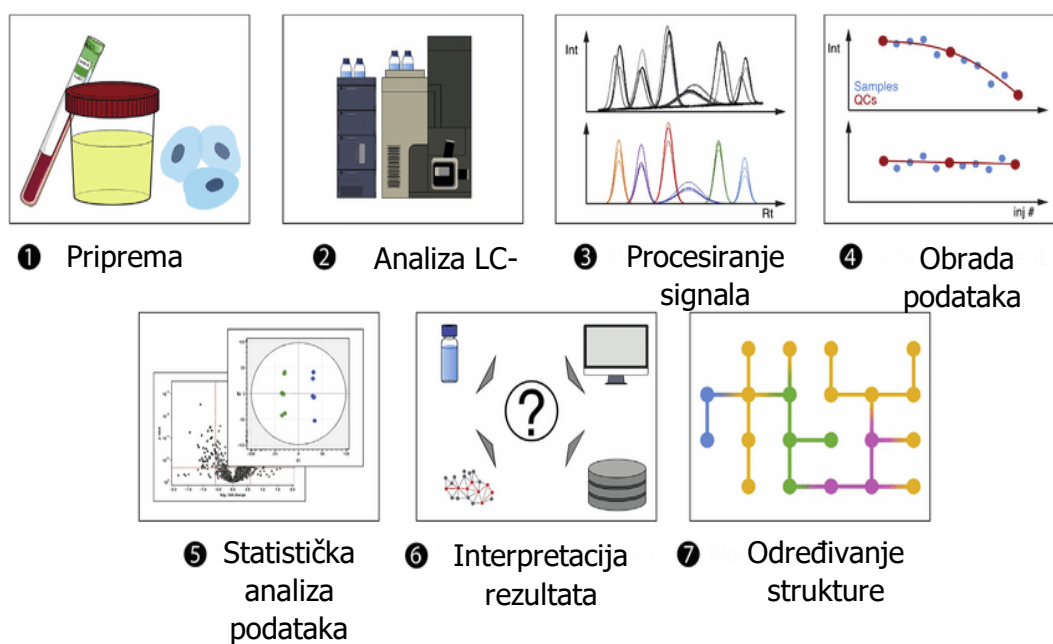
U pripravke za mršavljenje često se dodaju anoreksici i benzodiazepini koji umanjuju simptome depresije i stalne promjene raspoloženja, a uključuju fenfluramin, sibutramin, fenolftalein i orlistat (Lai i sur., 2007). U pripravcima za mršavljenje je, uz već spomenute fenolftalein i sibutramin, pronađen i hipoglikemični farmaceutik metformin (Vaclavik i sur., 2014).

Hipoglikemične tvari također se mogu pronaći u biljnim pripravcima koji se uzimaju radi kontrole krvnog šećera ili liječenja dijabetesa, a najčešće se koriste gilbenklamid, rosiglitazon i metformin (Wu i sur., 2012), dok se za održavanje optimalnog krvnog tlaka u biljne pripravke ilegalno dodaju amlodipin, indapamid, valsartan, klonidin i hidroklorotiazid (Haneef i sur., 2014).

Inhibitori fosfodiesteraze tipa 5 (PDE-5), sildenafil, tadalafil i vardenafil, nalaze se na popisu odobrenih farmaceutika koji se ilegalno dodaju u biljne preparate za erektilnu disfunkciju, dok se uz njih dodaju i njihovi ilegalni analozi. Biljni preparati za erektilnu disfunkciju se često testiraju kako bi se izbjegla prisutnost neregistriranih tvari koji se sintetiziraju kao modifikacije odobrenih PDE-5 inhibitora, uz manje strukturne izmjene. Vjerojatnost štetnih posljedica konzumiranja neodobrenih PDE-5 inhibitora u nepoznatim količinama raste zbog toga jer nema dovoljno podataka o djelotvornosti i sigurnosti takvih preparata (Venhuis i sur., 2014).

2.3. Metode detekcije ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari u biljnim pripravcima

Kako bi se zaštitili potrošači biljnih pripravaka i dodataka prehrani, razvijene su analitičke metode koje omogućuju kontrolu kvalitete ovih proizvoda, kao i detekciju ilegalnih i neodobrenih farmaceutika u navedenim proizvodima. U analitici neodobrenih sastojaka koriste se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC), vezani sustavi tekućinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *Liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS) i/ili plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *Gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS), kao i u novije vrijeme tehnika injektiranja u protok u kombinaciji sa spektrometrijom masa (engl. *Flow injection-mass spectrometry*, FI-MS). Od navedenog, najčešće se koristi sustav LC-MS (Slika 1.) jer omogućuje široki spektar razdvajanja, detekcije i identifikacije polarnih i nepolarnih molekula različitih masa (npr. peptidi, proteini, polimeri, lijekovi...), kao i termički nestabilnih molekula (Vaclavik i sur.,2014).



Slika 1. Postupak analize tehnikom LC-MS (prema Pezzatti i sur., 2019).

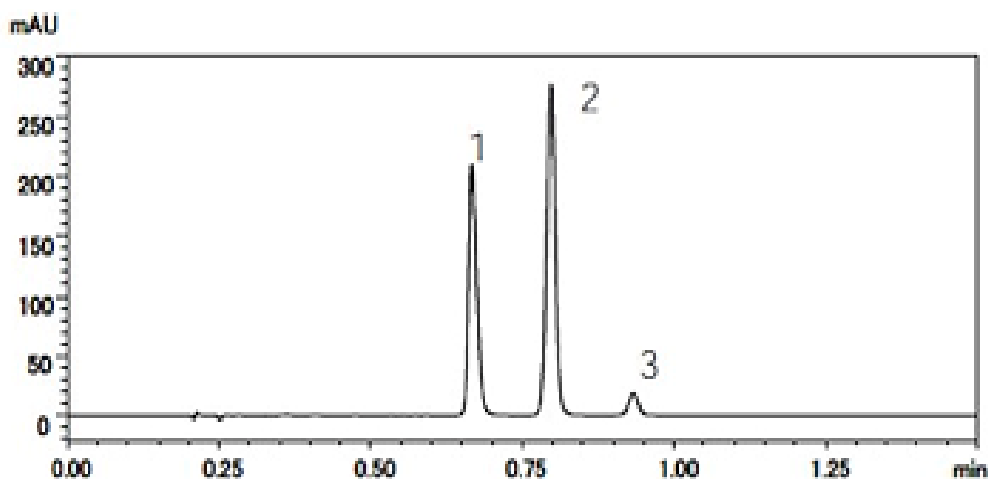
2.3.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je metoda razdvajanja sastojaka smjese ovisno o njihovoj raspodjeli između dviju faza od kojih je nepokretna (stacionarna) kruta, a druga pokretna (mobilna)

tekuća. Kemijske interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze uzrokuju zadržavanje tvari na stacionarnoj fazi, a time i zaostajanje jedne komponente za ostalim komponentama što u konačnici omogućuje razdvajanje pojedinih komponenata smjese. Tvari koje su jače zadržane na stacionarnoj fazi eluiraju se kasnije od onih slabije vezanih, pri čemu dolazi do povećavanja razmaka između kromatografskih pikova pojedinih komponenata smjese, ali i širenja pikova (Slika 2.).

Stacionarna faza razlikuje se ovisno o vrsti tekućinske kromatografije. U slučaju kromatografije obrnutih faza (engl. *Reverse phase*, RP) koja se općenito najčešće primjenjuje, kao stacionarna faza koristi se nepolarni anorganski materijal silika-gel s vezanim lancima n-oktadecila (C18) (Begić, 2018). Mobilna faza je u većini slučajeva smjesa dvaju otapala, ili pufera i otapala te, ako je sastav mobilne faze konstantan, govorimo o izokratnoj eluciji. U slučaju promjene sastava mobilne faze s vremenom, riječ je o gradijentnoj eluciji (Begić, 2018).

Rezultat kromatografskog postupka prikazuje se kromatogramom (Slika 2.). Kromatogrami su ispisi funkcije koncentracije analita u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluiranja. Usporedbom sa standardom, na vremenskoj osi možemo identificirati uzorak temeljem vremena zadržavanja (retencijskog vremena) dok iz površine pika određujemo količinu pojedine komponente uzorka (Cindrić i sur., 2009).



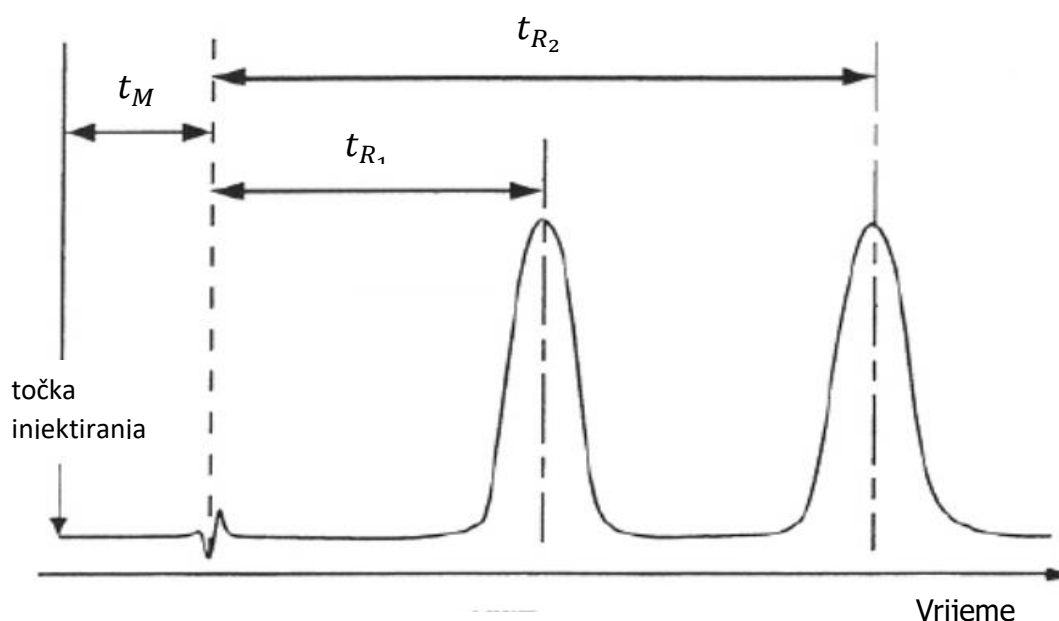
Slika 2. Primjer kromatograma. Komponente 1, 2 i 3 su eluirane pri različitim retencijskim vremenima, ovisno o njihovom afinitetu za stacionarnu fazu (National High Magnetic Field Laboratory, 2021).

Iz kromatograma se također mogu odrediti važne kromatografske veličine kao što su faktori zadržavanja i razdvajanja, broj teorijskih tavana i razlučivanje.

2.3.1.1. Faktor zadržavanja i faktor razdvajanja

Faktor zadržavanja ukazuje koliko dugo se spoj zadržao na koloni u odnosu na nezadržanu komponentu koja ne ostvaruje interakcije s nepokretnom fazom. Označava se s k_i jednadžbom $k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$, pri čemu t_R označava vrijeme zadržavanja analita, a t_M vrijeme zadržavanja pokretne faze (Cindrić i sur., 2009).

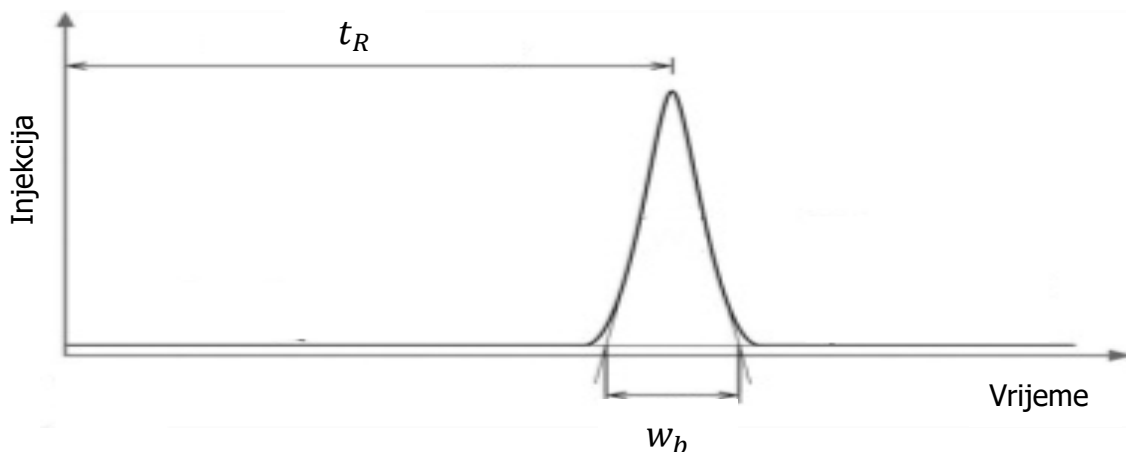
Odjeljivanje komponenata uzorka je moguće samo ako one imaju različitu brzinu prolaska kroz kromatografsku kolonu. Faktor razdvajanja određuje razinu selektivnosti kromatografskog sustava, a ovisi o interakciji analita i stacionarne faze (Slika 3.) . Definira se kao $\alpha_{A/B} = k_2/k_1 = t_{R_2}/t_{R_1}$, pri čemu su t_{R_1} i t_{R_2} prilagođena vremena zadržavanja analita 1 i 2, a k_1 i k_2 faktori zadržavanja analita 1 i 2 (Cindrić i sur., 2009).



Slika 3. Odnos prilagođenih vremena zadržavanja analita 1 i 2. t_M označava prilagođeno vrijeme zadržavanja mobilne faze (Peters, 2014).

2.3.1.2. Broj teorijskih tavana

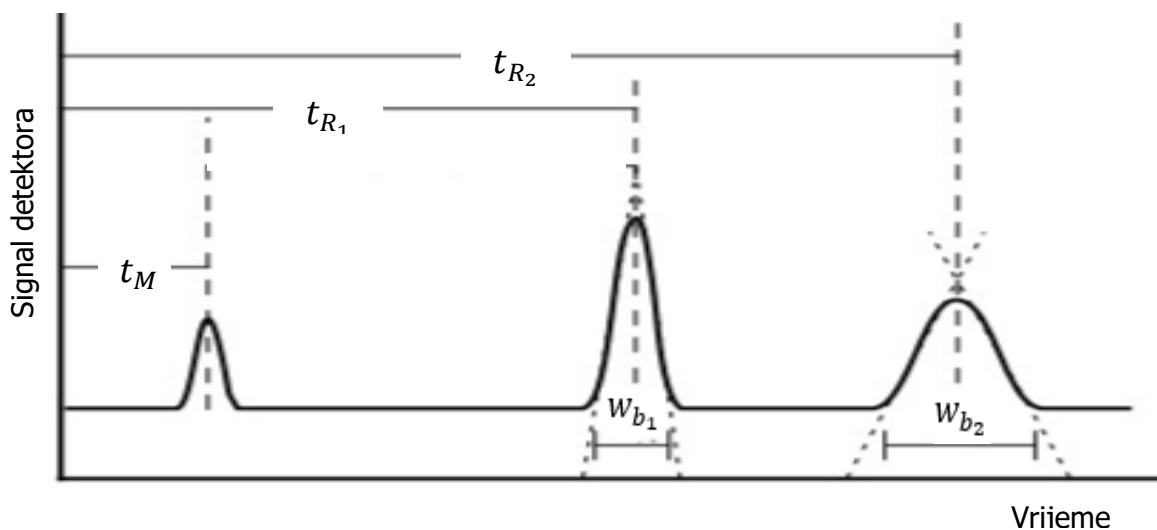
Broj teorijskih tavana označava se s N i predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između mobilne i stacionarne faze pri čemu je efikasnost kolone veća što je veći broj teorijskih tavana. Definira se jednadžbom $N = 16(t_R / w_b)^2$ gdje je w_b širina pika osnovice (Slika 4.) (Cindrić i sur., 2009).



Slika 4. Računanje teorijskih tavana, N (Stauffer i sur., 2008).

2.3.1.3. Razlučivanje

Razlučivanje je mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dva analita na koloni i ovisi o faktoru zadržavanja, razdvajanja i broju teorijskih tavana te se definira kao $R_S = 2(t_{R_2} - t_{R_1}) / (w_{b_1} + w_{b_2})$ ili $R = 0.25(N)^{1/2}[(\alpha - 1) / \alpha][k_2 / (k_2 + 1)]$ (Slika 5.) (Cindrić i sur., 2009).

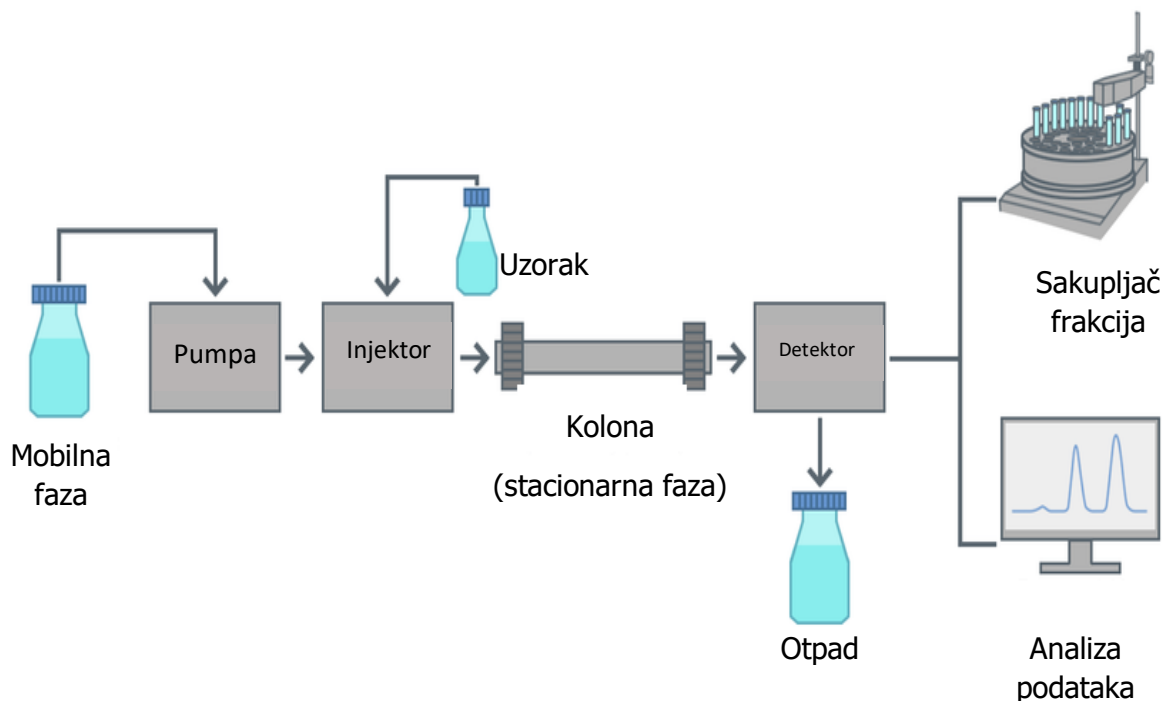


Slika 5. Odjeljivanje dva susjedna pika (Dunnivant, 2017)

2.3.1.4. Tekućinski kromatograf

Sustav za tekućinsku kromatografiju naziva se tekućinski kromatograf te se sastoji od sustava za dobavu mobilne faze, injekcijskog sustava, kućišta za kolonu i detektora (Slika 6.). Sustav za dobavu mobilne faze sadrži odzračivač mobilnih faza, binarnu ili kvarternu pumpu, regulator tlaka u sustavu i dinamičku ili statičku miješalicu. Injekcijski sustav sastoji se od injekcijskog

ventila, automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*), injekcijske igle i graduirane injekcije ili pumpe te kapilare određenog volumena. Detektori mjere prisutnost pojedine komponente pri izlazu iz kolone temeljem promjene fizikalnih veličina ili specifičnih svojstava efluenta te ih prevodi u električni signal. Najčešće se koriste detektori apsorpcije UV/VIS zračenja, detektor indeksa loma, fluorescentnih zraka ili detektor električne vodljivosti, kao i spektrometar masa (Cindrić i sur., 2009).



Slika 6. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa (Labster Theory, 2021).

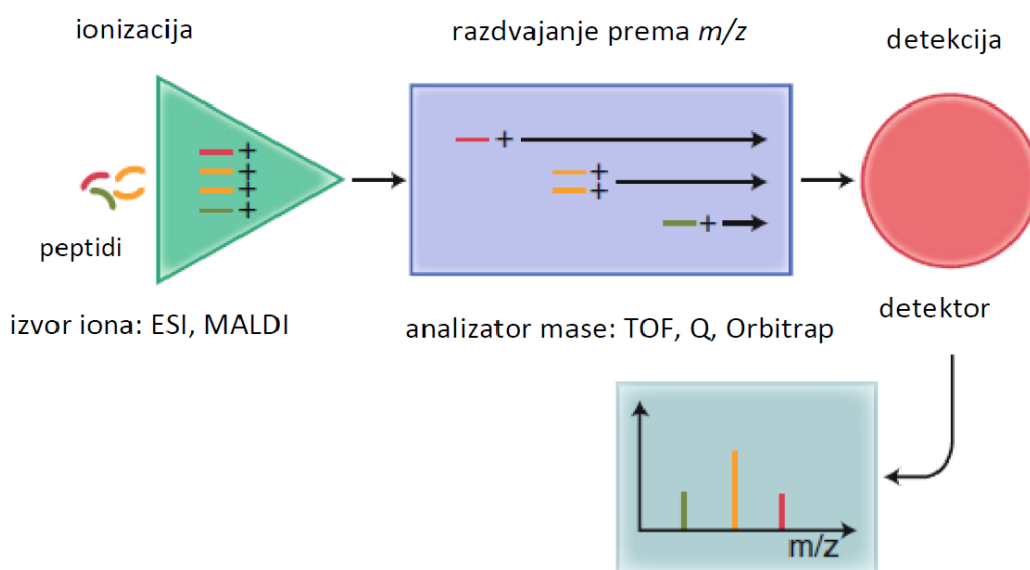
Direktno spajanje tekućinskog kromatografa sa spektrometrom masa moguće je uz odabir odgovarajućeg pufera, organskih otapala i protoka, kao i izvora ionizacije te analizatora masa; kvadrupola (engl. *Quadrupole*, Q), trostrukog kvadrupola (engl. *Triple quadrupole*, QqQ), analizatora vremena leta (engl. *Time-of-Flight*, TOF) ili orbitrap (engl. *Orbitrap*) tehnologije (Begić, 2018).

2.3.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička metoda za razdvajanje ioniziranih molekula na osnovu razlike omjera mase i naboja (m/z). Osnovni dijelovi spektrometra masa su izvor ionizacije, analizator masa i detektor (Begić, 2018) (Slika 7.). Rezultat analize je spektar masa; dvodimenzionalni

prikaz intenziteta signala (na ordinati) u odnosu na omjer m/z (na apscisi). Spektrometrija masa najčešće se koristi za određivanje točne mase molekula te identifikaciju i kvantifikaciju.

Spektar masa moguće je snimiti na dva načina, kontinuirano i centroidno. Kontinuiranim načinom postiže se stvarna spektrometrijska širina pika što generira više podataka pri čemu računalni sustav postaje značajno zagušen. Centroidni prikaz spektra masa daje prosječne mase pikova u obliku stupaca te se najčešće koristi u rutinskim analizama (Cindrić i sur., 2009).

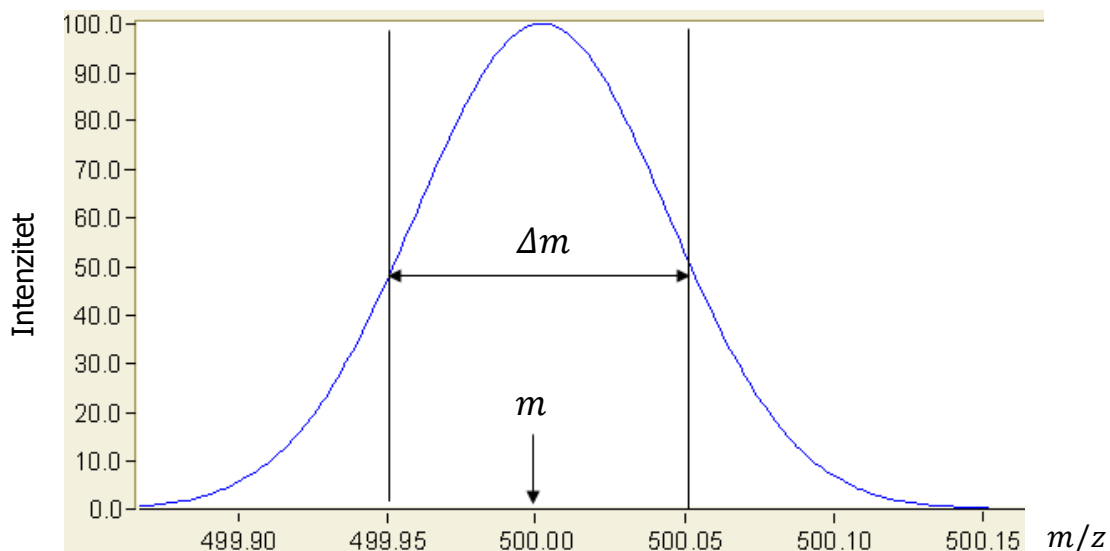


Slika 7. Prikaz postupka spektrometrije masa (Agnetti i sur., 2016).

Spektrometar masa karakteriziraju tehnički parametri: razlučivanje, točnost mjerenja masa, područje mjerenja masa, osjetljivost, granica detekcije i brzina snimanja spektra, a definirani su odabirom analizatora masa.

2.3.2.1. Razlučivanje

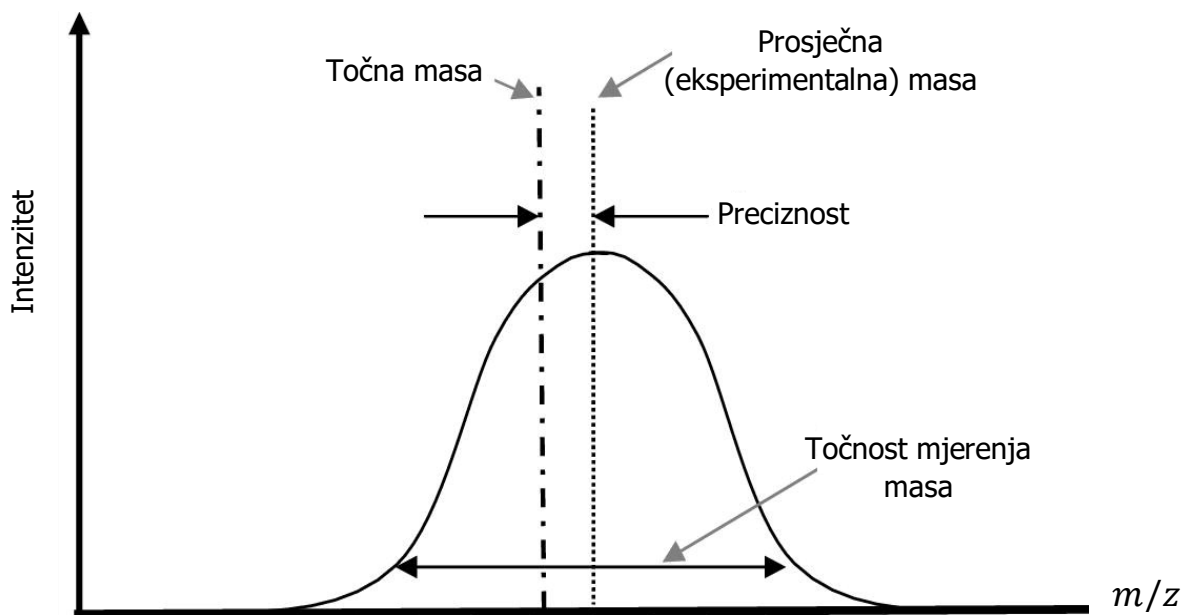
Razlučivanje je sposobnost odvajanja iona sličnih masa te se definira jednadžbom $R = \frac{m}{\Delta m}$ gdje je R razlučivanje, m prosječna molekulska masa kod vrha maseong pika i Δm raspon masa kod polovice njegove visine (Slika 8.) (Cindrić i sur., 2009).



Slika 8. Prikaz masenog pika (UCDAVIS Fiehn Lab,2016).

2.3.2.2. Točnost mjerenja masa

Točnost mjerenja masa je sposobnost spektrometra masa da odredi molekulsku masu što bliže pravoj (izotopnoj) masi (Slika 9.), a izražava se u ppm. Definirana je kao $ppm = 10^6 \Delta m_{točna} / m_{mjerena}$, pri čemu je $\Delta m_{točna}$ razlika izračunate i izmjerene molekulske mase (Čindrić i sur., 2009).



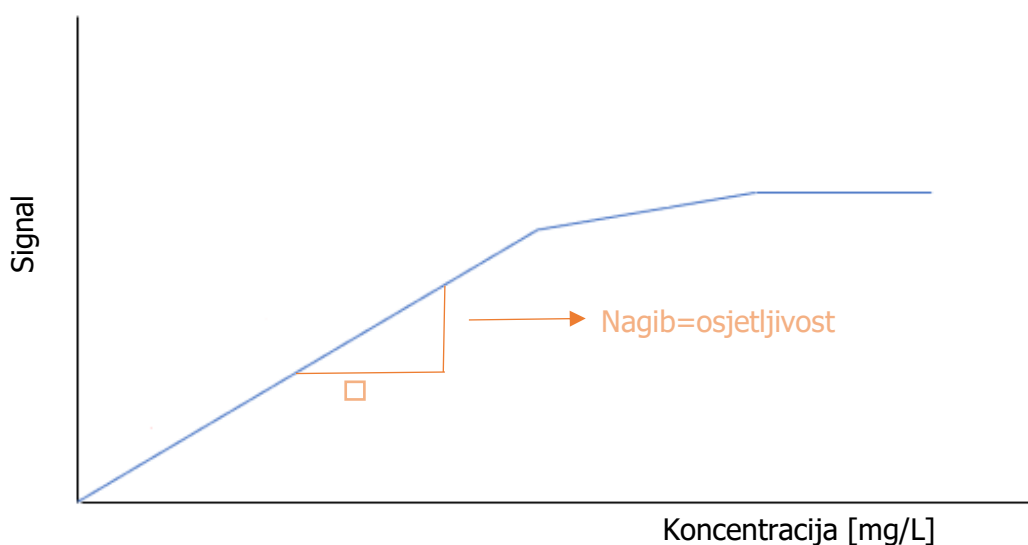
Slika 9. Točnost izmjerene mase u odnosu na teoretsku (Brenton i sur., 2010).

2.3.2.3. Područje mjerenja masa

Područje mjerenja masa je razlika gornje i donje granice m/z koje se mjeri određenim spektrometrom masa. Definirano je pomoću $\Delta m_{\text{područja}} = m_{\text{gornja granica}} - m_{\text{donja granica}}$, gdje je $m_{\text{gornja granica}}$ najveća, a $m_{\text{donja granica}}$ najmanja moguća izmjerena masa. Područje mjerenja mase ovisi o vrsti molekula koje se analiziraju, tj. vrijednosti m/z njihovih molekulskih iona i iona fragmenata (Cindrić i sur., 2009).

2.3.2.4. Osjetljivost

Osjetljivost je osobina detektora, točnije njegovog odziva prilikom analize određene količine analita (Slika 10.). Definira se kao $S_{m/z} = A_{\text{masa-struja}} / (Gm_{\text{uzorka}})$, pri čemu je $A_{\text{masa-struja}}$ površina ispod masenog pika izmjerena u vremenu, a iskazuje se u kulonima; G odziv detektora iona; dok je m_{uzorka} masa analita u μg (Cindrić i sur., 2009).



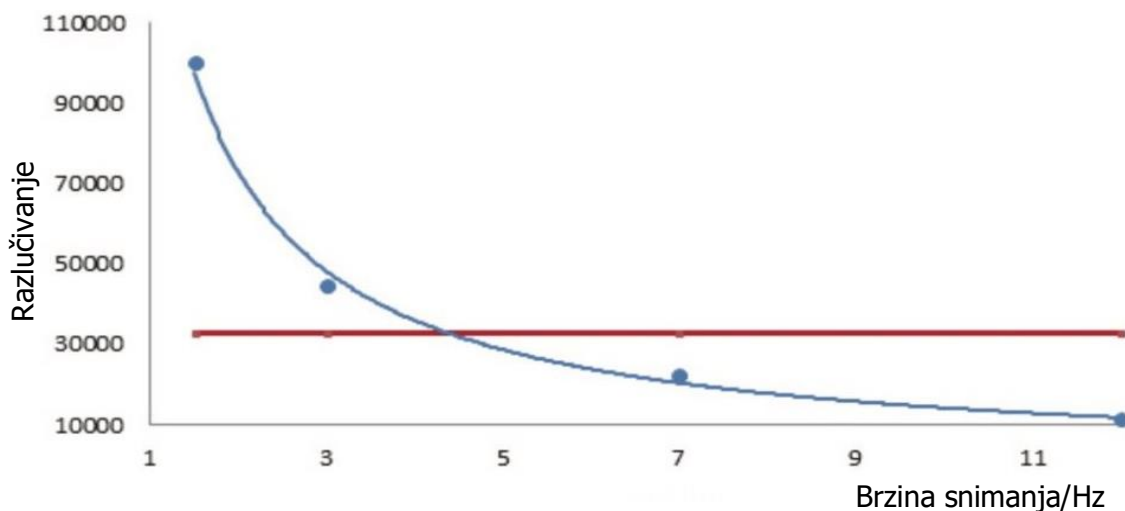
Slika 10. Osjetljivost detektora je nagib linearnog dijela grafa (Hach, 2017).

2.3.2.5. Granica detekcije

Granica detekcije predstavlja najmanju količinu uzroka koja se može odrediti kvalitativno, pri čemu se izmjereni napon singla za uzorak računa kao $V_{\text{mjereni}} > V_{\text{osnovne linije}} + 3\sigma_{\text{osnovne linije}}$ gdje je $V_{\text{osnovne linije}}$ prosječni napon u određenom vremenu i $\sigma_{\text{osnovne linije}}$ standardna devijacija napona osnovne linije u istom vremenu (Cindrić i sur., 2009).

2.3.2.6. Brzina snimanja spektara

Brzina snimanja spektara (engl. *scan speed*) je brzina snimanja zadanih masa u masenim jedinicama po sekundi (Slika 11.). Definirana je s $\Phi_s = (dm / dt)$, pri čemu dm označava raspon masa a dt vrijeme snimanja tog raspona. Maksimum svakog masenog pika predstavlja izmjerenu struju iona (Cindrić i sur., 2009).



Slika 11. Razlučivanje u ovisnosti o brzini snimanja spektara za analizatore TOF (crvena linija) i orbitrap (plava linija) (Alelyunas i sur., 2013).

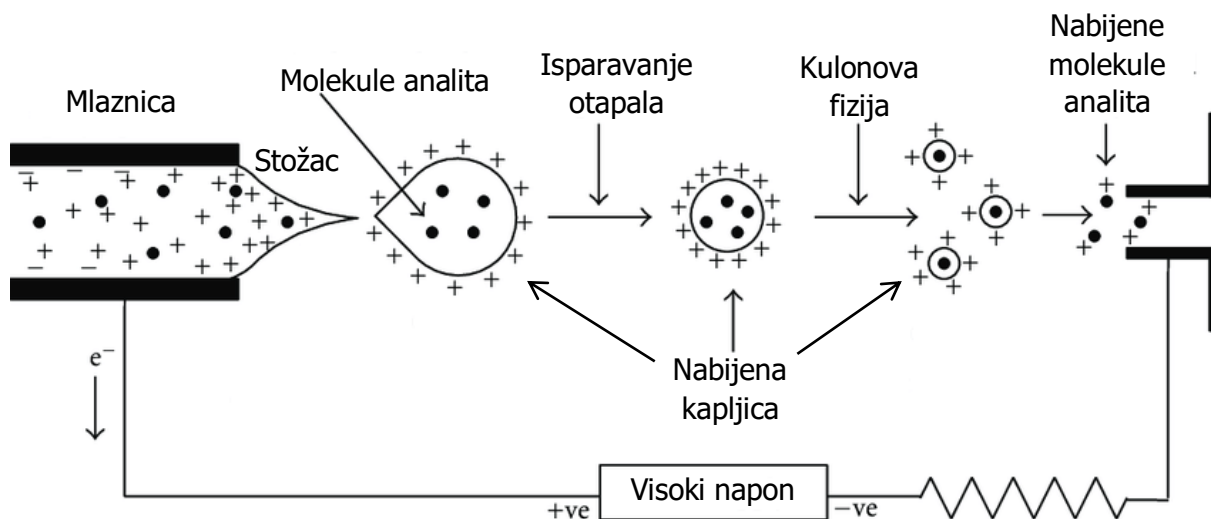
2.3.3. Ionizacija u spregnutom sustavu LC-MS

Da bi se mogle analizirati spektrometrom masa, molekule uzorka se najprije ioniziraju pri čemu se uzorak može uvesti direktno u spektrometar masa ili razdvojen na komponente primjenom npr. tekućinske kromatografije. U spregnutom sustavu LC-MS najčešće se koristi ionizacija elektroraspršivanjem, ESI (engl. *Electrospray ionization*), koja služi kao međuspoj, a kompatibilna je sa svim analizatorima masa (Begić, 2018).

2.3.3.1. Ionizacija elektroraspršivanjem (ESI)

Ionizacija elektroraspršenjem može biti pozitivna i negativna, a odvija se pri atmosferskom tlaku u struji dušika pri čemu je temperatura viša od 100 °C. Na početku ionizacije pokretna faza i analit uvode se u ionizator kapilaram koja je ujedno i elektroda visokog napona (2-5 kV) te se na njenom vrhu oblikuje maglica sačinjena od kapljica otapala i dijelom uparenog otapala.

Kolektorska elektroda privlači nabijene kapljice, dajući im dodatno ubrzanje. Kapljice postaju sve manje djelovanjem električnog potencijala, dušika i temperature te ioni izlaze na njihove površine. Djelovanjem odbojnih kulonskih sila, koje su veće od onih napetosti površine, kapljice se otparavaju ili razbijaju na sitnije kapljice (Slika 12.). Ioni uzorka oko sebe imaju polje uparenog otapala te se uvode u visoki vakuum i analizator masa (Cindrić i sur., 2009).



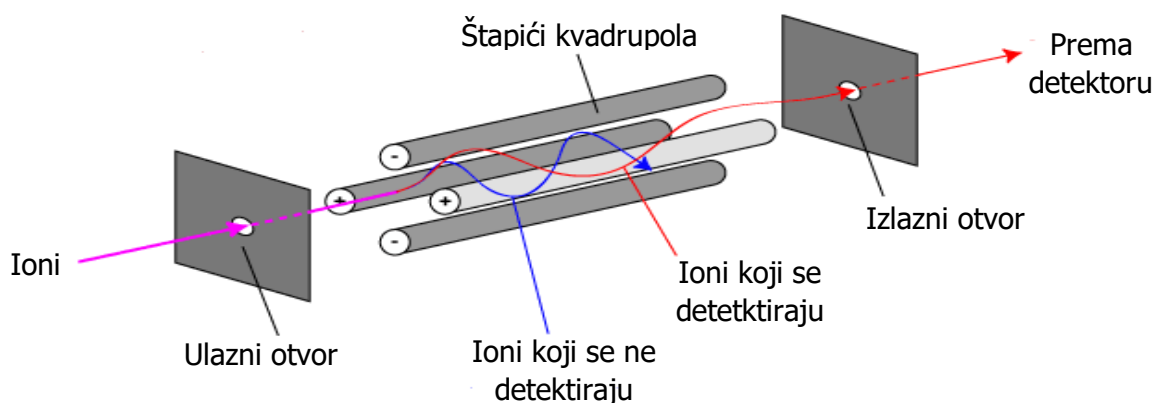
Slika 12. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršivanjem (Banerjee i sur., 2012.).

2.3.4. Analizatori u spregnutom sustavu LC-MS

Analizator masa je komponenta u kojoj dolazi do razdvajanja na temelju omjera mase i naboja, m/z . Za različite analizatore koriste se različiti ionizacijski izvori i detektori (Cindrić i sur., 2009). Najčešći analizatori su kvadrupol, trostruki kvadrupol, obitrap i analizator vremena leta.

2.3.4.1. Kvadrupol

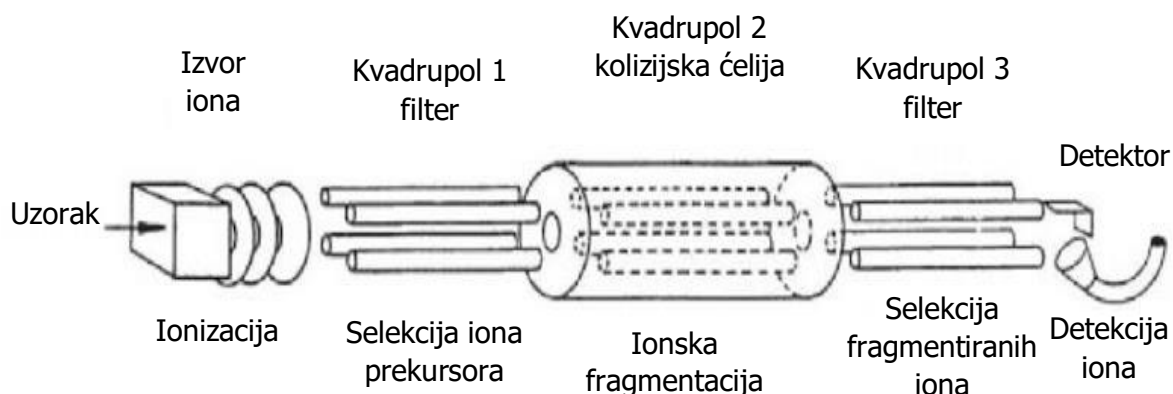
Kvadrupol je često korišten analizator koji se sastoji od četiri metalna štapića raspoređena u dva okomito položena para pri čemu je jedan par spojen na konstantni napon i promjenjivu radiofrekvenciju dok drugi ima napon i radiofrekvenciju suprotne polarnosti (Slika 13.). Ovisno o struji koja je korištena u sustavu, ioni različitih vrijednosti m/z mogu zadržati stabilnu putanju i proći kroz analizator ili postaju neutralne molekule ako dodirnu elektrodu i ne detektiraju se (Cindrić i sur., 2009).



Slika 13. Shematski prikaz kvadrupola (Paul J. Gates, 2014).

2.3.4.2. Trostruki kvadrupol (QqQ)

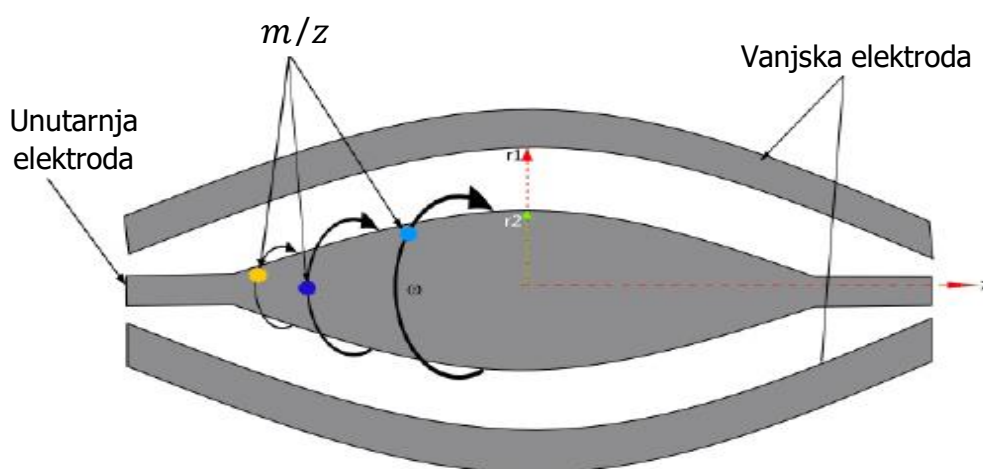
Trostruki kvadrupol je tandem spektrometrije masa koji se sastoji od dva kvadrupola Q između kojih se nalazi kvadrupol radio-frekvencije, q koji djeluje kao kolizijska ćelija (dolazi do fragmentacije iona uslijed sudara s kolizijskim plinom). Trostruki kvadrupol radi na istom principu kao i jednostruki kvadrupol. Q i Q su također građeni od četiri paralelna metalna štapića te su kontrolirani istosmjernom strujom (dc) i radiofrekvencijskim potencijalom (rf) dok je q podređen samo radiofrekvencijskom potencijalu (Slika 14.). Kod nekih analizatora je q zamijenjen heksapolom ili oktopolom kako bi se poboljšala efikasnost. Prednosti trostrukog kvadrupola su jednostavno upravljanje, niska cijena i visoka efikasnost čak i prilikom analize malih molekula (Yost i Enke, 1979).



Slika 14. Princip rada trostrukog kvadrupola spektroskopije masa (QQQ-MS) (Yost i Enke, 1979).

2.3.4.3. Orbitrap

Orbitrap je analizator masa koji se sastoji od vanjske elektrode i unutarnje vretenaste elektrode koja zarobljava elektrone u orbitalnom kretanju oko vretena (Slika 15.). Struja zarobljenih elektrona je detektirana i pretvorena u spektar masa Fourierovim transformacijama frekvencijskog signala. Ioni su zarobljeni zbog elektrostatskih privlačenja koja ostvaruju s unutarnjom elektrodom; kruže oko nje u eliptičnim putanjama, a također se pomiču i naprijed-natrag po osi elektrode te u konačnici njihovo kretanje u prostoru slično zavojnicama. Vanjska elektroda je na svojem kraju podijeljena na dva simetrična senzora spojena na diferencijalno pojačalo gdje se detektiraju ionski prsteni (Duaví i sur., 2017).

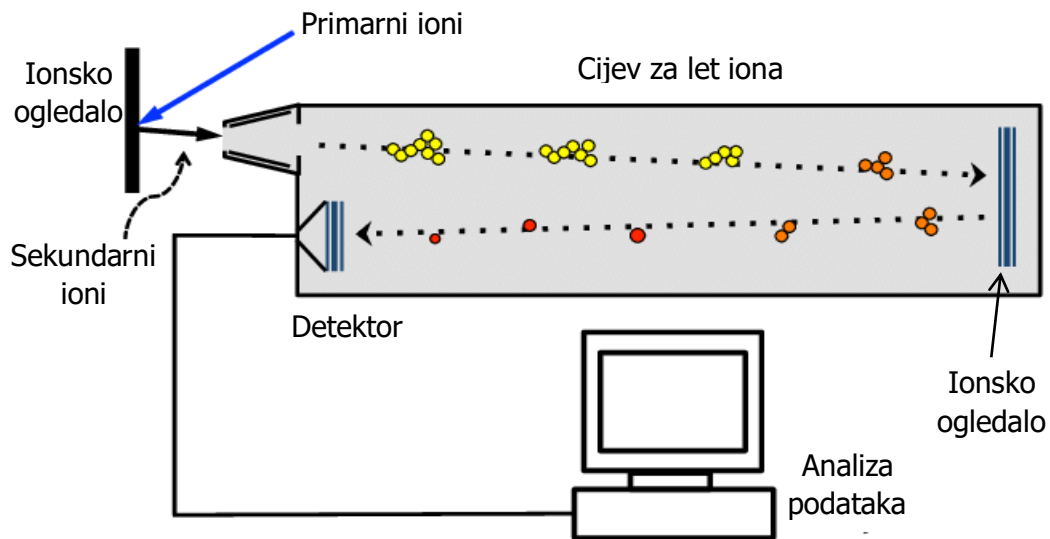


Slika 15. Shematski prikaz orbitrapa i kretanja iona u obliku zavojnice (Duaví i sur., 2017).

2.3.4.4. Analizator vremena leta (TOF)

Analizator vremena leta (engl. *Time of flight*, TOF) analizira ione na temelju različitih brzina kretanja, ovisnim o masama iona. Ioni manje mase dostižu veće brzine od iona veće mase. Analizator otpušta skupljene ione te se mjeri vrijeme leta do detektora koje u prosjeku iznosi 5-100 μ s. Ioni se razdvajaju prema brzinama kojim stižu na detektor u različitim vremenima. TOF može imati i ionsko ogledalo te tako omogućiti ionima istih masa, ali različitih kinetičkih energija, istovremeni dolazak na detektor (Slika 16). Obično se hibridiziraju s kvadrupolnim analizatorima u tandemnoj (MS/MS) analizi (Cindrić i sur., 2009). Mana im je uski dinamički raspon zbog čega je npr. kod analize biljnog preparata za liječenje hipertenzije, dobiveno nekoliko nepoznatih pikova za koje se sumnjalo da pripadaju amlodipinu, indapamidu i valsartanu. Prisutnost navedenih tvari dodatno je potvrđena koristeći sustav LC-MS u

kombinaciji s ekstrakcijom na čvrstoj fazi, SPE (engl. *Solid phase extraction*) i nuklearnom magnetskom rezonancijom (engl. *Nuclear magnetic resonance*, NMR) (Kesting i sur., 2010).



Slika 16. Shematski prikaz analizatora vremena leta (Johansson, 2013).

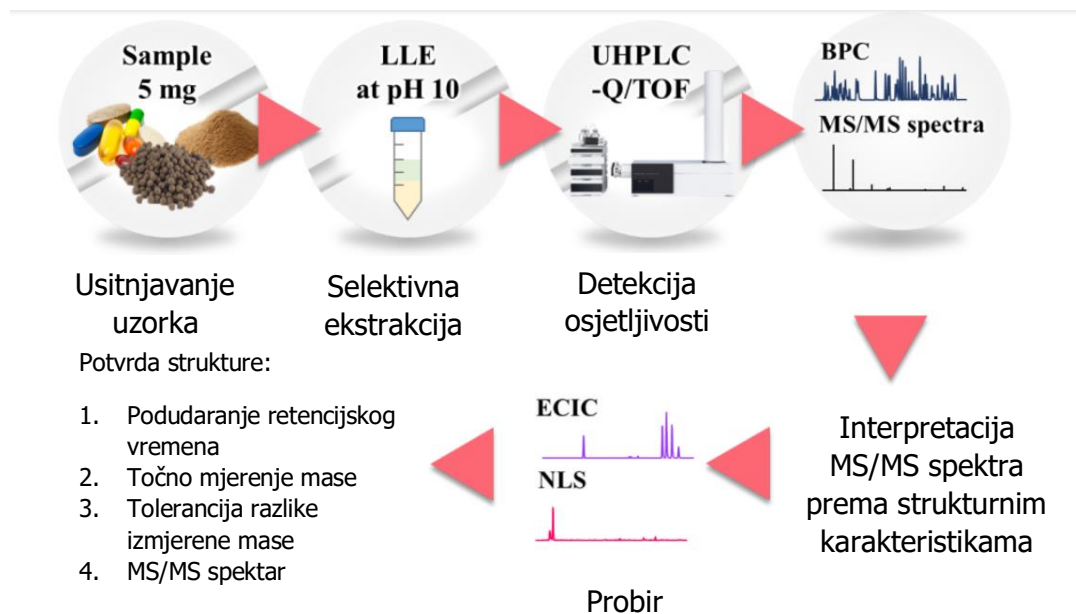
3. PRIMJENA SUSTAVA LC-MS ZA ANALIZU ILEGALNIH TVARI U BILJNIM PRIPRAVCIMA

Porastom broja ilegalnih tvari koje se dodaju u biljne pripravke, njihova detekcija je postala izazov. Zbog iznimno složenih matrica biljnih pripravaka, analitički postupci mogu biti dugotrajni i rezultirati lažno pozitivnim rezultatima. Također, rutinske analitičke metode koje se standardno koriste u analizi farmaceutski aktivnih tvari imaju svoja ograničenja jer ne omogućavaju detekciju nepoznatih tvari (koje nisu sastavni dio lijekova). Stoga je potrebno razviti robusne, visokoprotočne, osjetljive i pouzdane metode za određivanje nezakonitih tvari u biljnim lijekovima i dodatcima prehrani. Navedeno je moguće postići primjenom automatiziranog sustava (U)HPLC-(HR)MS.

Sustav LC-HRMS koristi se za detekciju i kvantifikaciju farmaceutika u biljnim dodacima prehrani pri čemu se dobiveni spektri masa koriste za pretraživanje spektralnih knjižnica ili baza podataka kako bi se pronašla nepoznata komponenta u uzorku. Osim navedenog, predefiniranom listom omogućen je probir analita koja sadrži veliki broj ciljanih komponenata, tj. njihove vrijednosti m/z , pri čemu se najviše pažnje mora posvetiti granici detekcije koja odgovara spojevima od interesa, kako se ne bi dobili lažni pozitivni ili negativni rezultati (Kaufmann i sur., 2013). Također se prilažu i podaci o izmjerenoj točnoj masi tvari, kao i retencijsko vrijeme. Do sada nije razvijena jedinstvena metoda koja bi automatski objedinila ciljane i neciljane analize ilegalnih farmaceutika i njihovih derivata (Vaclavik i sur., 2014).

Također se kao jedna od metoda probira i identifikacije anaboličkih steroida u dodacima prehrani, može koristiti bioafinitetna spektrometrija masa. Temelji se na inhibiciji vezanja označenog izotopom označenog 17β -testosterona- d_3 na rekombinantni globulin koji veže ljudski spolni hormon, imobiliziran na paramagnetskim mikrokuglicama koje sadrže dizajnirane steroide. Smanjena koncentracija stabilnog izotopa je analizirana sustavom UHPLC-MS/MS nakon izolacije bioafinitetnom tehnikom, a steroidi identificirani sustavom čip- UHPLC-QqTOF MS. Istim principom, korišten je rekombinantni receptor α za vezanje humanog estrogena i tamoksifen za vezanje i označavanje prilikom identifikacije estrogena u dodacima prehrani (Aqai i sur., 2013).

Što se tiče samog postupka analize ilegalnih tvari iz biljnih pripravaka, na Slici 17. prikazan je koncept analize 98 ilegalnih tvari različitih skupina spojeva (kanabinoidi, nesteroidni protuupalni lijekovi, lijekovi za smanjivanje težine te psihotropne tvari), a sastoji se od homogenizacije biljnih preparata, ekstrakcije, analize UHPLC-MS te interpretacije rezultata (Hong i sur., 2019).



Slika 17. Postupak analize ilegalnih tvari različitih skupina spojeva. ECIC označava ekstrahirani ionski kromatogram, a NLS neutralni gubitak. Potvrda strukture omogućena je usporedbom retencijskog vremena, točnim mjerenjem mase te potvrdom iona produkata (Hong i sur., 2019).

Ponekad je za određivanje strukture nepoznate sintetske krivotvorine u biljnim pripravcima i dodacima prehrani potrebno koristiti nekoliko analitičkih tehnika, kao što su npr. u slučaju identifikacije analoga sibutramina i PDE-5 inhibitora korištene tehnike UV, MS i NMR, a dobiveni rezultati uspoređeni su s poznatim farmaceuticima i njihovim analogima. Bitno je istaknuti da je za nedvojbenu potvrdu pozitivnih rezultata u konačnici potrebno koristiti standarde.

3.1. Priprema uzorka

Pravilna priprema uzorka ovisi o složenosti i prirodi matriksa uzorka, obliku doziranja i osjetljivosti analitičke metode. Za ekstrakciju ilegalnih komponenata iz homogeniziranih tableta, sadržaja kapsula ili praha koriste se organska otapala (metanol, aceton) koja se miješaju s vodom. Tekući uzorci razrjeđuju se otapalima tijekom nekoliko međukoraka koji uključuju centrifugiranje, filtraciju i dodatna razrjeđenja. Ako dodatna pročišćavanja nisu potrebna, uglavnom se upotrebljava ekstrakcija, povremeno i centrifugiranje tako da postupak pripreme uzorka „razrijedi i unesi“ obično traje od 10 do 35 min (Liang i sur., 2006).

Osim u sadržaju kapsula, ilegalne komponente pripravaka mogu biti prisutne i u ljuskama kapsula. Na primjer, pronađeni su tragovi rosiglitazona u ljuskama kapsula anti-dijabetičkog

biljnog pripravka (Pang i sur., 2009) dok u sadržaju kapsule navedeni spoj nije bio detektiran, kao ni prisutnost PDE-5 inhibitora tadalafila u ljuskama kapsula pripravaka za erektilnu disfunkciju (Lanzarotta i sur., 2012). Ugradnja navedenih spojeva u ljuske kapsula provedena je kako krivotvorene komponente ne bi bile otkrivene uobičajenim analitičkim postupcima. Radi navedenog, potrebno je analizirati cjelokupni proizvod, ljusku kapsule i njen sadržaj. Homogenizacija cijele kapsule ili soft-gela se odvija u prisustvu tekućeg dušika, nakon čega se provodi ekstrakcija krivotvorina gore spomenutim postupkom.

3.2. Analitičke strategije za otkrivanje ilegalnih tvari u biljnim pripravcima

3.2.1. Odabir analizatora masa

Obzirom da analizator masa definira osjetljivost, rezoluciju i raspon masa u analitičkim metodama, odabir analizatora vrlo je važan za identifikaciju spojeva u složenim matricama uzoraka, kao i njihovu kvantifikaciju s točnošću i pouzdanošću. Upotreba analizatora masa poput TOF-a i orbitrapa osigurava visoku osjetljivost, točnost mjerenja mase te selektivnost, posebice mjerenja ekstrakcijom ionskih kromatograma analita u uskom rasponu masa. Tako je npr. selektivnost LC-TOF sustava za sildenafil, tadalafil i vardenafil je povećana praćenjem ekstrahiranih ionskih kromatograma za protonirane molekule (pozitivno nabijene ione) i istaknute fragmentirane ione. Prilikom fragmentacije svih iona može doći do potvrde lažnih pozitivnih i negativnih rezultata zbog toga jer neki detektirani fragmenti mogu potjecati od srueluiranih komponenata matriksa (Kesting i sur., 2010).

Hibridni sustavi HRMS kao što su QqTOF i kvadrupol-orbitrap daju pouzdanije rezultate identifikacije i potvrde analita u odnosu na TOF MS radi mogućnosti fragmentacije unaprijed odabranih iona, kao i veće točnosti mjerenja mase i snage razlučivanja. Tako je npr. kvadrupol-orbitrap spojen s instrumentom UHPLC korištenim za separaciju analita kako bi se istovremeno odredilo 96 različitih farmaceutika, toksina biljaka i sekundarnih metabolita biljnih dodataka prehrani. Podatkovno-ovisna analiza (engl. *Data dependent analysis*, DDA) omogućila je istovremeno snimanje cijelog spektra masa visoke rezolucije, kao i spektra masa iona produkta što je omogućilo detekciju, kvantifikaciju i potvrdu ciljanog analita. Kolizijska energija optimizirana je za svaki od analita kako bi se dobio tandemni spektar masa dovoljno visokog intenziteta iona prekursora, kao i za što je više moguće njegovih iona produkata. (Vaclavik i sur., 2014).

Analizator masa QqQ-LIT (engl. *Linear ion trap, LIT*) razdvaja uzorak na temelju sub-strukture pri čemu nastaju karakteristični ioni produkti. Kod analize iona analoga inhibitora PDE-5, korišteni su fragmenti iona šesnaest analoga sildenafil i vardenafila. Kombinirana je metoda ovisna o podacima (DDA) s skeniranjem iona produkata za potvrdu strukture. Veću selektivnost u probiru nepoznatih analoga moguće je postići promjenom metode HRMS s fragmentacijom svih iona (Vaclavik i sur., 2014).

Analizom uzoraka pripravka za mršavljenje za koji se sumnjalo da sadrži analoge sibutramina, detektiran je intenzivan pik u ekstraktu metanola i vode (Kim i sur., 2013). Korištena je metoda UHPLC s detektorima DAD i QqTOF MS. Otkriveno je da nepoznata komponenta ima neznatno veće retencijsko vrijeme, sličan UV spektar, ali različitu molekulsku masu u odnosu na sibutramin. Analog je zatim izoliran i analiziran tehnikama UHPLC-HRMS te ^1H i ^{13}C NMR-om. Dobiveni rezultati ponovo su uspoređeni s elementarnom formulom sibutramina te je nađen dodatni atom klora u strukturi nepoznate komponente. Metodama NMR (DEPT, COSY i HMBC) otkriveno je da je 3-klorofenilna grupa sibutramina zamijenjena 3,4-diklorofenilnom, a analog je nazvan kloroksibutramin zbog stukturne sličnosti. Još jedan od analoga sibutramina, pronađen u uzorku pripravka za mršavljenje, je i 11-desizobutil-11-benzilsibutramin (Mans i sur., 2013). Nepoznati pik je uočen tijekom probira primjenom tehnike IMS (engl. *Ion mobility mass spectrometry*), dok je struktura određena koristeći sustav HPLC-HRMS s orbitalnom ionskom stupicom te NMR-om.

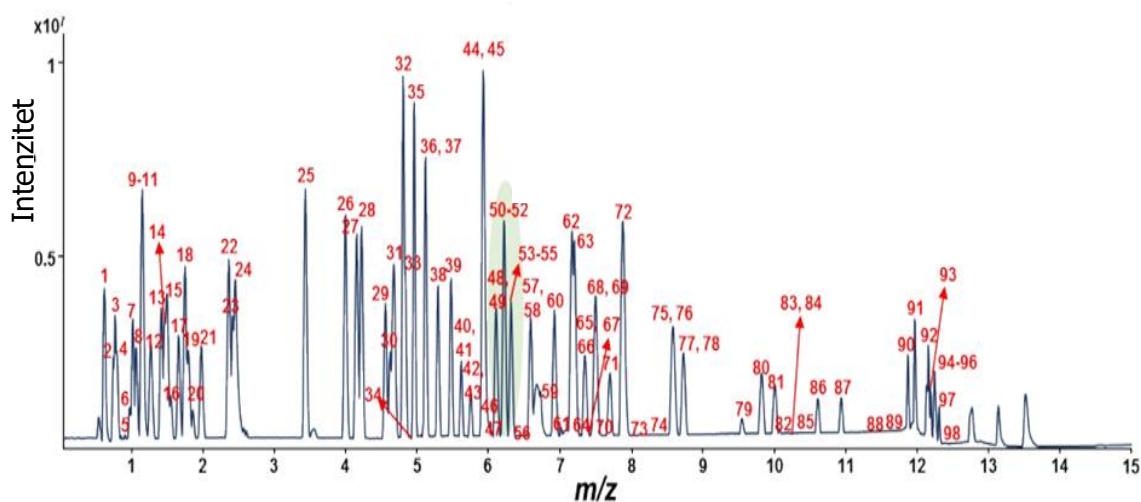
3.2.2. Odabir ciljanog ili neciljanog pristupa

Postoje dva načina načini prikupljanja podataka kojima se mogu detektirati i identificirati farmaceutske krivotvorine u dodacima prehrani i biljnim pripravcima, a to su neciljani i ciljani pristup. Neciljani pristup omogućuje analizu „svih“ tvari u uzroku, a time i identifikaciju novih spojeva, dok je ciljana analiza usmjerena ka analizi unaprijed određenih poznatih spojeva.

3.2.2.1. Neciljana analiza

Neciljna analiza omogućava detekciju i identifikaciju lijekova i njihovih analoga koji još nisu prijavljeni kao krivotvorine biljnih pripravaka i dodataka prehrani. Krivotvorine su često dodane u vrlo malim koncentracijama te mogu biti posljedica kontaminacije prilikom proizvodnje ili "razrjeđenja" same krivotvorene komponente. Kako bi se postigao željeni biološki učinak, a

smanjila mogućnost detekcije, dodaje se više od jedne krivotvorine u vrlo maloj količini. Zbog toga je potrebno koristiti metodu koja je vrlo osjetljiva i selektivna radi čega se za otkrivanje krivotvorina u biljnim pripravcima dodacima prehrani najčešće koristi LC-MS. U ovom slučaju koristila se metoda s potpunim skeniranjem iona prekursora kao i njihovih iona produkata potpunim MS načinom rada, tzv. „full MS“ (Slika 18.), koji pokriva raspon masa iona nepoznate krivotvorine ili analoga. Nepoznate tvari mogu se detektirati primjenom specijaliziranih računalnih programa koristeći kromatogram osnovnog pika (engl. *Base peak chromatogram*, BPC) ili ukupne ionske struje (engl. *Total ion chromatogram*, TIC) za pretraživanje baza podataka (Kesting i i sur., 2010).



Slika 18. Spektar masa biljnog pripravka koji sadrži 96 spojeva (BPC, način rada: *full MS*) (Kesting i sur., 2010).

3.2.2.2. Ciljane analize

Kod ciljanih analiza popis analita u uzorku unaprijed je poznat, što omogućava jednostavniju pripremu uzoraka i kraće vrijeme analize uz postizanje veće osjetljivosti. Analiza je temeljena na praćenju određenih iona. Ovaj pristup omogućio je paralelno određivanje šezdeset četiri ilegalne komponente u dodacima prehrani koji su se sastojali od različitih krivotvorina te ilegalnih ili neodobrenih farmaceutika (Shin i sur., 2020). Uzorci su se sastojali od pripravaka za erektilnu disfunkciju, mršavljenje, poboljšanje mišićne snage i opuštanja te su bili u obliku kapsula, prahova, tableta, soft-gelova, tekućina, vrećica čaja i energetske pločice. Od ilegalnih tvari, u preparatima za mršavljenje i poboljšanja sportskih performansi najviše je bilo sinefrina koji je slične strukture, učinka i nuspojava kao efedrin, a dodan je i na popis komponenti koje

se provjeravaju na sportskim natjecanjima od strane Svjetske Anti-Doping Agencije (engl. *World Anti-Doping Agency*, WADA). Također je u nekoliko uzoraka pripravaka za poboljšanje sportskih performansi, kao i za erektilnu disfunkciju pronađen i johimbin, čije nuspojave mogu uzrokovati psihološke smetnje. Nađeni su još 5-HTP (5-hidroksitirofan) i melatonin (koji u kombinaciji mogu prouzročiti bunilo, padavicu te poremećaj u prehrani), ikarin, kavain, kaskaro i senoisidi, koji, iako su korisni, u neodgovarajućoj količini i kombinaciji mogu izazvati srčani udar, akutnu ozljedu jetre, zastoj bubrega, plućnu emboliju i smrt.

3.2.2.2.1. Praćenje odabranih iona (SIM)

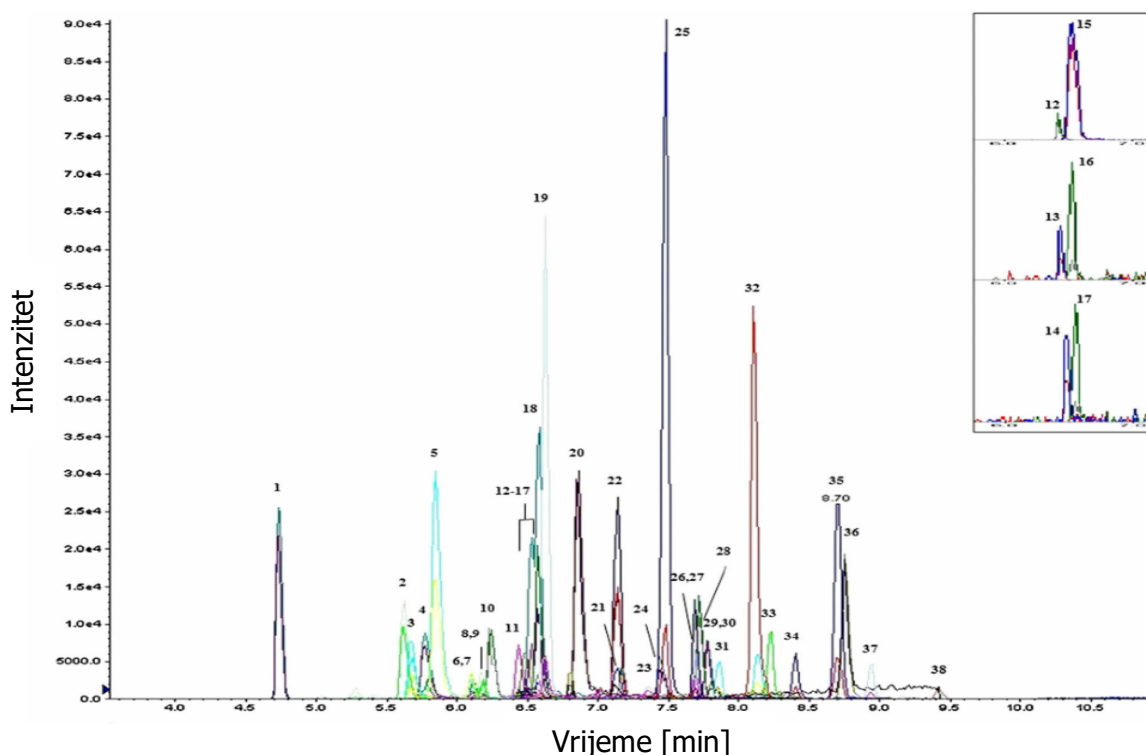
Praćenje odabranih iona (engl. *Selected/Single ion monitoring*, SIM) je metoda skeniranja pri čemu se detektiraju samo ioni određenog omjeri mase i naboja. Obično se koristi kod uskog raspona masa pri čemu se nastoji uzeti čim uži raspon kako bi se dobili što točniji rezultati. Problem nastaje kod uzorka čije su mase komponente matriksa približno jednake masi analita te je bez korištenja standarda za određivanje mase i retencijskog vremena i/ili dodatne analize tandemnom spektrometrijom masa nemoguće razlikovati navedene spojeve. Najefektivnija i najviše korištena je kod kvadrupola (Wang i sur., 2009).

3.2.2.2.2. Praćenje višestrukih reakcija (MRM)

Praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM) je visoko specifična i osjetljiva metoda spektrometrije masa koja može selektivno kvantificirati komponente u kompleksnom matriksu. Kao analizator masa koristi trostruki kvadrupol pri čemu se prvo cilja ion prekursor (molekulski ion) koji odgovara komponenti od interesa čijom fragmentacijom nastaju određeni ioni produkti. Jedan ili više takvih fragmenata izdvajaju se za potrebe kvantifikacije. U spektrometru masa se izoliraju samo one komponente koje zadovoljavaju uvjete tako da specifični ion prekursor i njegovi fragmenti odgovaraju teoretskoj masi molekule od interesa. Zanemarujući ostale ioni koji ulaze u spektrometar masa, postupak dobiva na osjetljivosti uz zadržavanje izvrsne točnosti (Vaclavik i sur., 2014).

Prilikom analize krivotvorina u biljnim pripravcima (Odluka komisije 2002/657/EC, 2002), u državama članicama Europske unije, najčešće se provodi analiza MRM pri čemu se prate barem dva višestruka prijelaza kao i njihov relativni intenzitet. Broj višestrukih prijelaza, koji mogu biti istovremeno analizirani u svrhu dobivanja prihvatljivih rezultata, ograničen je vremenom

prikupljanja svakog od prijelaza. Prilikom simultane analize 38 PDE-5 inhibitora u krivotvorenom biljnom pripravku metodom MRM, prijelazi ciljanog analita su praćeni samo oko očekivanog vremena zadržavanja pri čemu se smanjuje broj konkurentnih višestrukih prijelaza (Slika 19.) (Lee i sur., 2013). Time se poboljšava osjetljivost i omogućuje istovremena analiza većeg broja analita. U novije vrijeme postoje specijalizirani računalni programi kojima je omogućen odabir vremena zadržavanja u metodi za svaki od analita u svrhu poboljšanja metode (Vaclavik i sur., 2014).



Slika 19. MRM kromatogram dobiven analizom standardne smjese PDE-5 inhibitora i njihovih analoga sustavom LC-ESI-MS/MS (Lee i sur., 2013).

Druga mogućnost je prikupljanja podataka probirom MRM i naknadne potvrde fragmentacijom i skeniranjem iona produkta. Postupak je korišten kod ciljanog probira anaboličkih steroida u dodacima prehrani pomoću spektrometra masa s analizatorom masa QqQ. Pozitivni rezultati su dalje potvrđeni usporedbom fragmentacijskog „otiska“ analita i standarda pri čemu se za analizu jednog uzorka koristi MRM za probiranje, dok se potom generira spektar iona produkta jednog od anaboličkih steroida. Uvođenjem hibridnog sustava omogućena je kombinacija različitih metoda skeniranja kako bi se istovremeno dobili podaci MRM i skeniranog spektra

iona produkta u istoj analizi LC-MS kao što je bio slučaj kod kvantifikacije nekoliko sintetskih droga u biljnim dodacima prehrani. Sken iona produkta ovisan o podacima se automatski pokreće u slučajevima u kojima je prijeđena prethodno definirana granica intenziteta tijekom višestrukog prijelaza za svaki analit (Van Poucke i sur., 2007). Ovakvim pristupom određena je koncentracija nedeklariranih sintetskih droga na temelju praćenja višestrukih prijelaza te je analit identificiran pomoću pretraživanja unaprijed kreiranih knjižnica spektara iona produkta, a isti postupak primijenio se kod probira PDE-5 inhibitora u pripravcima za erektilnu disfunkciju. Ukoliko se radi o različitim skupinama spojeva, ponekad je teško dobiti odgovarajuće podatke za identifikaciju zbog neodgovarajuće kolizijske energije. Stoga se fragmentacija provodi na niskim, srednjim ili visokim vrijednostima kolizijske energije te se u konačnici koristi prosječni spektar masa, a ne onaj dobiven pri jednoj vrijednosti kolizijske energije (Vaclavik i sur., 2014).

4. ZAKLJUČAK

Porastom upotrebe biljnih pripravaka i dodataka prehrani sve više raste i količina njihovih ilegalnih sastojaka. Kako bi se što više zaštitili potrošači takvih preparata, diljem svijeta su osnovane regulatorne agencije za kontrolu kvalitete ovih preparata te se razvijaju analitičke tehnike koje omogućuju provjeru njihovog sastava u slučaju da sadrže nepoznate, neodobrene ili zabranjene komponente koje mogu naštetiti konzumentu.

Najnaprednije osjetljive visokoprotočne metode koje se često koriste u analizi su UHPLC-MS, ponajprije zbog brzine i pouzdanosti kod detekcije i kvantifikacije poznatih krivotvorina i analoga, ali i identifikacije još nepoznatih ilegalno dodanih tvari.

Dok se za identifikaciju novih krivotvorina i njihovih analoga koriste neciljane analize, ciljani pristup koristeći SIM ili MRM omogućuje veću osjetljivost i selektivnost, kao i pouzdanu simultanu analizu stotine određenih ilegalnih tvari u biljnim pripravcima i dodacima prehrani.

Vrlo često je za određivanje strukture nepoznate sintetske krivotvorine potrebno koristiti nekoliko analitičkih tehnika kao što su UV, MS i NMR, a novootkriveni spojevi prijavljuju se nadležnim tijelima i dodaju na listu poznatih ilegalnih spojeva u biljnim pripravcima i dodacima prehrani.

5. LITERATURA

Agnetti, G., Dunn, M. J., u Agnetti, G., Lindsey, M. L. & Foster, D. B. (ur.) (2016) Manual of Cardiovascular Proteomics, Springer International Publishing Switzerland, Basel, **2016**: 1-14.

Aqai, P., Cevik, E., Gerssen, A., Haasnoot, W., & Nielen, M. W. (2013) High-throughput bioaffinity mass spectrometry for screening and identification of designer anabolic steroids in dietary supplements. *Analytical chemistry*, **85(6)**: 3255–3262.
<https://doi.org/10.1021/ac3036052>

Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry*, **2012**: 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

Begić, M. (2018). Metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za identifikaciju i određivanje sadržaja sildenafilu u dodacima prehrani za erektilnu disfunkciju (Diplomski rad). Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:049003>

Brenton, A.G., Godfrey, A.R. Accurate mass measurement: Terminology and treatment of data. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**: 1821–1835 (2010)
<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.06.006de>

Carvalho, L. M., Martini, M., Moreira, A. P., de Lima, A. P., Correia, D., Falcão, T., Garcia, S. C., de Baires, A. V., do Nascimento, P. C., & Bohrer, D. (2011) Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. *Forensic science international*, **204(1-3)**: 6–12.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.04.045>

Cindrić, M., Marković, A. i Horvatić, A. (2009) Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Fluminensis*, **45 (3)**: 218-232. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/43663>

Duaví, W., Oliveira, A.H.B., Vieira, G.A.B., Guedes, J.A.C., Melo, D., Cavalcante. R.M., Nascimento, R.F. Chapter 3, (2017) Insights about Advances in Chromatographic Analysis in Complex Environmental Analytical Matrices. 2-54.

https://www.researchgate.net/profile/Ronaldo-Do-Nascimento-2/publication/321277853_advances-in-chromatographic-analysis/links/5a18560daca272df080a7fcb/advances-in-chromatographic-analysis.pdf

Pristupljeno 15.07.2021.

Dunnivant F.M, (2017) Gas Chromatography, Liquid Chromatography, and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry: A Basic Introduction, Chapter 1, https://www.whitman.edu/chemistry/edusolns_software/GC_LC_CE_MS_2017/CH%201%202017.pdf Pristupljeno 15.07.2021.

Geyer, H., Parr, M. K., Koehler, K., Mareck, U., Schänzer, W., & Thevis, M. (2008) Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of mass spectrometry : JMS*, **43(7)**: 892–902. <https://doi.org/10.1002/jms.1452>

HACH Be Right, (2017) What are the definitions and differences of common Detection and Quantification Limits? https://itsupport.hach.com/app/answers/answer_view/a_id/1016057/~/what-are-the-definitions-and-differences-of-common-detection-and-quantification Pristupljeno 15. srpnja 2021.

Haneef, J., Shaharyar, M., Husain, A., Rashid, M., Mishra, R., Siddique, N. A., & Pal, M. (2013) Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants. *Drug testing and analysis*, **5(8)**: 607–613. <https://doi.org/10.1002/dta.1482>

Hur, J., Lee, W., Kim, B., Kim, H., Lee, D., Lee, J., Lee, Y., Oh, H., & Hong, J. (2019) Comprehensive screening of multiclass illegal adulterants in herbal supplements and Spice-type drugs using specific MS/MS fragmentations by UHPLC-Q/TOF-MS. *Anal. Methods*, **11**: 5260-5273.

Johansson, P.K. (2013) Characterization of Protein Surface Interactions : Collagen and Osteocalcin.

Pezzatti, J., Boccard, J., Codesido, S., Gagnebin, Y., Joshi, A., Picard, D., González-Ruiz, V., & Rudaz, S. (2020) Implementation of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. *Analytica chimica acta*, **1105**: 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.062>

A. Kaufmann, & S. Walker (2013) Post-run target screening strategy for ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap based veterinary drug residue analysis in animal urine. *Journal of Chromatography A*, **1292**: 104-110.

Kesting, J. R., Huang, J., & Sørensen, D. (2010) Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC-HRMS and LC-MS-SPE/NMR and comparative in vivo study with standards in a hypertensive rat model. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **51(3)**: 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.043>

Kim, J. W., Kweon, S. J., Park, S. K., Kim, J. Y., Lee, J. H., Han, K. M., Cho, S., Kim, J., Han, S. Y., Kim, H. J., & Kim, W. S. (2013) Isolation and identification of a sibutramine analogue adulterated in slimming dietary supplements. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, **30(7)**: 1221–1229. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.793826>

Labster Theory, (2021) Liquid Chromatography, <https://theory.labster.com/liquid-chromatography/> Pristupljeno 15.07.2021.

Lai T., Hu X., Liu X. (2007) Investigation of banned additives in healthy foods for weight control. *Chin J Food Hyg* 19:366–337. doi: 10.1080/02652030801946553

Lanzarotta, A., Crowe, J. B., Witkowski, M., & Gamble, B. M. (2012) A multidisciplinary approach for the analysis of an adulterated dietary supplement where the active pharmaceutical ingredient was embedded in the capsule shell. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **67-68**: 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.04.023>

Liang, Q., Qu, J., Luo, G., & Wang, Y. (2006) Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **40(2)**: 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.035>.

Mans, D. J., Gucinski, A. C., Dunn, J. D., Gryniwicz-Ruzicka, C. M., Mecker-Pogue, L. C., Kao, J. L., & Ge, X. (2013) Rapid screening and structural elucidation of a novel sibutramine analogue in a weight loss supplement: 11-desisobutyl-11-benzylsibutramine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **83**: 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.031>

National High Magnetic Field Laboratory, (2021) Liquid Chromatography, Principle, <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/liquid-chromatography> Pristupljeno 15.07.2021.

Shin, D., Kang, H.S., Kim, H., & Moon, G. (2020) Multi-Class Determination of 64 Illicit Compounds in Dietary Supplements Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, **25(19)**: 4399. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25194399>

SlidePlayer, korisnik Halle Peters, (2014) Introduction to Chromatography, <https://slideplayer.com/slide/1667936> Pristupljeno 15.07.2021.

Stauffer E., Dolan J.A., Newman R. (2008) Chapter 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry, Fire Debris Analysis; Stauffer, E., Dolan, J.A., Newman, R., ur., Academic Press, str. 235-293

UCDAVIS FienLab, (2016) <https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/seven-golden-rules/mass-resolution> Pristupljeno 15.07.2021.

University of Bristol, School of Chemistry, Mass Spectrometry Facility <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml> Pristupljeno 15. srpnja 2021.

Ured za publikacije Europske unije, Odluka Komisije od 12. kolovoza 2002. o primjeni Direktive Vijeća 96/23/EZ o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (priopćena pod brojem dokumenta C(2002) 3044), <https://op.europa.eu/s/pK1f> Pristupljeno 15.07.2021.

Vaclavik, L., Krynitsky, A. J., & Rader, J. I. (2014) Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **406(27)**: 6767–6790. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8159-z>

Vaclavik, L., Krynitsky, A. J., & Rader, J. I. (2014) Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, **810**: 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.006>

Van Poucke, C., Detavernier, C., Van Cauwenberghe, R., & Van Peteghem, C. (2007) Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, **586(1-2)**: 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.050>

Venhuis, B. J., & de Kaste, D. (2012) Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: a history, analytical aspects and health risks. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **69**: 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.02.014>

Wang, J., Yang, D., Wang, Z., Chen, B., & Yao, S. (2009) Simultaneous of illegal additives in dietary supplements and traditional medicines by high performance liquid chromatography–

electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **113(1)**: 227-232.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.070>

Wu, X., Zhu, B., Lu, L., Huang, W., & Pang, D. (2012) Optimization of a solid phase extraction and hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of metformin in dietary supplements and herbal medicines. *Food chemistry*, **133(2)**: 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.005>

Yost, R., & Enke, C. (1979) Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Analytical Chemistry*, **51(12)**: 1251-1264.