



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Gal Bjelovučić

# **Uporaba UHPLC-HRMS za določanje organskih spojin v vzorcih psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil**

Magistrsko delo

Maribor, 2023



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

# **Uporaba UHPLC-HRMS za določanje organskih spojin v vzorcih psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil**

Magistrsko delo študijskega programa II. stopnje

Študent:	Gal Bjelovučić
Študijski program:	magistrski študijski program II. stopnje Kemija
Predvideni strokovni naslov:	magister kemije
Mentor:	izr. prof. dr. Matjaž Finšgar, univ. dipl. kem.
Zunanji delovni somentor:	dr. Roman Kranvogel, univ. dipl. inž. kem. tehnol.

Maribor, 2023



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Kraj in datum: MARIBOR, 05.04.2023

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Uradni list RS, št. 41/2021 – UPB 13 in 20/2023) izdajam

#### SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

GAL BJELOVUČIĆ, študent/-ka študijskega programa 2. stopnje MAG KEMIJA, smer ANALIZNA KEMIJA, izpolnjuje predpisane pogoje in se mu/ji dovoljuje izdelati zaključno delo.

Tema zaključnega dela je pretežno s področja katedre/oddelka/inštituta: KATEDRA ZA KEMIJO.

Mentorji:

izr. prof. dr. MATJAŽ FINŠGAR, univ. dipl. kem., mentor/-ica  
dr. ROMAN KRANVOGL, univ. dipl. inž. kem. tehnol., somentor/-ica

Naslov zaključnega dela:

Uporaba UHPLC-HRMS za določanje organskih spojin v vzorcih psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:

Application of UHPLC-HRMS for determination of organic compounds in samples of psychoactive substances and food supplements

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 05.04.2024. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z navodili: *Predloge z navodili za pisanje zaključnega dela*, in ga oddati v pristojnem referatu članice. Hkrati se odda tudi izjava mentorja/-ice (in morebitne/-ga somentorja/-ice) o ustreznosti zaključnega dela.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat članice v roku 10 delovnih dni od dneva prejema sklepa.

red. prof. dr. Zdravko Kravanja, dekan



Obvestiti:

- kandidata/-ko,
- mentorja/-ico,
- somentorja/-ico,
- arhiv.



## Kazalo

Kazalo.....	I
Izjava.....	III
Zahvala.....	IV
Povzetek.....	V
Abstract.....	VI
Seznam tabel.....	VII
Seznam slik.....	VIII
Uporabljeni simboli in kratice .....	XI
1 Uvod .....	1
1.1 Opredelitev problema.....	1
1.2 Pregled literature .....	1
1.3 Namen in cilji.....	3
2 Teoretični del.....	4
2.1 Analiza psihoaktivnih snovi v Sloveniji .....	4
2.2 Nove psihoaktivne snovi.....	4
2.3 Pol-sintetični kanabinoidi (heksahidrokanabinol in derivati) .....	5
2.4 Prehranska dopolnila.....	8
2.4.1 Prehranska dopolnila za spolno moč .....	8
2.4.2 Prehranska dopolnila v športu.....	9
2.4.3 Prehranska dopolnila za hujšanje.....	9
2.5 Tehnika ATR-FTIR.....	9
2.6 Tehnika HPLC-DAD .....	10
2.7 Tehnika UHPLC-HRMS .....	10
2.7.1 Masni analizator <i>Orbitrap</i> .....	10
2.8 Tehnika GC-MS.....	11
3 Eksperimentalni del.....	12
3.1 Uporaba ATR-FTIR.....	12
3.1.1 Laboratorijska oprema in aparature .....	12
3.1.2 Kemikalije.....	12
3.1.3 Priprava vzorcev .....	12
3.1.4 Analiza vzorcev .....	12
3.1.5 Identifikacija spojin .....	12
3.2 Uporaba HPLC-DAD.....	13
3.2.1 Laboratorijska oprema in aparature .....	13
3.2.2 Kemikalije.....	13
3.2.3 Priprava vzorcev .....	13
3.2.4 Analiza vzorcev .....	14
3.2.5 Identifikacija spojin .....	15
3.3 Uporaba UHPLC-HRMS .....	15
3.3.1 Laboratorijska oprema in aparature .....	15
3.3.2 Kemikalije.....	15
3.3.3 Priprava vzorcev .....	15
3.3.4 Analiza vzorcev .....	16
3.3.5 Identifikacija spojin .....	17
3.4 Uporaba GC-MS .....	19
3.4.1 Laboratorijska oprema in aparature .....	19

3.4.2	Kemikalije.....	19
3.4.3	Priprava vzorcev.....	19
3.4.4	Analiza vzorcev.....	19
3.4.5	Identifikacija spojin.....	20
4	Rezultati in diskusija.....	21
4.1	Analiza psihoaktivnih snovi .....	21
4.1.1	Vzorec HHC_GB_1 .....	21
4.1.2	Vzorec HHC_GB_2 .....	30
4.2	Analiza prehranskih dopolnil .....	40
4.2.1	Vzorec PD29 .....	41
4.2.2	Vzorec PD30 .....	46
4.2.3	Vzorec PD_LA_3 .....	55
5	Zaključek .....	60
6	Literatura.....	61
7	Priloga.....	65
	Izjava o avtorstvu zaključnega dela .....	72

## Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal sam, prispevki drugih so posebej označeni. Pregledal sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

**Vir:** ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>)

<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
food supplements	576083
psychoactive substances	28211
UHPLC-HRMS	4596

**Vir:** Digitalna knjižnica Univerze v Mariboru (<https://dk.um.si/info/index.php/slo/>)

<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
prehranska dopolnila	27
psihoaktivne snovi	23

**Skupno število pregledanih člankov:** 43

**Skupno število pregledanih knjig:** 10

Maribor, december 2023

Gal Bjelovučić

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Matjažu Finšgarju in zunanjemu mentorju dr. Romanu Kranvoglu za njune nasvete in strokovno pomoč pri opravljanju magistrskega dela. Za podporo se zahvaljujem tudi družini in prijateljem.



## Uporaba UHPLC-HRMS za določanje organskih spojin v vzorcih psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil

### Povzetek

Magistrsko delo predstavlja uporabo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti, sklopljene z masno spektrometrijo visoke ločljivosti (angl. *ultra high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry*, UHPLC-HRMS) za analizo psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil. Razvili smo metodo za identifikacijo večjega števila organskih snovi.

Za določanje organskih snovi v vzorcih je bila uporabljena kombinacija na novo razvite metode UHPLC-HRMS z metodami infrardeče spektroskopije s Fourierovo transformacijo na oslabljen totalni odboj (angl. *attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy*, ATR-FTIR), tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod (angl. *high performance liquid chromatography with diode array detector*, HPLC-DAD) in plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo (angl. *gas chromatography – mass spectrometry*, GC-MS), ki jih uporabljajo v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH). Analizirani so bili trije vzorci psihoaktivnih snovi na osnovi heksahidrokanabinola (angl. *hexahydrocannabinol*, HHC) in 58 vzorcev prehranskih dopolnil. V vzorcih psihoaktivnih snovi smo identificirali štiri različne nove psihoaktivne snovi (NPS), in sicer HHC, heksahidrokanabinol acetat (angl. *hexahydrocannabinol acetate*, HHC-O), heksahidrokanabiforol (angl. *hexahydrocannabiphorol*, HHC-P) in hidroksiheksahidrokanabinol (angl. *hydroxyhexahydrocannabinol*, OH-HHC), ter 37 različnih organskih spojin v vzorcih prehranskih dopolnil. Na Evropski center za spremljanje drog in zasvojenosti z drogami (angl. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) smo poročali prvo identifikacijo HHC-O v Sloveniji. Pri analizi vzorcev prehranskih dopolnil so bile ugotovljene nepravilnosti pri 15 % analiziranih vzorcev. Problematični so bili predvsem izdelki, kupljeni na spletu, ki so vsebovali zaviralce fosfodiesteraze tipa 5 (angl. *phosphodiesterase type 5*, PDE5) in njihove derivate ter anorektike, kot je sibutramin.

Razvita metoda predstavlja dobro orodje za analize tako psihoaktivnih snovi, katerih proizvodnja se zelo hitro razvija, kot tudi prehranskih dopolnil, ki so na spletu prosto dostopne vsakomur, vendar lahko vsebujejo zdravju škodljive ali celo življenjsko nevarne snovi. Metoda omogoča identifikacijo velikega števila organskih spojin, z uporabo raztopin standardov pa bi z njo lahko v prihodnosti določali tudi vsebnost teh potencialno nevarnih spojin v vzorcih in tako preprečili morebitne zdravstvene zaplete pri njihovi uporabi.

**Ključne besede:** UHPLC-HRMS, psihoaktivne snovi, NPS, prehranska dopolnila, identifikacija

**UDK:** 543.544.5:543.632(043.2)

## **Application of UHPLC-HRMS for determination of organic compounds in samples of psychoactive substances and food supplements**

### **Abstract**

The master's thesis presents the use of ultra high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) for the analysis of psychoactive substances and food supplements. A method for identification of a wide range of organic substances was developed.

A combination of the newly developed UHPLC-HRMS method and National laboratory of health, environment and food's (NLZOH) attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), and gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) methods was used to determine organic substances in the samples. A total of 3 hexahydrocannabinol (HHC) based psychoactive substance samples and 58 food supplement samples were analysed. We identified 4 different new psychoactive substances (NPS) in the samples of psychoactive substances (HHC, hexahydrocannabinol acetate (HHC-O), hexahydrocannabiphorol (HHC-P), and hydroxyhexahydrocannabinol (OH-HHC)) and 37 different organic compounds in the food supplement samples. The first identification of HHC-O in Slovenia was reported to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). The analysis of the food supplement samples revealed irregularities in 15 % of the samples. Products purchased online were particularly problematic as they contained phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors and their derivatives, as well as anorectics such as sibutramine.

The developed method is a good tool for screening analysis of rapidly evolving psychoactive substances and food supplements, which are freely available online to anyone but may contain harmful or even life-threatening substances. The method allows the identification of a wide range of organic compounds and, by using solutions of standards, could also be used to determine the concentrations of these potentially hazardous compounds in samples, thus preventing potential health complications from their use.

**Key words:** UHPLC-HRMS, psychoactive substances, NPS, food supplements, screening

**UDK:** 543.544.5:543.632(043.2)

## Seznam tabel

Tabela 3-1: Parametri metode za identifikacijo kanabinoidov.....	14
Tabela 3-2: Parametri metode PD-1. ....	15
Tabela 3-3: UHPLC-parametri metode za identifikacijo organskih spojin. ....	16
Tabela 3-4: HRMS-parametri metode Identifikacija. ....	16
Tabela 3-5: Organske spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v prehranskih dopolnilih za hujšanje.....	18
Tabela 3-6: Organske spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v prehranskih dopolnilih za izboljšanje spolne moči.....	18
Tabela 3-7: Organske spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v športnih prehranskih dopolnilih.....	18
Tabela 3-8: Parametri metode GC-MS za psihoaktivne snovi. ....	19
Tabela 4-1: Pol-sintetični kanabinoidi, identificirani v psihoaktivnih snoveh na osnovi HHC. ....	21
Tabela 4-2: Vitamini, identificirani v različnih tipih prehranskih dopolnil.....	40
Tabela 4-3: Organske spojine, identificirane v različnih tipih prehranskih dopolnil. ....	40

## Seznam slik

Slika 2-1: Sinteza HHC iz CBD v dveh korakih.....	6
Slika 2-2: Strukturna formula HHC-O.....	7
Slika 2-3: Strukturna formula HHC-P.....	7
Slika 2-4: Strukturna formula H4-CBD.....	7
Slika 2-5: Strukturna formula HHCH.....	7
Slika 3-1: Uporabljen filter za identifikacijo spojin v programskem paketu Compound Discoverer.....	17
Slika 4-1: Vzorec HHC_GB_1.....	22
Slika 4-2: Spekter ATR-FTIR vzorca HHC_GB_1.....	22
Slika 4-3: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca HHC_GB_1 (črno) s spektrom HHC iz knjižnice spektrov (rdeče) in tabela desetih najvišjih ujemanj.....	23
Slika 4-4: Kromatogrami vzorca HHC_GB_1 pri $\lambda = 225$ nm (modro), $\lambda = 232$ nm (rdeče), $\lambda = 258$ nm (zeleno), $\lambda = 300$ nm (rožnato) in $\lambda = 350$ nm (oker).....	24
Slika 4-5: Približan kromatogram vzorca HHC_GB_1 za časovni interval od 24,1 min do 25,5 min pri $\lambda = 232$ nm.....	25
Slika 4-6: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri $RT = 24,7$ min (modro) in UV-spektra HHC iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.....	25
Slika 4-7: Kromatogram vzorca HHC_GB_1, na katerem so vidni kromatografski vrhovi epimerov HHC (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri $RT = 18,6$ min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	26
Slika 4-8: Kromatogram vzorca HHC_GB_1, na katerem so vidni kromatografski vrhovi epimerov HHC (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri $RT = 18,7$ min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	27
Slika 4-9: Kromatogram vzorca HHC_GB_1, na katerem so vidni kromatografski vrhovi epimerov OH-HHC (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri $RT = 16,5$ min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	28
Slika 4-10: Kromatogram vzorca HHC_GB_1, na katerem sta vidna kromatografska vrhova epimerov HHC-P (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri $RT = 20,2$ min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	29
Slika 4-11: Vzorec HHC_GB_2.....	30
Slika 4-12: Spekter ATR-FTIR vzorca HHC_GB_2.....	31
Slika 4-13: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca HHC_GB_2 (črno) s spektrom HHC iz knjižnice spektrov (rdeče) in tabela desetih najvišjih ujemanj.....	31
Slika 4-14: Kromatogrami vzorca HHC_GB_2 pri $\lambda = 225$ nm (modro), $\lambda = 232$ nm (rdeče), $\lambda = 258$ nm (zeleno), $\lambda = 300$ nm (rožnato) in $\lambda = 350$ nm (oker).....	32
Slika 4-15: Približan kromatogram vzorca HHC_GB_2 za časovni interval od 25,5 min do 26,3 min pri $\lambda = 232$ nm.....	33
Slika 4-16: Kromatogram vzorca HHC_GB_2, na katerem sta vidna kromatografska vrhova epimerov HHC-O (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri $RT = 20,2$ min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	34

Slika 4-17: Kromatogram vzorca HHC_GB_2, na katerem sta vidna kromatografska vrhova epimerov HHC-O (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri $RT = 20,3$ min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	35
Slika 4-18: Kromatogram vzorca HHC_GB_2.....	36
Slika 4-19: Približan kromatogram vzorca HHC_GB_2 za časovni interval od 22,5 min do 24,5 min. ....	37
Slika 4-20: Masni spekter izomera 1 HHC-O ( $RT = 23,2$ min) z označenimi karakterističnimi vrhovi.....	38
Slika 4-21: Masni spekter izomera 2 HHC-O ( $RT = 23,6$ min) z označenimi karakterističnimi vrhovi.....	39
Slika 4-22: Vzorec PD29 [55]. ....	41
Slika 4-23: Spekter ATR-FTIR vzorca PD29.....	42
Slika 4-24: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca PD29 (rožnato) s spektrom tadalafila (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj.....	42
Slika 4-25: Kromatogrami vzorca PD29 pri $\lambda = 225$ nm (modro), $\lambda = 235$ nm (rdeče), $\lambda = 258$ nm (zeleno), $\lambda = 300$ nm (rožnato) in $\lambda = 350$ nm (oker). ....	43
Slika 4-26: Približan kromatogram vzorca PD29 za časovni interval od 8,3 min do 9,6 min pri $\lambda = 235$ nm. ....	43
Slika 4-27: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri $RT = 8,8$ min (modro) in UV-spektra tadalafila iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.....	44
Slika 4-28: Kromatogram vzorca PD29, na katerem je viden kromatografski vrh 2-hidroksipropil nortadalafila (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj). ....	45
Slika 4-29: Vzorec PD30 [56]. ....	46
Slika 4-30: Spekter ATR-FTIR vzorca PD30.....	46
Slika 4-31: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca PD30 (modro) s spektrom glukoze (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj.....	47
Slika 4-32: Kromatogrami vzorca PD30 pri $\lambda = 225$ nm (modro), $\lambda = 235$ nm (rdeče), $\lambda = 258$ nm (zeleno), $\lambda = 300$ nm (rožnato) in $\lambda = 350$ nm (oker). ....	48
Slika 4-33: Približan kromatogram vzorca PD29 za časovni interval od 7,7 min do 8,2 min pri $\lambda = 235$ nm. ....	48
Slika 4-34: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri $RT = 7,9$ min (modro) in UV-spektra sildenafilila iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.....	49
Slika 4-35: Približan kromatogram vzorca PD29 za časovni interval od 8,5 min do 9,0 min pri $\lambda = 235$ nm. ....	49
Slika 4-36: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri $RT = 8,7$ min (modro) in UV-spektra sibutramina iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.....	50
Slika 4-37: Seznam spojin, identificiranih z metodo UHPLC-HRMS v vzorcu PD30 (1/3). 51	
Slika 4-38: Seznam spojin, identificiranih z metodo UHPLC-HRMS v vzorcu PD30 (2/3). 51	
Slika 4-39: Seznam spojin, identificiranih z metodo UHPLC-HRMS v vzorcu PD30 (3/3). 52	

Slika 4-40: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh sibutramina (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	53
Slika 4-41: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh sildenafil (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	54
Slika 4-42: Vzorec PD_LA_3 [57]. .....	55
Slika 4-43: Spekter ATR-FTIR vzorca PD_LA_3.....	56
Slika 4-44: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca PD_LA_3 (rdeče) s spektrom ureaze (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj. ....	56
Slika 4-45: Kromatogrami vzorca PD_LA_3 pri $\lambda = 225$ nm (modro), $\lambda = 235$ nm (rdeče), $\lambda = 258$ nm (zeleno), $\lambda = 300$ nm (rožnato) in $\lambda = 350$ nm (oker).....	57
Slika 4-46: Kromatogram vzorca PD_LA_3, na katerem je viden kromatografski vrh paraksantina (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj). ....	58
Slika 4-47: Kromatogram vzorca PD_LA_3, na katerem je viden kromatografski vrh kofeina (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	59
Slika 7-1: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh glukoze (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	65
Slika 7-2: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh mlečne kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	66
Slika 7-3: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh citronske kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	67
Slika 7-4: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh acesulfama (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	68
Slika 7-5: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh ciklamne kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	69
Slika 7-6: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh aspartama (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	70
Slika 7-7: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh vinske kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).....	71

## Uporabljeni simboli in kratice

### Simboli

<i>RT</i>	retenzijski čas
<i>V/V</i>	volumski odstotek

### Grški simboli

$\lambda$	valovna dolžina
-----------	-----------------

### Kratice

ACN	acetonitril
amu	atomska masna enota (angl. <i>atomic mass unit</i> )
ATR-FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierovo transformacijo na oslabljen totalni odboj (angl. <i>attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy</i> )
CBD	kanabidiol (angl. <i>cannabidiol</i> )
CBDA	kanabidiolna kislina ( <i>cannabidiolic acid</i> )
CBN	kanabinol (angl. <i>cannabinol</i> )
DIA	način »neodvisne analize« (angl. <i>data-independent acquisition</i> )
DTGS	devteriran triglicin sulfat
EDND	Evropska podatkovna zbirka o novih drogah (angl. <i>European Database on New Drugs</i> )
EMCDDA	Evropski center za spremljanje drog in zasvojenosti z drogami (angl. <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i> )
ESI	elektrosprej ionizacija (angl. <i>electrospray ionization</i> )
EWS	sistem zgodnjega opozarjanja (angl. <i>Early Warning System</i> )
eTF	izboljšana Fourierova transformacija (angl. <i>enhanced Fourier transformation</i> )
FTICR	ionska ciklotronska resonanca s Fourierovo transformacijo (angl. <i>Fourier-transform ion cyclotron transformation</i> )
GC-MS	plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (angl. <i>gas chromatography – mass spectrometry</i> )
H4-CBD	tetrahidrokanabidiol (angl. <i>tetrahydrocannabidiol</i> )
HESI	ogrevana elektrosprej ionizacija (angl. <i>heated electrospray ionization</i> )
HHC	heksahidrokanabinol (angl. <i>hexahydrocannabinol</i> )
HHC-O	heksahidrokanabinol acetat (angl. <i>hexahydrocannabinol acetate</i> )
HHC-P	heksahidrokanabiforol (angl. <i>hexahydrocannabiphorol</i> )
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>high performance liquid chromatography</i> )

HPLC-DAD	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod (angl. <i>high performance liquid chromatography with diode array detector</i> )
HRMS/MS	tandemska masna spektrometrija visoke ločljivosti (angl. <i>high resolution tandem mass spectrometry</i> )
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (angl. <i>liquid chromatography – tandem mass spectrometry</i> )
LC-QTOF-MS	tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo, z zaporedno vezanim kvadrupolnim masnim analizatorjem in masnim analizatorjem na čas preleta (angl. <i>liquid chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> )
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje Republike Slovenije
NLZOH	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
NMR	nuklearna magnetna resonanca
NPS	nove psihoaktivne snovi
OH-HHC	hidroksiheksahidrokanabinol (angl. <i>hydroxyhexahydrocannabinol</i> )
PDE5	fosfodiesteraza tipa 5 (angl. <i>phosphodiesterase type 5</i> )
RUS	raztopina za preverjanje ustreznosti sistema
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl. <i>solid phase extraction</i> )
$\Delta^8$ -THC	delta-8-tetrahidrokanabinol (angl. <i>delta-8-tetrahydrocannabinol</i> )
$\Delta^9$ -THC	delta-9-tetrahidrokanabinol (angl. <i>delta-9-tetrahydrocannabinol</i> )
$\Delta^9$ -THCA	delta-9-tetrahidrokanabinolna kislina (angl. <i>delta-9-tetrahydrocannabinolic acid</i> )
THCP	tetrahidrokanabiforol (angl. <i>tetrahydrocannabiphorol</i> )
UHPLC-HRMS	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti, sklopljena z masno spektrometrijo visoke ločljivosti (angl. <i>ultra high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry</i> )
UNODC	Urad Organizacije združenih narodov za droge in kriminal (angl. <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> )
Vis	vidno (območje) (angl. <i>visible</i> )
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. <i>World Health Organization</i> )



## 1 Uvod

### 1.1 Opredelitev problema

Psihoaktivne snovi pogosto vsebujejo primesi, ki lahko privedejo do tveganja zastrupitve ali predoziranja, zato je njihova analiza ključna za možnost opozarjanja na neželene učinke in posledično za varnost uporabnikov [1]. V zadnjih desetletjih so se na črnem trgu začele pojavljati nove psihoaktivne snovi (NPS), kot so amfetamini, fenetilamini, triptamini, katinoni, arilcikloheksilamini in sintetični kanabinoidi. Nepoznavanje njihovih učinkov, toksičnosti in potentnosti ter kompleksnost njihove detekcije in identifikacije predstavlja velik izziv za zdravstvene organe in povečujeta tveganje za uporabnike. Informacije o kemijski sestavi substanc omogočajo odkrivanje potencialno toksičnih komponent in predvidevanje posledic njihove uporabe [2].

Podobno kot za psihoaktivne snovi obstaja črni trg tudi za prehranska dopolnila. Še bolj problematične pa so povsem legalne spletne trgovine, ki so uporabnikom dostopne, vendar nad njihovimi izdelki ni organiziranega nadzora. Prehranska dopolnila se pogosto prodajajo kot izdelki rastlinskega izvora, vendar se jim mnogokrat dodajajo sintetične sestavine z namenom izboljšanja učinkovitosti [3]. Takšna dopolnila vsebujejo npr. farmacevtske učinkovine, katerih uporaba je sicer dovoljena, pogosto pa se namesto njih uporabljajo strukturno modificirani derivati, ki v rutinskih pregledih niso zaznani. Odobrene farmacevtske učinkovine v prehranskih dopolnilih imajo znane stranske učinke, v primeru njihovih derivatov pa ti niso poznani, kar predstavlja dodatno nevarnost za uporabnike [4].

Za določanje kemijske sestave psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil se pogosto uporablja kombinacija analiznih tehnik, kot so infrardeča spektroskopija s Fourierovo transformacijo na oslavljen totalni odboj (angl. *attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy*, ATR-FTIR), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod (angl. *high performance liquid chromatography with diode array detector*, HPLC-DAD), tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti, sklopljena z masno spektrometrijo visoke ločljivosti (angl. *ultra high performance liquid chromatography – high resolution mass spectrometry*, UHPLC-HRMS), plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (angl. *gas chromatography – mass spectrometry*, GC-MS) in nuklearna magnetna resonanca (NMR). ATR-FTIR poda informacije o polnilih, kar je v pomoč pri pripravi vzorcev za nadaljnjo analizo. Z analizo HPLC-DAD je mogoča identifikacija že znanih organskih spojin, nakaže pa tudi prisotnost novih spojin, ki jih nato s pomočjo UHPLC-HRMS identificiramo. Če gre za nove spojine, za katere knjižnice spektrov UHPLC-HRMS ne obstajajo, so pa že bile določene z GC-MS, se za potrditev izvede še analiza GC-MS. V nekaterih primerih je za nedvoumno določitev potrebna še NMR-analiza.

### 1.2 Pregled literature

Barhdadi in sodelavci [5] so razvili metodo za angl. *screening* e-cigaret s kanabidiolom (angl. *cannabidiol*, CBD), s katero so identificirali 17 kanabinoidov in kvantitativno določili glavne kanabinoide, kot so CBD, kanabidiolna kislina (angl. *cannabidiolic acid*, CBDA), delta-9-tetrahidrokanabinol (angl. *delta-9-tetrahydrocannabinol*,  $\Delta^9$ -THC) in delta-9-tetrahidrokanabinolna kislina (angl. *delta-9-tetrahydrocannabinolic acid*,  $\Delta^9$ -THCA). Uporabili so analizo tehniko UHPLC-HRMS. Kromatografska ločba je bila izvedena s sistemom Vanquish UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA) s C18 reverzno-fazno kromatografsko kolono CORTECS UPLC Shield RP18 (Waters, Milford, MA, ZDA),

dimenzij 2,1 mm × 100 mm, z delci premera 1,6 μm, pri temperaturi 35 °C. Uporabili so mobilni fazi A in B, ki sta vsebovali 0,1 % (V/V) metanojske kisline v vodi (A) in ACN (B), pri izokratski eluciji (41 %:59 %) s konstantnim pretokom 0,5 mL/min. Čas metode je bil 13 minut, volumen injiciranja pa 2 μL. Za detekcijo ciljnih spojin in morebitnih drugih komponent je bila uporabljena tandemska masna spektrometrija visoke ločljivosti (angl. *high resolution tandem mass spectrometry*, HRMS/MS) z masnim analizatorjem Q-Exactive focus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA) pri pogojih angl. *full scan MS acquisition mode* in nato še angl. *all ion fragmentation mode* (AIF).

Kim in sodelavci [6] so razvili in validirali metodo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (angl. *liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) za kvantitativno določanje kanabinoidov in jo uporabili za analizo 15 kartuš e-cigaret. V analiziranih vzorcih so določili vsebnost delta-8-tetrahidrokanabinola (angl. *delta-8-tetrahydrocannabinol*, Δ<sup>8</sup>-THC), Δ<sup>9</sup>-THC, CBD in kanabinola (angl. *cannabinol*, CBN). Uporabili so sistem 1260 infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) in AB3200 Qtrap MS/MS (SCIEX, Toronto, ON, Kanada). Za kromatografsko ločbo so uporabili kolono InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA), dimenzij 2,1 mm × 150 mm, z delci premera 2,7 μm. Mobilna faza A je vsebovala 0,1 % (V/V) metanojske kisline v vodi, mobilna faza B pa 0,1 % (V/V) metanojske kisline v ACN.

Mohd Yusop [4] je opisal uporabo tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo, z zaporedno vezanim kvadrupolnim masnim analizatorjem in masnim analizatorjem na čas preleta (angl. *liquid chromatography – quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, LC-QTOF-MS) za določanje zaviralcev fosfodiesteraze tipa 5 (angl. *phosphodiesterase type 5*, PDE5) v zeliščnih zdravilih. Za identifikacijo je bil uporabljen sistem 1290 Infinity II LC, sklopljen s 6510 QTOF-MS masnim analizatorjem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). Za kromatografsko ločbo je bila uporabljena reverzno-fazna kromatografska kolona Chromolith® High-Resolution RP-18 (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), dimenzij 4,6 mm × 100 mm, z delci premera 2,0 μm pri temperaturi 20 °C. Volumen injiciranja je bil 5 μL, temperatura avtomatskega vzorčevalnika pa 10 °C. Mobilni fazi A in B sta bili nakisani z 0,1 % (V/V) metanojske kisline. Mobilna faza A je vsebovala 10 mM raztopino amonijevega formiata v ultračisti vodi, mobilna faza B pa ACN. Za detekcijo je bil uporabljen QTOF-MS z elektrosprej ionizacijo (angl. *electrospray ionization*, ESI) pri pogojih pozitivne ionizacije. Metoda je bila optimizirana in validirana za določanje 23 ciljnih spojin v 52 vzorcih zeliščnih zdravil.

Giannetti in sodelavci [7] so razvili in validirali metodo za določanje 124 različnih prepovedanih substanc v 110 vzorcih prehranskih dopolnil. Uporabili so UHPLC-HRMS, sestavljen iz ULTIMATE 3000 sistema, sklopljenega z Orbitrap (Q Exactive™) MS sistemom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA). Kromatografsko ločbo so izvedli na kromatografski koloni Kinetex XB-C18 (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA) dimenzij 3,0 mm × 100 mm, z delci premera 2,5 μm, ki je bila povezana s predkolono Phenomenex C18 (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA), dimenzij 40 mm × 2,1 mm. Vsak vzorec so analizirali dvakrat z namenom analize v pozitivni in negativni polariteti. Za analizo v pozitivni polariteti so za mobilno fazo A uporabili 0,1 % (V/V) vodno raztopino metanojske kisline, za mobilno fazo B pa metanol. Za analizo v negativni polariteti pa je bila mobilna faza A 0,1 % (V/V) vodna raztopina oetne kisline, mobilna faza B pa ACN. Čas metode je bil 20 minut, temperatura kolone 40 °C, pretok 0,45 mL/min in volumen injiciranja 10 μL.

Kakitani in sodelavci [8] so razvili in validirali metodo LC-MS/MS za določanje 15 vodotopnih vitaminov, ki se pogosto uporabljajo kot dodatki v pijačah in prehranskih dopolnilih. Uporabljen je bil sistem Nexera UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonska), sklopljen

s trojnim kvadrupolnim masnim spektrometrom LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japonska). Kromatografsko ločbo so izvedli na koloni Scherzo SM-C18 (Imtakt Co., Kyoto, Japonska), dimenzij 150 mm × 2,0 mm, z delci premera 3 μm. Za mobilno fazo A je bila uporabljena 5 mM raztopina amonijevega formiata z 0,05 % (V/V) metanojske kisline, za mobilno fazo B pa ACN z 0,3 % (V/V) metanojske kisline. Temperatura kolone je bila 40 °C, pretok 0,2 mL/min in volumen injiciranja 1 μL. Za MS je bil uporabljen ionski izvor ESI.

### **1.3 Namen in cilji**

Namen dela je bila analiza vzorcev psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil. Za namen kvalitativne in kvantitativne analize vzorcev smo uporabili tehnike UHPLC-HRMS, HPLC-DAD, GC-MS in ATR-FTIR.

Cilj magistrske naloge je bil razviti univerzalno metodo za določanje večjega števila organskih analitov v psihoaktivnih snoveh in prehranskih dopolnilih ter s pomočjo razvite metode identificirati spojine v neznanih vzorcih.

## 2 Teoretični del

### 2.1 Analiza psihoaktivnih snovi v Sloveniji

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) je največji in osrednji javnozdravstveni laboratorij v Sloveniji, ki opravlja naloge na področju zdravja, okolja in hrane. NLZOH deluje v imenu Ministrstva za zdravje, Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Ministrstva za okolje in prostor ter Ministrstva za obrambo na področju varstva okolja, diagnostike in javnega zdravja ter kemijskih in mikrobioloških analiz različnih vrst vzorcev [9]. V okviru svojega dela ima sklenjeno pogodbo z nevladno organizacijo DrogArt, katere glavni cilj je izobraževanje mladih o tveganjih zlorabe drog in alkohola. V okviru svojih storitev od uporabnikov anonimno zbirajo vzorce psihoaktivnih snovi in jih pošiljajo v NLZOH. Trenutno v Sloveniji deluje devet aktivnih zbirnih točk za vzorce psihoaktivnih snovi [10]. Laboratorij za analizo psihoaktivnih snovi na NLZOH, ki vzorce sprejme, opravi analizo in o uradnih rezultatih obvesti odgovorno osebo organizacije DrogArt, ki se neposredno poveže z uporabnikom. Laboratorij tesno sodeluje z Nacionalnim inštitutom za javno zdravje Republike Slovenije (NIJZ) in Evropskim centrom za spremljanje drog in zasvojenosti z drogami (angl. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA), kateremu poročajo nove psihoaktivne snovi v okviru sistema zgodnjega opozarjanja (angl. *Early Warning System*, EWS), ki je del sodelovanja med EMCDDA in Europolom. Od začetka projekta preverjanja drog v Sloveniji leta 2018 je NLZOH analiziral več kot 4000 vzorcev in v Evropsko podatkovno zbirko o novih drogah (angl. *European Database on New Drugs*, EDND) naložil več kot 85 primerov.

### 2.2 Nove psihoaktivne snovi

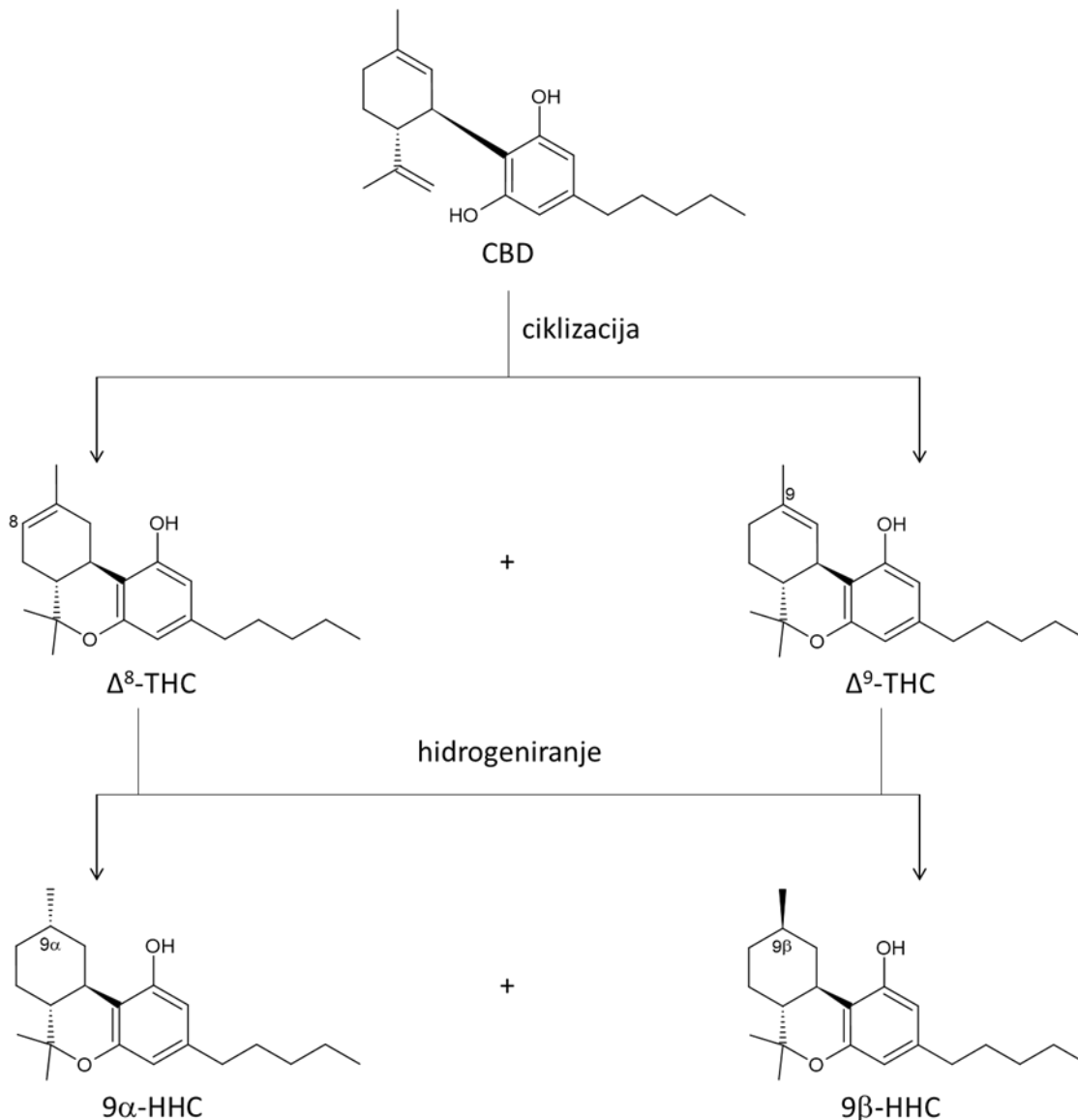
Po definiciji Urada Organizacije združenih narodov za droge in kriminal (angl. *United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) so nove psihoaktivne snovi (NPS) opredeljene kot "psihoaktivne snovi, ki niso pod nadzorom Enotne konvencije o mamilih iz leta 1961 ali Konvencije o psihotropnih substancah iz leta 1971, vendar lahko ogrožajo javno zdravje". Nekatere od NPS so bile prvič sintetizirane že pred desetletji, vendar so se na trgu drog pojavile pred kratkim, zato se nove ne nanašajo nujno na nove izume. Ker NPS niso pod nadzorom mednarodnih konvencij o nadzoru drog, se lahko njihov pravni status od države do države zelo razlikuje. Do marca 2022, ko je bilo izdano zadnje poročilo s strani UNODC, je 67 držav izvajalo pravne postopke za nadzor NPS, pri čemer so številne uporabile ali spremenile obstoječo zakonodajo, nekatere pa so uveljavile novo. Več držav, kjer se je hitro pojavilo veliko število različnih NPS, je sprejelo nadzor nad celotnimi skupinami NPS z uporabo tako imenovanega generičnega pristopa ali uvedlo zakonodajo analogov, s katero se izvaja nadzor tudi nad snovmi, ki niso izrecno navedene v zakonodaji, vendar imajo podobno kemijsko sestavo kot snov, ki je že nadzorovana. Na mednarodni ravni se je Komisija za droge do marca 2023 odločila, da bo pod mednarodni nadzor uvrstila 78 NPS [11]. V Sloveniji se je nadzor nad NPS začel leta 2009. Obstajajo trije zakoni, ki obravnavajo droge: Zakon o preprečevanju uporabe prepovedanih drog in o obravnavi uživalcev prepovedanih drog, Zakon o proizvodnji in prometu s prepovedanimi drogami iz leta 1999 ter Zakon o predhodnih sestavinah za prepovedane droge iz leta 2000 [12].

### 2.3 Pol-sintetični kanabinoidi (heksahidrokanabinol in derivati)

O sintezi in biološki aktivnosti heksahidrokanabinola (HHC) so raziskovalni laboratoriji prvič poročali že pred osmimi desetletji. Glede na *in vitro* ter *in vivo* laboratorijske študije v različnih živalskih vrstah naj bi imel podobne učinke kot  $\Delta^9$ -THC, glavna psihoaktivna snov v konoplji. Farmakološki in vedenjski učinki HHC pri ljudeh niso bili raziskani, anekdotična poročila potrošnikov pa nakazujejo, da so njegovi učinki na človeka podobni učinkom konoplje in  $\Delta^9$ -THC. HHC se javno prodaja kot legalna zamenjava za konopljo in  $\Delta^9$ -THC. Pri oglaševanju HHC pogosto neposredno primerjajo oz. namigujejo na podobnosti njegovih učinkov z učinki konoplje in  $\Delta^9$ -THC. HHC ni bil uvrščen v konvencije Združenih narodov (ZN) o mamilih iz let 1961 in 1971, se pa v EU spremlja kot NPS od 21. oktobra 2022 v skladu z Uredbo (ES) št. 1920/2006 Evropskega parlamenta in Sveta o Evropskem centru za spremljanje drog in zasvojenosti z drogami ter Okvirnim sklepom 2004/757/PNZ Sveta o opredelitvi minimalnih določb glede elementov kaznivih dejanj in kazni na področju nedovoljenega prometa s prepovedanimi drogami [13].

Pojav sintetičnih agonistov kanabinoidnih receptorjev (sintetičnih kanabinoidov) v izdelkih angl. *legal high* okoli leta 2006 je napovedoval uvedbo izdelkov z močnejšimi učinki od tradicionalnih rastlinskih pripravkov na osnovi konoplje [14]. V zadnjih letih se je trg kanabinoidov odzval na spremembe zakonodaje, zlasti v ZDA, kjer se je vzporedno z legalizacijo konoplje za rekreativno uporabo ponovno začelo gojenje industrijske konoplje. Proizvajalci zato iščejo nove izdelke na osnovi konoplje, vključno s pol-sintetičnimi kanabinoidi, ki jih po enostavnih in poceni postopkih sintetizirajo prek konopljinih ekstraktov z namenom pridobivanja legalnih nadomestkov konoplje. V nasprotju s sintetičnimi kanabinoidi se zdi, da njihova biološka aktivnost ali moč ni toliko pomembna. To pomeni, da te pol-sintetične snovi niso nujno močnejše od naravnega  $\Delta^9$ -THC. Izdelki, ki vsebujejo CBD, se že nekaj let širijo po vsem svetu, vendar v zadnjem času CBD ni več le končni produkt, temveč je postal tudi prekursor za sintezo pol-sintetičnih kanabinoidov. HHC je eden od številnih pol-sintetičnih kanabinoidov, ki so se v zadnjih letih javno prodajali kot legalne zamenjave za konopljo in  $\Delta^9$ -THC. Prvi se je leta 2019 pojavil  $\Delta^8$ -THC, vendar za razliko od  $\Delta^8$ -THC, HHC ni posebej nadzorovan v okviru mednarodnega sistema za nadzor drog, enako velja tudi za večino držav članic EU. HHC je bil v Evropi prvič odkrit maja 2022 v živilskem izdelku, oglaševanem kot tinktura, ki ga je zasegla danska policija. Tinktura se je tržila kot dodatek za izboljšanje spanca, laboratorijska analiza pa je v njej odkrila CBN, ki je bil naveden na embalaži, in HHC, ki ni bil naveden. HHC je bil kot nova psihoaktivna snov v okviru EWS prijavljen oktobra 2022. Do novembra 2023 je o identifikaciji HHC poročalo 22 držav članic EU (Avstrija, Belgija, Bolgarija, Ciper, Češka, Danska, Estonija, Finska, Francija, Grčija, Hrvaška, Irska, Italija, Litva, Madžarska, Nemčija, Poljska, Romunija, Slovaška, Slovenija, Španija, Švedska), od ostalih evropskih držav pa še Norveška in Švica. Odkar se uradno spremlja kot NPS, je EMCDDA prek EWS prejel poročila o približno 50 zasegih. Skupaj so zasegli 70,7 kg izdelkov, ki vsebujejo HHC. To vključuje konopljo z nizko vsebnostjo THC, smole, tekočine, slaščice in e-cigarete (angl. *vape*) [13].

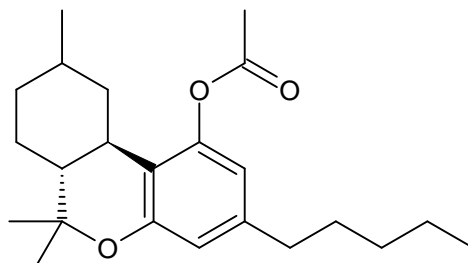
Trenutno glavni tip proizvodnje HHC temelji na sintezi iz ekstrakta CBD, pridobljenega iz konoplje, ki poteka v dveh korakih (slika 2-1). Prvi korak je ciklizacija CBD, s katero nastane zmes  $\Delta^8/\Delta^9$ -THC. Kot katalizator pri ciklizaciji se uporablja raztopina vodikovega klorida ali fosforne kisline v etanolu, cinkov klorid, sulfaminska kislina ali piridinijev hidroklorid. Razmerje med  $\Delta^8$ -THC in  $\Delta^9$ -THC, dobljenima pri ciklizaciji CBD, je odvisno od uporabljenega katalizatorja in pogojev reakcije. V drugem koraku pa s kataliziranim hidrogeniranjem nastaneta dva epimera HHC:  $9\alpha$ -HHC ((9S)-HHC) in  $9\beta$ -HHC ((9R)-HHC). Za redukcijo (hidrogeniranje) se uporabljajo katalizatorji, kot je platinov oksid, paladij na aktivnem oglju ali rodij na aluminijevem oksidu [15].



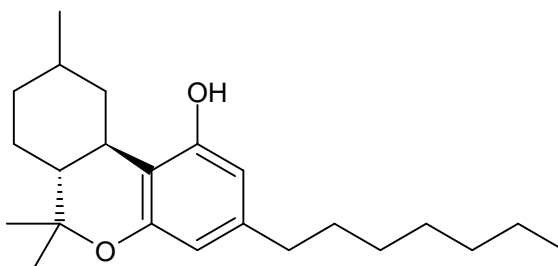
Slika 2-1: Sinteza HHC iz CBD v dveh korakih.

Od prve identifikacije HHC maja 2022 so bili na evropskem trgu identificirani še štiri pol-sintetični kanabionidi: heksahidrokanabinol acetat (angl. *hexahydrocannabinol acetate*, HHC-O) (slika 2-2), heksahidrokanabiforol (angl. *hexahydrocannabiphorol*, HHC-P) (slika 2-3), tetrahidrokanabidiol (angl. *tetrahydrocannabidiol*, H4-CBD) (slika 2-4) in heksahidrokanabiheksol (angl. *hexahydrocannabiheksol*, HHCH) (slika 2-5). Vsi štiri omenjeni pol-sintetični kanabinoidi se prodajajo v istih vrstah izdelkov kot HHC. HHC-O je acetatni derivat HHC [16], ki je bil v Evropi prvič identificiran avgusta 2022 na Madžarskem. O identifikacijah je do decembra 2023 poročalo še osem držav članic: Estonija, Hrvaška, Španija, Bolgarija, Danska, Francija, Švedska in Slovenija. HHC-P je hidrogeniran derivat tetrahidrokanabiforola (angl. *tetrahydrocannabiphorol*, THCP). THCP je strukturno precej podoben  $\Delta^9$ -THC, vendar je pri THCP 5-členska veriga zamenjana s 7-člensko [17]. Novembra 2022 je bil HHC-P prvič v Evropi identificiran v Sloveniji. Od takrat je o identifikacijah poročalo še pet držav članic: Bolgarija, Estonija, Hrvaška, Španija in Danska [13]. H4-CBD je hidrogeniran derivat CBD, a se od njega razlikuje tako kemijsko kot

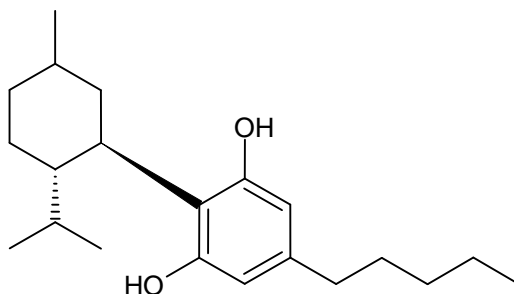
farmakološko. V Evropi je bil prvič identificiran aprila 2023 na Švedskem, nato pa do decembra 2023 še v Španiji, Italiji, Franciji, na Cipru in na Danskem [18]. HHCH, ki se je na evropskem trgu pojavil kot zadnji od pol-sintetičnih kanabinoidov, se od HHC razlikuje po številu C-atomov v stranski verigi, saj ima namesto 5-členske verige 6-člensko. Prva in zaenkrat edina identifikacija HHCH v Evropi je bila zavedena julija 2023 na Švedskem [19].



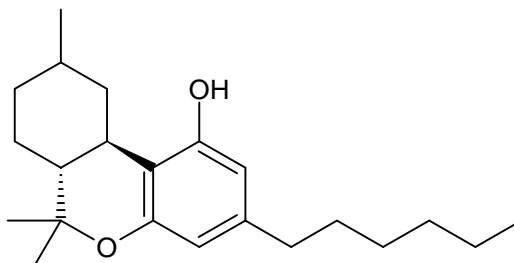
Slika 2-2: Strukturna formula HHC-O.



Slika 2-3: Strukturna formula HHC-P.



Slika 2-4: Strukturna formula H4-CBD.



Slika 2-5: Strukturna formula HHCH.

## 2.4 Prehranska dopolnila

Prehranska dopolnila so živila, namenjena dopolnjevanju prehrane. Sestavine, ki se največkrat uporabljajo, so vitamini, minerali in rastlinski izvlečki. Najpogosteje se prehranska dopolnila uporabljajo kot vir enega ali več hranil, npr. vitaminov, mineralov ali maščobnih kislin, z namenom dopolnjevati običajno prehrano [20]. Zanje velja splošna živilska zakonodaja, ki določa, da morajo biti vsa prehranska dopolnila, ki so dana na trg, varna za uživanje v smislu, da živila ne smejo vsebovati snovi v taki obliki in količini, da bi predstavljala tveganje za zdravje ljudi [21]. Večinski trg predstavljajo tri glavne skupine prehranskih dopolnil, in sicer prehranska dopolnila za spolno moč, hujšanje in uporabo v športu.

Ljudje po vsem svetu uporabljajo široko paleto izdelkov za zdravljenje in preprečevanje lažjih bolezni ter krepitev imunskega sistema [22]. Pomemben del tega trga predstavljajo izdelki na rastlinski osnovi z letno prodajo več milijard dolarjev [23]. Po oceni Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organization*, WHO), je vsaj 80 % prebivalstva v državah v razvoju še vedno odvisnih od zeliščnih pripravkov za zadovoljevanje svojih zdravstvenih potreb. V zadnjih letih so zeliščna zdravila postala tudi javno sprejeta in se pogosto uporabljajo v razvitih državah [24]. Na splošno med uporabniki velja prepričanje, da so bolj zdrava in varna v primerjavi s sodobnimi zdravili [25]. Poleg tega priljubljenost zdravil rastlinskega izvora trenutno raste zaradi hitrega širjenja spletnih nakupovalnih platform in globalizacije trga. Pogosto so oglasi teh izdelkov zavajajoči in vsebujejo dvomljive ter nedokazane trditve o njihovi učinkovitosti in varnosti [26]. Ta donosen trg je spodbudil proizvajalce, da ponarejajo zeliščna zdravila, kar postaja vedno večji problem v celotni industriji. Zaradi namernega dodajanja snovi, ki niso navedene na seznamu sestavin, je v zadnjih letih prišlo do številnih odpoklicev izdelkov s trga. Različne snovi so dodane z namenom okrepitve zelenega učinka prehranskega dopolnila [27]. Dodajajo zlasti farmacevtske učinkovine, da bi zagotovili takojšnje učinke, ki jih oglašujejo na etiketah [28]. Nekatere komponente, ki so cenejše od aktivnih učinkovin in se uporabljajo kot polnila, pa se dodajajo v želji po čim večjem zaslužku.

### 2.4.1 Prehranska dopolnila za spolno moč

V zadnjem obdobju se je močno povečalo uživanje zeliščnih prehranskih dopolnil za izboljšanje spolne moči pri moških. Domnevno so narejena iz zeliščnih afrodiziakov, kot so azijski ginseng, tongkat ali in maca [4], vendar so ti izdelki pogosto ponarejeni z dodajanjem farmacevtskih učinkovin, kot so zaviralci PDE5, npr. sildenafil, vardenafil in tadalafil [29]. Zaviralci PDE5 so zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje erektilne disfunkcije in se lahko uživajo le na zdravniški recept [30]. Niso priporočljiva za bolnike, ki uživajo druga zdravila, kot so npr. organski nitrati, ki se uporabljajo za zdravljenje sladkorne bolezni, hiperlipidemije in ishemične bolezni srca, saj lahko povzročijo padec krvnega tlaka [31]. Lažna zeliščna zdravila vsebujejo tudi derivate odobrenih zdravil, ki običajno ostanejo neodkriti, saj niso vključeni v rutinski postopek analize, ki ga uporabljajo laboratoriji za testiranje prehranskih dopolnil [4]. Običajno se zeliščna zdravila prodajajo v farmacevtskih dozirnih oblikah, kot so tablete in kapsule [32]. V zadnjih letih pa se je trend premaknil k prehrabnim izdelkom, ki niso tako strogo regulirani v primerjavi s tistimi v farmacevtskih dozirnih oblikah. Ti živilski izdelki so dostopni v lekarnah, živilskih trgovinah, trgovinah z zelišči, spletnih trgovinah in na črnem trgu [24]. Opredelitev in razvrstitev zdravil rastlinskega izvora trenutno nista mednarodno standardizirani, kar povzroča zmedo med potrošniki in težave med mednarodnimi organi. Glede na predpise in zakonodajo posamezne države jih lahko razvrstimo med živila, funkcionalna živila, prehranska dopolnila ali zdravila. Razširjeno ponarejanje rastlinskih prehranskih dodatkov je zaskrbljujoče z vidika javnega zdravja in varnosti hrane, saj se potrošniki pogosto ne zavedajo tveganj, povezanih z uživanjem takih izdelkov [4].



### 2.4.2 Prehranska dopolnila v športu

Naslednja skupina prehranskih dopolnil so dodatki za uporabo v športu. Uživanje športnih prehranskih dopolnil je vse bolj razširjeno tako med profesionalnimi kot amaterskimi športniki [33]. Večja pozornost med potrošniki je posledica prehranskih lastnosti in ergogenih učinkov dopolnil. V športnem kontekstu so ergogeni pripomočki opredeljeni kot snovi, ki se uporabljajo za povečanje energije in izboljšanje zmogljivosti. Na voljo je vedno več vrst beljakovinskih dodatkov, v športu pa se uporabljajo tudi druge vrste dopolnil, kot so energijski napitki, geli, kreatin, vitamini in t. i. pre-workout-i [34]. Ergogeni dodatki so se izkazali za priljubljeno strategijo v kontekstu športne prehrane, kar je posledica številnih domnevnih koristi, povezanih z njihovim uživanjem, kot so izboljšanje telesne sestave, povečanje mišične mase, izboljšanje vzdržljivosti, telesne zmogljivosti in moči [35]. Vendar pa lahko neustrezna uporaba ergogenih dodatkov privede do tveganj, ki lahko ogrozijo zdravje potrošnikov [36]. Do tveganj lahko pride predvsem v primeru, da prehransko dopolnilo vsebuje snovi, ki na embalaži niso navedene, kar pomeni, da jih uporabnik zaužije nevede. To je problematično tako z zdravstvenega vidika kot tudi z vidika nenamerne dopinga pri profesionalnih športnikih [37]. V številnih primerih so v športnih dodatkih odkrili anabolne steroide in prohormone. Ti izdelki so zasnovani tako, da posnemajo učinke testosterona: zlasti za povečanje rasti okostja in mišične mase. Nenadzorovana uporaba anabolnih steroidov ima lahko resne škodljive učinke, vključno s poškodbo jeter, neplodnostjo in srčno-žilnimi boleznimi, ki lahko povzročijo srčni zastoj ali možgansko kap [38].

### 2.4.3 Prehranska dopolnila za hujšanje

Tretja skupina prehranskih dopolnil pa so dodatki za uravnavanje telesne teže. Tudi izdelkom v tej kategoriji se dodajajo različne snovi za povečanje učinkovitosti, vključno z anorektiki, kot sta sibutramin in fentermin, ter diuretiki, kot sta bumentanid in furosemid. Pogosti so primeri ponarejanja domnevno naravnih dopolnil. Snovi, ki jih dodajajo lažnim naravnim izdelkom, so lahko prosto dostopne in dokaj neškodljive, npr. kofein, ali pa so veliko bolj nevarne in tudi prepovedane, kot so metamfetamin, amfetamin ali metilfenidat [27]. Najpogostejše naravne sestavine, ki se dodajajo izdelkom za uravnavanje telesne teže, so hitozan, glukomanan, kapsaicin, karnitin in konjugirana linolna kislina. Vendar naravni izvor teh sestavin ne zagotavlja njihove varnosti za uporabo. Ljudje pogosto zmotno mislijo, da je uporaba naravnih snovi vedno varna in zdrava, a lahko te snovi reagirajo s farmacevtskimi učinkovinami, kar lahko privede do hudih posledic. Po drugi strani pa imajo tudi mnoge naravne snovi negativne učinke na zdravje ljudi [39].

## 2.5 Tehnika ATR-FTIR

ATR-FTIR je pogosto uporabljena različica FTIR-spektroskopije. Omogoča hitro in enostavno analizo številnih vrst vzorcev, vključno s tekočinami, trdnimi snovmi (npr. praški), poltrdnimi snovmi in pastami. Pri ATR-FTIR infrardeča (IR) svetloba potuje skozi kristal, najpogosteje diamant, se vsaj enkrat odbije na meji med kristalom in vzorcem, odbita svetloba pa potuje do detektorja. Med notranjim odbojem del IR svetlobe potuje v vzorec, kjer se lahko absorbira, kar povzroči oslavljen totalni odboj. Del svetlobe, ki vstopi v vzorec, se imenuje evanescentni val. Globina prodora evanescentnega vala v vzorec je odvisna od lomnega količnika vzorca in kristala [40]. Najpogostejši material detektorjev pri ATR-FTIR je devteriran triglicin sulfat (DTGS) [41]. Gre za detektor, ki deluje kot piroelektrični bolometer. Signal se generira kot odziv na spremembo temperature zaradi absorpcije IR sevanja [42].

## 2.6 Tehnika HPLC-DAD

HPLC je separacijska tehnika, ki se uporablja za ločbo, identifikacijo in kvantifikacijo komponent mešanic. Komponente vzorca skupaj z mobilno fazo potujejo po koloni (tipično dosežemo tlake do 400 bar) in se ločijo na podlagi interakcij s stacionarno in mobilno fazo, kar privede do selektivnega časa zadrževanja v koloni [43].

DAD je pogost detektor, ki se uporablja za HPLC. Deluje na osnovi absorpcije svetlobe v ultravijoličnem (UV) in vidnem (angl. *visible*, Vis) območju. Medtem ko detektor UV-Vis omogoča detekcijo pri le eni valovni dolžini ( $\lambda$ ), pa ima DAD niz diod za pridobivanje informacij pri več  $\lambda$  hkrati, kar predstavlja prednost pri identifikaciji spojin [44].

## 2.7 Tehnika UHPLC-HRMS

UHPLC-HRMS je v zadnjih letih postala pomembna analizna tehnika za angl *screening* vzorcev v npr. farmacevtski, prehranski, kmetijski in kozmetični industriji. Primerna je tako za tarčno analizo, pri kateri preverjamo prisotnost določenega analita [45], kot tudi za netarčno analizo, s katero lahko identificiramo velik nabor organskih spojin, prisotnih v vzorcu [46]. UHPLC v primerjavi s HPLC dosega višje tlake (tudi preko 1000 bar) [47], kar prinaša številne prednosti, kot so krajši čas analize, izboljšana selektivnost, občutljivost in ločljivost [48]. Sklopitev UHPLC z masnim spektrometrom visoke ločljivosti, kot so ionska ciklotronska resonanca s Fourierovo transformacijo (angl. *Fourier-transform ion cyclotron transformation*, FTICR), masni analizator na čas preleta (angl. *time of flight*, TOF) ali masni analizator angl. *Orbitrap*, omogoča identifikacijo spojin z visoko zanesljivostjo [49].

### 2.7.1 Masni analizator *Orbitrap*

Analizo vzorcev smo izvedli z UHPLC-HRMS, kjer smo kot HRMS uporabili masni analizator *Orbitrap*, ki je sestavljen iz treh elektrod. Zunanji elektrodi imata obliko skodelic, ki sta obrnjeni druga proti drugi in sta električno izolirani z obročem iz dielektrika, v notranjosti pa je centralna elektroda. Ko med zunanjsima elektrodama in centralno elektrodo priključimo napetost, se generira električno polje vzdolž linearne osi. Ioni se v prostor med centralno in zunanjo elektrodo vbrizgajo vzdolž tangente skozi režo v eni od zunanjih elektrod. Z napetostjo med centralno in zunanjsima elektrodama radialna komponenta električnega polja upogne pot ionov proti osrednji elektrodi, medtem ko zaradi obodne hitrosti pride do centrifugalne sile v nasprotni smeri. Ob ustrezni izbiri parametrov ostanejo ioni v skoraj krožni spirali znotraj analizatorja, podobno kot planeti v osončju. Hkrati električno polje vzdolž linearne osi potiska ione proti najširšemu delu in povzroča vzdolžno harmonično nihanje. Zunanji elektrodi nato služita kot sprejemni plošči za zaznavanje teh vzdolžnih oscilacij [50].

V primerjavi z drugimi masnimi analizatorji visoke masne ločljivosti, kot sta FTICR in TOF, ima *Orbitrap* številne prednosti predvsem kar zadeva masno ločljivost. *Orbitrap* ima edinstven način vzbujaanja aksialnih (vzdolžnih) oscilacij, ki poteka na principu pulznega vbrizgavanja ionov v analizator tangencialno skozi režo v zunanji elektrodi. Položaj reže glede na središče analizatorja določa amplitudo vzdolžnih oscilacij (vzbujanje z vbrizgavanjem). Vzbujanje z vbrizgavanjem zagotavlja povezavo med fazo oscilacij in razmerjem  $m/z$ . To omogoča uporabo izboljšane različice Fourierove transformacije (angl. *enhanced Fourier transformation*, eFT), ki uporablja informacije o fazi oscilacij. Uporaba eTF omogoča podvojitev masne ločljivosti ali povečanje hitrosti analize za isti faktor ob nespremenjeni masni ločljivosti [51].

## 2.8 Tehnika GC-MS

Ena od aplikacij GC-MS je analiza zdravilnih učinkovin v farmacevtski industriji in drog v forenziki. Številne psihoaktivne snovi so hlapne in imajo razmeroma majhno molekularno maso, zaradi česar so te spojine primerne za analizo z GC [52]. Najpogosteje uporabljena tehnika ionizacije pri GC-MS je elektronska ionizacija (EI), pri kateri z elektroni obstreljujemo ločene komponente vzorca, kar povzroči fragmentacijo spojin, ki jih lahko nato na podlagi masnega spektra določimo [53]. Pri EI se uporablja kinetična energija elektronov 70 eV in omogoča ionizacijo večine organskih spojin. Z uporabo te energije so se izdelale podatkovne zbirke masnih spektrov [54].

### 3 Eksperimentalni del

Za analizo vzorcev psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil smo uporabili več analiznih tehnik. Za analize ATR-FTIR, HPLC-DAD in GC-MS smo uporabili metode, ki jih uporabljajo v laboratoriju za analizo psihoaktivnih snovi na NLZOH, razvili pa smo tudi novo metodo UHPLC-HRMS za določevanje večjega števila organskih spojin.

#### 3.1 Uporaba ATR-FTIR

##### 3.1.1 Laboratorijska oprema in aparature

Za analizo ATR-FTIR smo uporabili:

- ATR-FTIR Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham, MA, ZDA),
- spatulo, s katero smo vzorce nanesli na merilno mesto instrumenta,
- terilnico in pestilo za drobljenje in homogeniziranje vzorcev.

##### 3.1.2 Kemikalije

Uporabili smo:

- 2-propanol (99 %, VWR, Radnor, PA, ZDA),
- etanol (99,9 %, Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ZDA).

##### 3.1.3 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev se razlikuje glede na njihov tip. Kapsule, praške, gele in tekoče vzorce smo analizirali direktno, tablete pa smo najprej stehtali, jih zdrobili in homogenizirali s terilnico in pestilom ter nato analizirali.

##### 3.1.4 Analiza vzorcev

Za analizo ATR-FTIR smo uporabili programski paket SpectrumIR (verzija 10.6.1, PerkinElmer, Waltham, MA, ZDA). Najprej smo z 2-propanolom očistili merilno mesto in izmerili ozadje spektra. Nato smo na merilno mesto postavili vzorec in ga pritrdili z vijakom. Spekte ATR-FTIR smo izmerili v območju od  $4000\text{ cm}^{-1}$  do  $400\text{ cm}^{-1}$  z ločljivostjo  $4\text{ cm}^{-1}$ . Izmerjen spekter smo nato primerjali s knjižnico spektrov. Po končani meritvi smo vzorec odstranili z merilnega mesta, ki smo ga ponovno očistili z 2-propanolom, da je bilo pripravljeno na naslednjo meritve.

##### 3.1.5 Identifikacija spojin

Za identifikacijo spojin v analiziranih vzorcih smo uporabili 21 različnih knjižnic spektrov z več kot 80000 spojinami. Zelo pomembno knjižnico pri analizi nam je predstavljala interna knjižnica NLZOH, v katero se redno shranjujejo za NLZOH pomembne snovi. Seznam preostalih uporabljenih knjižnic: FDM ATR Polymers Diamond, FDM ATR Polymers Germanium, FDM ATR Organics Diamond, FDM ATR Organics Germanium, FDM ATR Inorganics Diamond, FDM ATR Inorganics Germanium, FDM ATR Dyes Diamond, FDM ATR Dyes Germanium, FDM ATR Retail Adhesives & Sealants, FDM ATR Drugs, FDM ATR Essential Oils, FDM ATR Cosmetics, FDM FTIR Polymers & Polymer Additives, FDM

FTIR Surfactants, FDM FTIR Minerals & Inorganics, FDM FTIR Organics, FDM FTIR Drugs, FDM Comprehensive Organics, FDM VPFTIR Organics, FDM Forensic VPFTIR, FDM HiRes VPFTIR for Sear, FDM Forensic VPFTIR, FDM HiRes VPFTIR for Sear.

## 3.2 Uporaba HPLC-DAD

### 3.2.1 Laboratorijska oprema in aparature

Za analizo HPLC-DAD smo uporabili:

- HPLC-DAD 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA),
- C18 reverzno-fazno kromatografsko kolono InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA), dimenzij 4,6 mm x 100 mm, z delci premera 2,7  $\mu\text{m}$ ,
- terilnico in pestilo za drobljenje in homogeniziranje vzorcev,
- bučke volumnov 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL in 25 mL, v katere smo pripravili raztopine vzorcev,
- analitsko tehtnico XSR105 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica), s katero smo zatehtali potrebno količino vzorca,
- ultrazvočno kopel (ASonic, Ljubljana, Slovenija),
- stresalnik (VELP Scientifica, Usmate, Italija),
- spatulo,
- čaše,
- steklene HPLC-viale,
- vialo UNI-PREP,
- avtomatsko pipeto (Sartorius, Göttingen, Nemčija) za odmerjanje volumna vzorcev,
- mehansko pipeto (Brand, Wertheim am Main, Nemčija) za odmerjanje volumna topila.

### 3.2.2 Kemikalije

Uporabili smo:

- ultračisto vodo (18,2 M $\Omega$  cm) proizvedeno s sistemom Milli-Q (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- metanol (99,8 %, J. T. Baker, Radnor, PA, ZDA),
- ACN (99,9 %, J. T. Baker, Radnor, PA, ZDA),
- metanojsko kislino (99 %, Carlo Erba, Milano, Italija).

### 3.2.3 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev se razlikuje glede na njihov tip. Kapsule, praške, gele in tekoče vzorce smo zatehtali direktno v bučko, slaščice smo zatehtali direktno v čašo, tablete pa smo najprej stehtali, jih zdrobili in homogenizirali s terilnico in pestilom ter nato potrebno količino zatehtali v bučko. Vzorcem smo dodali metanol, s katerim smo ekstrahirali aktivne učinkovine.

Okvirne zatehte različnih tipov vzorcev in dodani volumni metanola:

- kapsule: vsebina celotne kapsule/25 mL,
- tablete: celotna tableta/25 mL,
- čaji: 1 g/25 mL,

- proteini: 1 g/25 mL,
- praški: 500 mg/25 mL,
- geli: 1 g/10 mL,
- raztopine: 1 g/10 mL,
- smole (v primeru e-cigaret): 100 mg/10 mL,
- slaščice (npr. bonbon): polovica bonbona/20 mL.

Tako pripravljene raztopine smo najprej premešali na stresalniku, jih za 5 minut postavili v ultrazvočno kopel, ponovno premešali na stresalniku, 1 minuto centrifugirali in nato supernatant prefiltrirali z vialo UNI-PREP. Za nekatere vzorce (npr. bonbon) smo nato pripravili še 10-kratno redčitev, ostale pa smo direktno analizirali s HPLC-DAD.

### 3.2.4 Analiza vzorcev

Za HPLC-DAD je bil uporabljen programski paket OpenLab ChemStation (verzija C.01.09, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). Najprej smo v kromatografski sistem injicirali topilo (metanol) in nato raztopino za preverjanje ustreznosti sistema (RUS), ki vsebuje 0,1 mg/mL kofeina. Za analizo pol-sintetičnih kanabinoidov smo uporabili metodo za identifikacijo kanabinoidov (tabela 3-1), za analizo prehranskih dopolnil pa metodo PD-1 (tabela 3-2).

Tabela 3-1: Parametri metode za identifikacijo kanabinoidov.

Parameter	Vrednost/opis	
Temperatura kolone	40,0 °C	
Temperatura avtomatskega vzorčevalnika	15,0 °C	
Volumen injiciranja	5,0 µL	
Pretok	1,0 mL/min	
Čas kromatografiranja	35 min	
Mobilna faza A	ultračista voda + 0,1 % metanojske kisline	
Mobilna faza B	20 % ACN + 80 % metanola + 0,1 % metanojske kisline	
Območje izmerjenega UV-spektra	190–640 nm	
<b>Potek metode</b>		
Čas [min]	Volumski delež A [%]	Volumski delež B [%]
0	40	60
4	40	60
20	23	77
23	5	95
30	5	95
31	40	60

Tabela 3-2: Parametri metode PD-1.

Parameter	Vrednost/opis	
Temperatura kolone	40,0 °C	
Temperatura avtomatskega vzorčevalnika	15,0 °C	
Volumen injiciranja	1,0 µL	
Pretok	1,0 mL/min	
Čas kromatografiranja	14 min	
Mobilna faza A	ultračista voda + 0,1 % metanojske kisline	
Mobilna faza B	20 % ACN + 80 % metanola + 0,1 % metanojske kisline	
Območje izmerjenega UV-spektra	190–640 nm	
<b>Potek metode</b>		
Čas [min]	Volumski delež A [%]	Volumski delež B [%]
0,0	90,0	10,0
10,0	10,0	90,0
11,5	90,0	10,0
14,0	90,0	10,0

### 3.2.5 Identifikacija spojin

Za kvalitativno analizo substanc smo uporabili interno knjižnico UV-spektrov raztopin standardov, imenovano PD library. Za nove, neznane, redke ali nenavadne substance, ki jih s HPLC-DAD nismo sposobni identificirati, pa je potrebna analiza UHPLC-HRMS.

## 3.3 Uporaba UHPLC-HRMS

### 3.3.1 Laboratorijska oprema in aparature

Za analizo UHPLC-HRMS smo uporabili:

- sistem UHPLC-HRMS z masnim analizatorjem Orbitrap Exploris™ 120 Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA),
- kromatografsko kolono, Accucore AQ, dimenzij 100 mm x 2,1 mm, z delci premera 2,6 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA)
- preostali material enak kot za HPLC-DAD.

### 3.3.2 Kemikalije

Uporabili smo enake kemikalije kot za HPLC-DAD.

### 3.3.3 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev je bila enaka kot za HPLC-DAD. Za analizo UHPLC-HRMS smo naredili še 100- in 1000-kratno redčitev pripravljenih raztopin. Faktor redčitve smo določili na podlagi meritev HPLC-DAD, s katero smo dobili informacije o okvirni vsebnosti učinkovin, prisotnih v vzorcih in odzivu na sistemu.

### 3.3.4 Analiza vzorcev

UHPLC-HRMS smo upravljali s programskim paketom Xcalibur (verzija SV 4.5, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA). Najprej smo v kromatografski sistem injicirali topilo (metanol) in nato RUS, ki vsebuje 0,1 mg/mL kofeina. Za analizo vseh tipov vzorcev smo uporabili metodo za identifikacijo organskih spojin (tabela 3-3 in tabela 3-4).

Tabela 3-3: UHPLC-parametri metode za identifikacijo organskih spojin.

Parameter	Vrednost/opis	
Temperatura kolone	40,0 °C	
Temperatura avtomatskega vzorčevalnika	10,0 °C	
Volumen injiciranja	1,0 µL	
Pretok	0,300 mL/min	
Čas kromatografiranja	25 min	
Mobilna faza A	ultračista voda + 0,1 % metanojske kisline	
Mobilna faza B	metanol + 0,1 % metanojske kisline	
<b>Potek metode</b>		
Čas [min]	Volumski delež A [%]	Volumski delež B [%]
0,0	98,0	2,0
0,5	98,0	2,0
2,0	60,0	40,0
20,0	5,0	95,0
22,0	5,0	95,0
22,1	98,0	2,0
25,0	98,0	2,0

Tabela 3-4: HRMS-parametri metode Identifikacija.

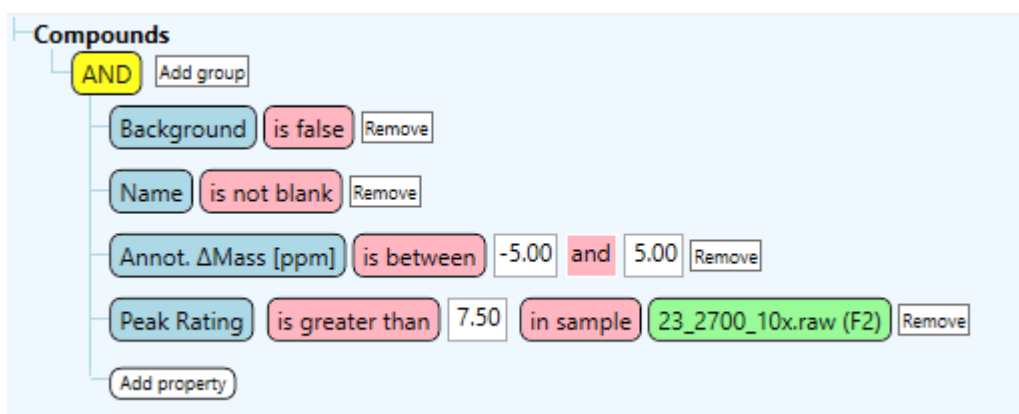
<b>Ionski izvor</b>	
Parameter	Vrednost/opis
Tip ionizacije	ogrevana elektrosprej ionizacija (angl. <i>heated electrospray ionization</i> , HESI)
Napetost za pozitivno ionizacijo	3500 V
Napetost za negativno ionizacijo	2500 V
Razmerje pretokov <i>sheath gas:auxiliary gas:sweep gas</i>	30:6:1
Temperatura kanala za prenos ionov	290 °C
Temperatura uparjalnika	350 °C
<b>Način angl. Full Scan</b>	
Parameter	Vrednost/opis
Masna ločljivost (angl. <i>resolution</i> )	60000
Območje izmerjenega masnega spektra	70–700 <i>m/z</i>



Odstotek odprtosti leč (angl. <i>RF Lens level</i> )	60 %
Polariteta	pozitivna in negativna
<b>Način »neodvisne analize« (angl. <i>data-independent acquisition, DIA</i>)</b>	
<b>Parameter</b>	<b>Vrednost/opis</b>
Razpon mas prekuzorskih ionov	50–700 <i>m/z</i>
Napetost kolizijske celice pri fragmentaciji HCD (angl. <i>higher-energy C-trap dissociation</i> )	32,5 V
Masna ločljivost	30000
Polariteta	pozitivna in negativna
DIA <i>m/z</i> -intervali	45–155; 145–255; 245–355; 345–455; 545–655; 645–755

### 3.3.5 Identifikacija spojin

Uporabili smo programski paket Compound Discoverer (verzija 3.3, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA), ki s pomočjo podatkovnih baz in knjižnic spektrov, kot so mzCloud, Chemspider, mzVault, ter internih knjižnic izvede identifikacijo spojin. V programskem paketu smo pred začetkom identifikacije določili potek dela (angl. *workflow*), s katerim smo izbrali, iz katerih podatkovnih baz in knjižnic spektrov naj črpa podatke, ter določili zahteve za posamezne parametre. Compound Discoverer je nato na podlagi masnega spektra in kromatograma predlagal strukturo vsake identificirane spojine. Z uporabo filtrov (odšteli smo ozadje, odstranili zadetke brez pripadajočega imena oz. kemijske formule, kot maksimalno sprejemljivo razliko med izmerjeno maso spojine in njeno dejansko maso smo določili 5,00 ppm, kot minimalni sprejemljiv angl. *peak rating* na lestvici od 0,00 do 10,00 smo določili 7,50) smo zožili nabor predlaganih spojin in razvrstili identificirane spojine glede na njihov angl. *peak rating* (slika 3-1).



Slika 3-1: Uporabljen filter za identifikacijo spojin v programskem paketu Compound Discoverer.

Iz več tisoč prvotno predlaganih spojin smo tako dobili seznam spojin, za katere smo lahko potrdili, da so prisotne v vzorcu. Z uporabo programskega paketa FreeStyle (verzija SV 1.8, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA) smo izvedli še ciljano preveritev, s katero smo v vzorcih določili prisotnost analitov, ki so v takšnih tipih vzorcev pogosto prisotni in jih

morda s pomočjo programskega paketa Compound Discoverer nismo identificirali. V tabelah od 3-5 do 3-7 so zbrane spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v različnih tipih prehranskih dopolnil.

Tabela 3-5: Organske spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v prehranskih dopolnilih za hujšanje.

<b>SPOJINA</b>	<b>RT (HPLC-DAD) [min]</b>	<b>RT (UHPLC-HRMS) [min]</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>
efedrin	3,5	3,5	166,1226
metilheksanamin	/	4,2/4,3*	116,1434
fenolftalein	8,1	6,9	319,0965
sibutramin	8,8	8,8	280,1827
desmetilsibutramin	8,9	9,2	266,1670
didesmetilsibutramin	9,0	9,7	252,1514
fluoksetin	8,7	9,1	310,1413

Tabela 3-6: Organske spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v prehranskih dopolnilih za izboljšanje spolne moči.

<b>SPOJINA</b>	<b>RT (HPLC-DAD) [min]</b>	<b>RT (UHPLC-HRMS) [min]</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>
johimbin	5,9	4,6	355,2016
avanafil	7,6	6,6	484,1858
vardeafil	7,6	6,6	489,2279
sildenafil	7,9	7,1	475,2122
tadalafil	9,0	8,6	390,1448
tioaildenafil (sulfoaildenafil)	9,6	11,1	505,2050
desmetilkarbodeafil	7,0	5,9	439,2452

Tabela 3-7: Organske spojine, ki jih v NLZOH ciljano preverjajo v športnih prehranskih dopolnilih.

<b>SPOJINA</b>	<b>RT (HPLC-DAD) [min]</b>	<b>RT (UHPLC-HRMS) [min]</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>
ligandrol	10,3	11,4	339,0927
etil-1-fenilacetil-1-proliglicinat	7,6	5,9	319,1652
ostarin	9,7	10,2	407,1326 ([M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> )
4-dehidroepiandrosteron	10,2	11,5	271,2056 ([M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> )

V primeru ostarina in 4-dehidroepiandrosterona ima najvišjo intenziteto ion [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> oz. [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

### 3.4 Uporaba GC-MS

#### 3.4.1 Laboratorijska oprema in aparature

Za analizo GC-MS smo uporabili:

- GC-MS 5973i (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA; Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, ZDA),
- kolono J & W 122-5532UI DB-5MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA), dimenzij 30,0 m x 250  $\mu\text{m}$ , z nanosom debeline 0,25  $\mu\text{m}$ ),
- preostali material enak kot za HPLC-DAD.

#### 3.4.2 Kemikalije

Uporabili smo enake kemikalije kot za HPLC-DAD.

#### 3.4.3 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev je bila enaka kot za HPLC-DAD. Za analizo GC-MS smo pripravili še 100-kratno redčitev pripravljenih raztopin. Faktor redčitve smo določili na podlagi prvotnih meritev HPLC-DAD, s katero smo dobili informacije o okvirni vsebnosti učinkovin, prisotnih v vzorcih in odzivu na sistemu.

#### 3.4.4 Analiza vzorcev

GC-MS smo upravljali s programskim paketom MSD ChemStation (verzija E.02.02.1431, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). Najprej smo v kromatografski sistem injicirali topilo (metanol) in nato RUS, ki vsebuje 0,1 mg/mL kofeina. Uporabili smo metodo za psihoaktivne snovi (tabela 3-8).

Tabela 3-8: Parametri metode GC-MS za psihoaktivne snovi.

<b>Termostatirana pečica</b>		
<b>Parameter</b>	<b>Vrednost/opis</b>	
Začetna temperatura	40 °C	
Maksimalna temperatura	325 °C	
<b>Temperaturno programiranje</b>		
Čas [min]	Temperatura [°C]	Gradient [°C/min]
0	40	10
28	320	/
Čas metode	38 min	
<b>Ionski izvor</b>		
<b>Parameter</b>	<b>Vrednost/opis</b>	
Tip ionizacije	EI	
Kinetična energija elektronov	70 eV	
<b>Injektor</b>		
Način injiciranja	angl. <i>splitless</i> (v kolono se injicira celoten volumen)	

Začetna temperatura	290 °C
Nosilni plin	helij
<b>Kolona</b>	
Začetni tlak	48,3 kPa
Volumen injiciranja	2,0 µL
Pretok nosilnega plina	1,0 mL/min
Angl. <i>Transfer line</i>	
Temperatura	280 °C
<b>MS</b>	
Območje izmerjenega masnega spektra	50–550 atomskih masnih enot (angl. <i>atomic mass units</i> , amu)

### 3.4.5 Identifikacija spojin

Analizo GC-MS smo izvedli le za vzorce, ki so vsebovali NPS, za katere knjižnice spektrov UHPLC-HRMS ne obstajajo, so pa že bile določene z GC-MS. Za identifikacijo smo uporabili podatkovno zbirko EDND.

## 4 Rezultati in diskusija

Z metodo UHPLC-HRMS smo analizirali tri vzorce psihoaktivnih snovi na osnovi HHC in 58 vzorcev prehranskih dopolnil. Pred analizo UHPLC-HRMS smo izvedli še analizi ATR-FTIR in HPLC-DAD, za enega izmed vzorcev psihoaktivnih snovi pa smo za potrditev naredili še analizo GC-MS.

### 4.1 Analiza psihoaktivnih snovi

Za analizo smo izbrali vzorce, ki naj bi vsebovali nov pol-sintetični kanabinoid HHC in njegova derivata HHC-O ter HHC-P. Analizirali smo tri vzorce in identificirali štiri različne pol-sintetične kanabinoide (tabela 4-1).

Tabela 4-1: Pol-sintetični kanabinoidi, identificirani v psihoaktivnih snoveh na osnovi HHC.

IME	RT (HPLC-DAD) [min]	RT (UHPLC-HRMS) [min]	RT (GC-MS) [min]	[M+H] <sup>+</sup>
HHC	24,7/24,8/24,9	18,6/18,7/18,9	23,6/23,7	317,2475
HHC-P	25,8/25,9	20,0/20,2	/	345,2788
HHC-O	25,8/26,0	20,2/20,3	23,2/23,6	359,2581
OH-HHC	21,5-23,5	15,4/16,5/17,0/17,3	/	333,2416

Za analizo vseh vzorcev smo uporabili opisane metode. Predstavljeni so rezultati analize vzorcev HHC\_GB\_1 in HHC\_GB\_2.

#### 4.1.1 Vzorec HHC\_GB\_1

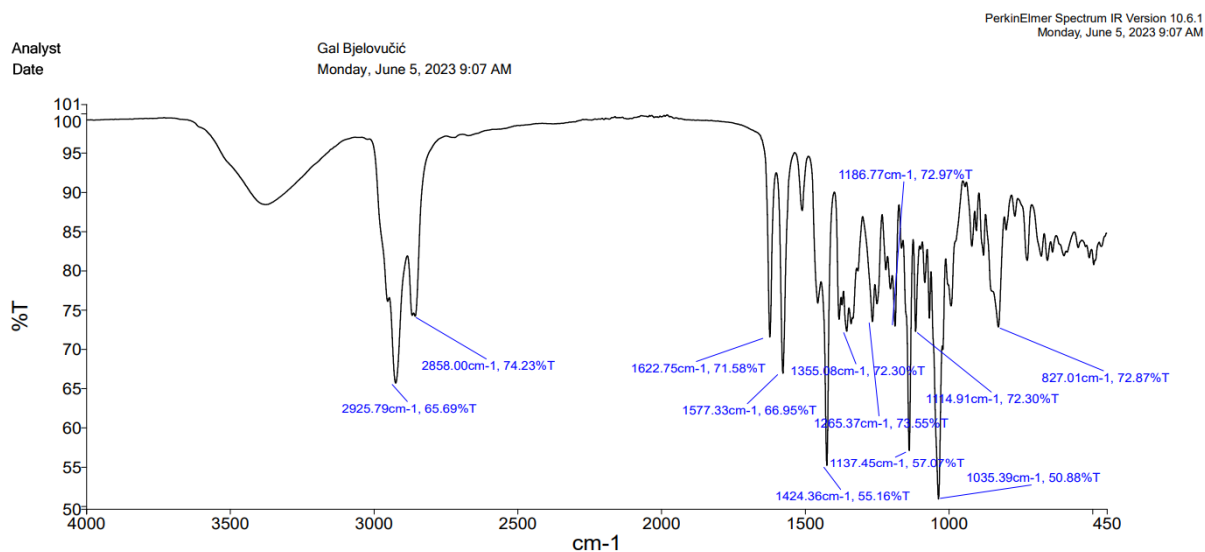
Izvedli smo analizo vzorca kartuše za e-cigareto, imenovane Lemon Skunk, ki je imel na embalaži navedeno domnevno vsebnost HHC, HHC-P in HHC-O (slika 4-1). Izdelek je bil kupljen v trgovini s sedežem v Sloveniji.



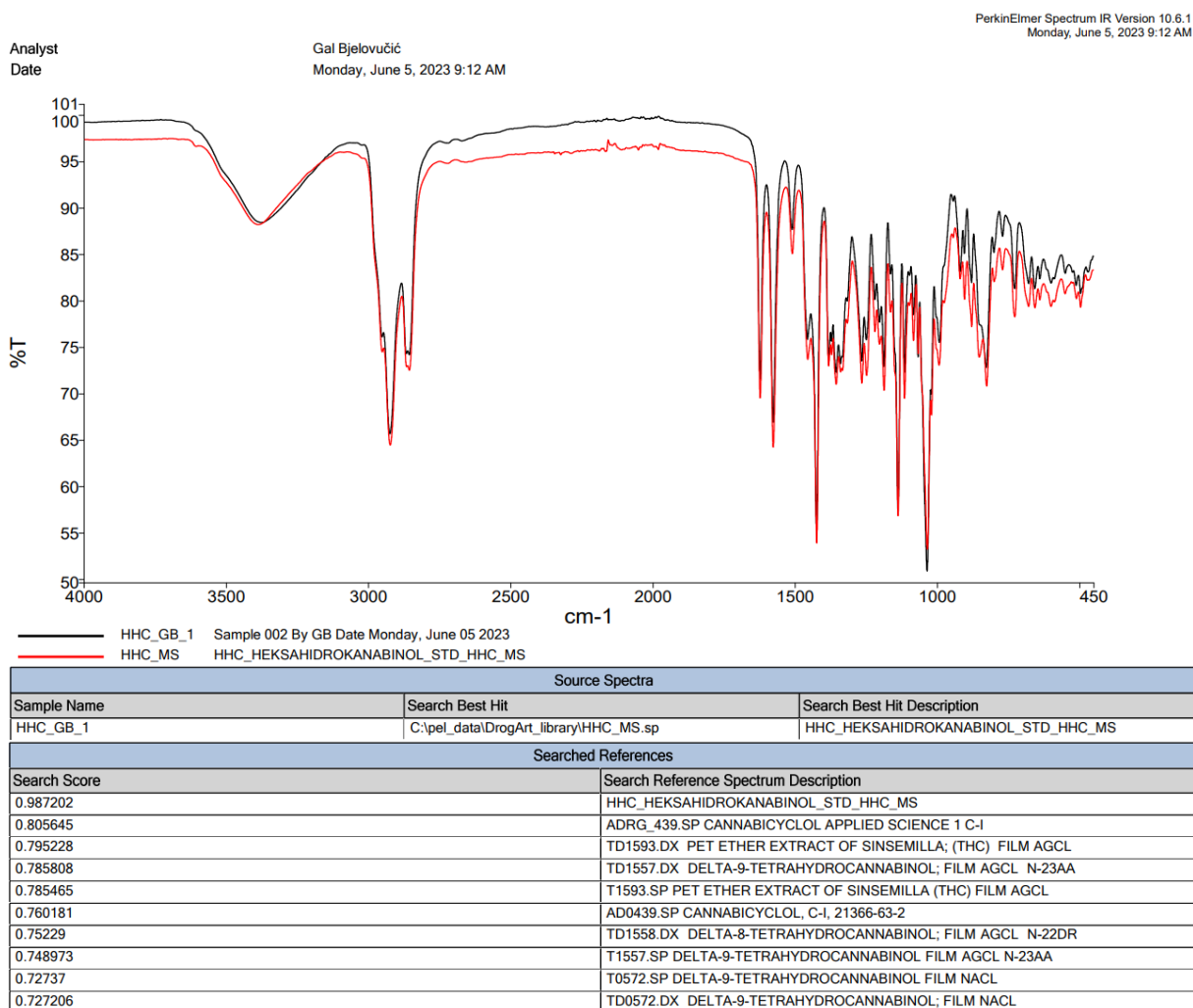
Slika 4-1: Vzorec HHC\_GB\_1.

#### 4.1.1.1 Analiza ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_1

Najprej smo naredili analizo ATR-FTIR. Slika 4-2 prikazuje spekter ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_1 z označenimi najbolj intenzivnimi vrhovi, na sliki 4-3 pa je prikazana primerjava spektra vzorca (črno) s spektrom HHC (rdeče), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje po primerjavi s knjižnico spektrov, in tabela desetih najvišjih ujemanj. Iz 99 % ujemanja med spektroma vzorca HHC\_GB\_1 in HHC iz knjižnice spektrov lahko sklepamo na prisotnost HHC v vzorcu.



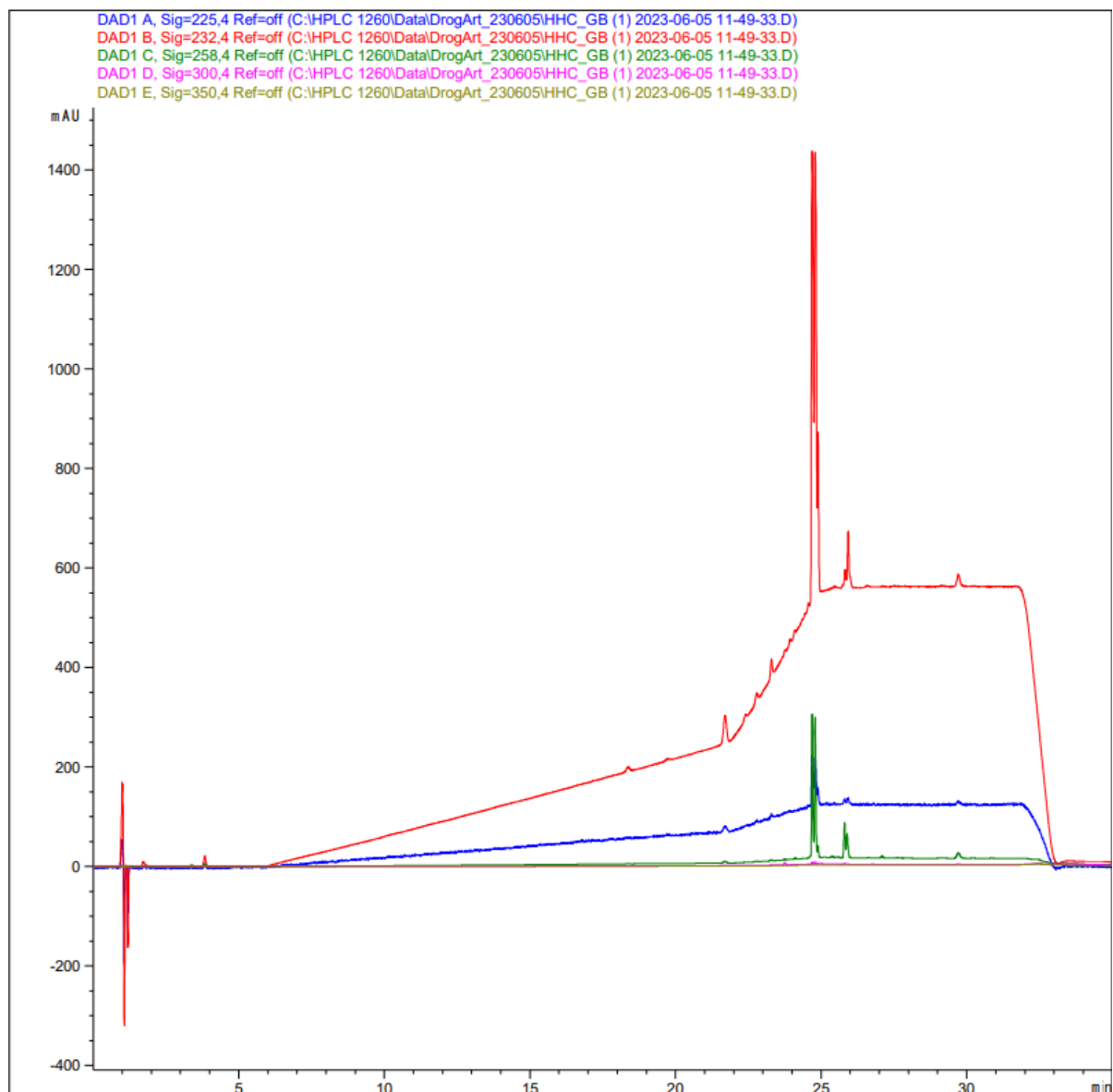
Slika 4-2: Spekter ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_1.



Slika 4-3: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_1 (črno) s spektrom HHC iz knjižnice spektrov (rdeče) in tabela desetih najvišjih ujemanj.

#### 4.1.1.2 Analiza HPLC-DAD vzorca HHC\_GB\_1

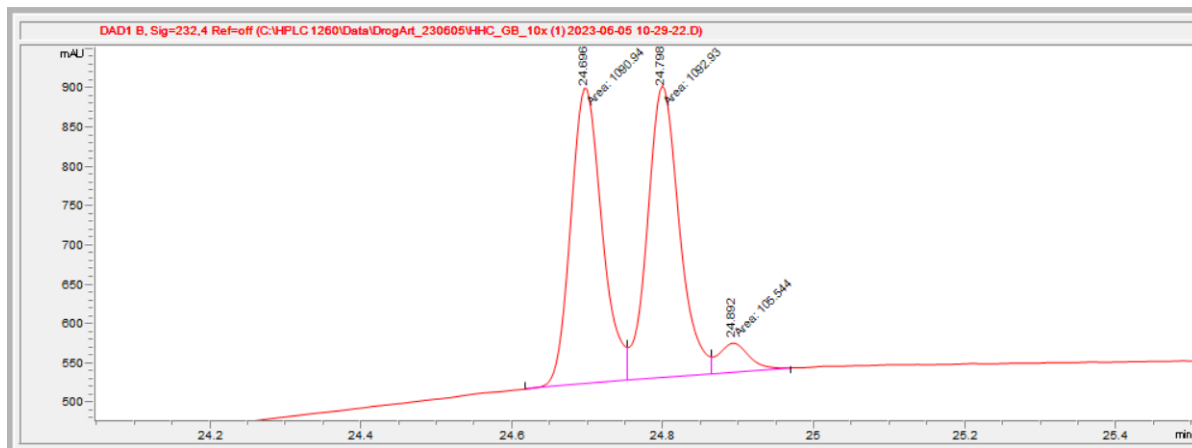
Po izvedbi analize ATR-FTIR smo naredili analizo HPLC-DAD (slika 4-4). Najbolj intenzivna vrhova sta se pojavila pri  $RT = 24,7$  min in  $RT = 24,8$  min. UV-spekter obeh vrhov se ujema z UV-spektrom HHC iz knjižnice spektrov (slika 4-6). Na podlagi literature [15] smo sklepali, da gre za kromatografska vrhova epimerov  $9\alpha$ -HHC in  $9\beta$ -HHC (razlikujeta se po konfiguraciji okrog kiralnega centra – deveti C-atom), ki nastaneta pri sintezi HHC iz CBD oz.  $\Delta^8/\Delta^9$ -THC. Podoben UV-spekter kot vrhova pri  $RT = 24,7$  min in  $RT = 24,8$  min ima tudi vrh pri  $RT = 24,9$  min, kar nakazuje na prisotnost še enega stereoisomera HHC. Poleg vrhov izomerov HHC so prisotni tudi nekateri drugi vrhovi, od katerih sta najbolj intenzivna pri  $RT = 21,7$  min in  $RT = 25,9$  min, za katera s HPLC-DAD nismo določili, katerim spojinam ustrezata.



Slika 4-4: Kromatogrami vzorca HHC\_GB\_1 pri  $\lambda = 225$  nm (modro),  $\lambda = 232$  nm (rdeče),  $\lambda = 258$  nm (zeleno),  $\lambda = 300$  nm (rožnato) in  $\lambda = 350$  nm (oker).

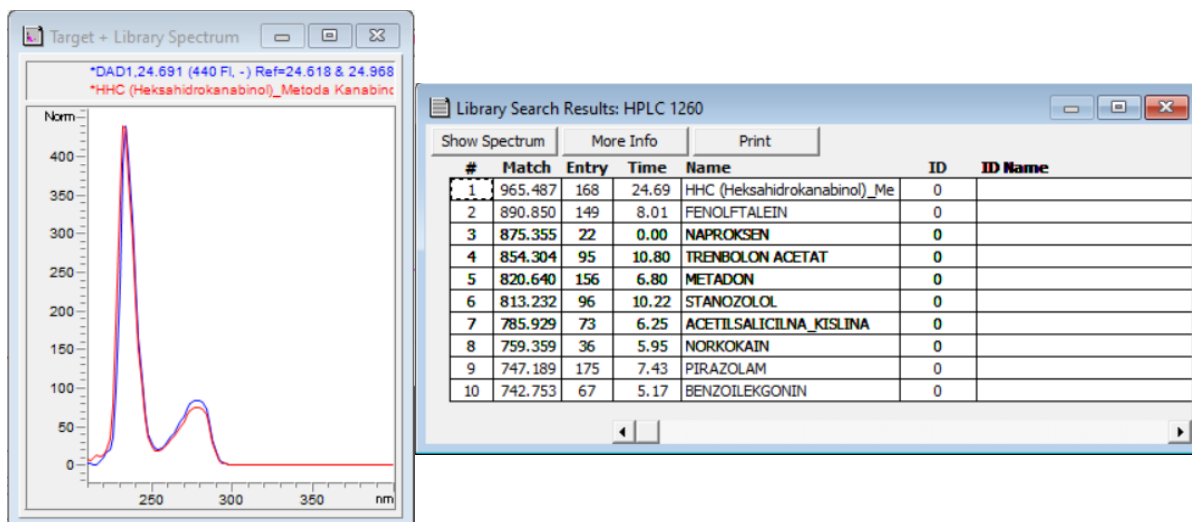
Na sliki 4-5 je prikazan približan kromatogram, ki je bil izmerjen pri  $\lambda = 232$  nm, na katerem so vidni kromatografski vrhovi stereoisomerov HHC ( $RT = 24,7$  min,  $RT = 24,8$  min in  $RT = 24,9$  min).





Slika 4-5: Približen kromatogram vzorca HHC\_GB\_1 za časovni interval od 24,1 min do 25,5 min pri  $\lambda = 232$  nm.

Slika 4-6 prikazuje primerjavo UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 24,7$  min (modro) in UV-spektra HHC iz knjižnice spektrov (rdeče), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje, in tabelo 10 najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.

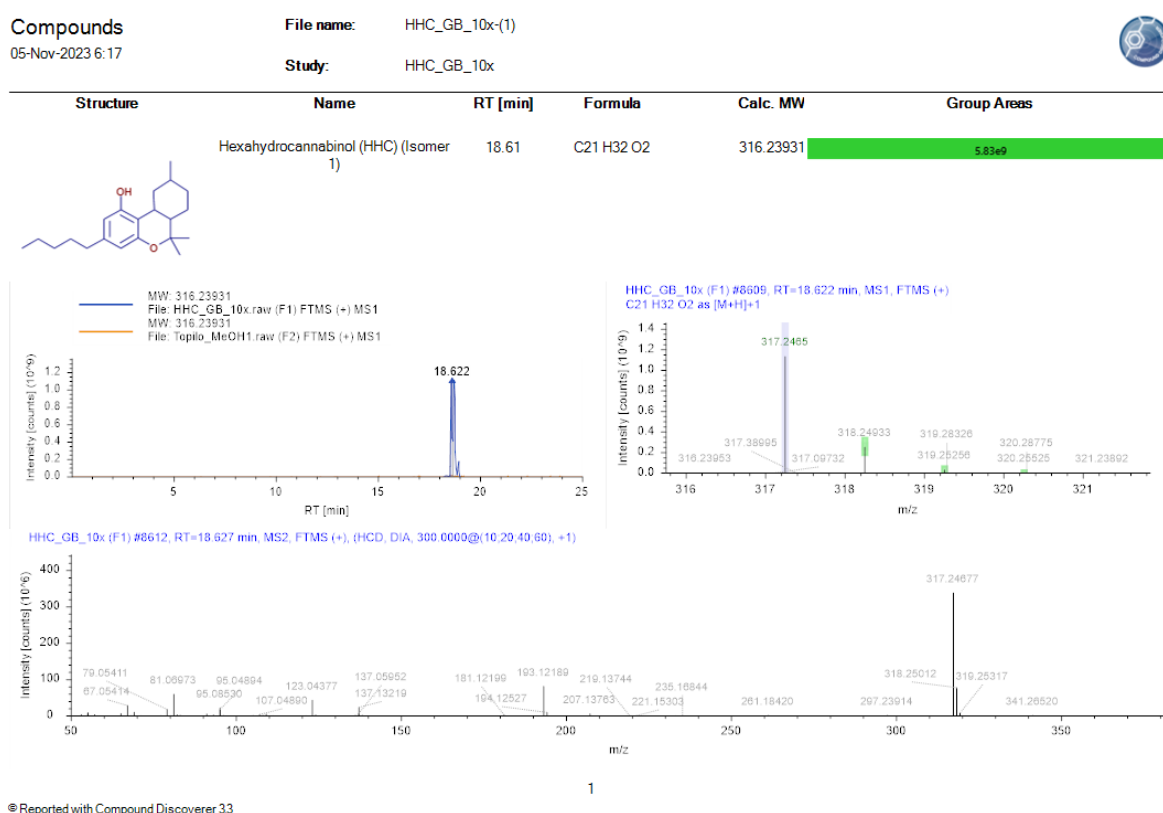


Slika 4-6: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 24,7$  min (modro) in UV-spektra HHC iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.

#### 4.1.1.3 Analiza UHPLC-HRMS vzorca HHC\_GB\_1

Kot potrditveno analizo tehniko smo uporabili UHPLC-HRMS, s katero smo identificirali HHC in dva derivata HHC: HHC-P ter hidroksiheksahidrokanabinol (angl. *hydroxyhexahydrocannabinol*, OH-HHC). Na embalaži izdelka je bilo navedeno, da kartuša vsebuje HHC-O, vendar prisotnosti tega derivata HHC nismo potrdili, je pa v izdelku prisoten OH-HHC, ki ni bil naveden na embalaži.

Na sliki 4-7 je prikazan kromatogram (zgoraj levo), na katerem so vidni trije kromatografski vrhovi z masnim spektrom HHC. Kot je bilo predhodno omenjeno, smo na podlagi literature skleпали, da kromatografska vrhova z največjo ploščino ( $RT = 18,6$  min in  $RT = 18,7$  min) predstavljata epimera (9S)-HHC in (9R)-HHC, ki sta glavna produkta sinteze HHC iz CBD, ne moremo pa tega z gotovostjo trditi. Prisoten je tudi vrh pri  $RT = 18,9$  min, ki nakazuje na prisotnost še enega stereoizomera HHC. Stereoizomeri HHC se razlikujejo le v konfiguraciji okrog kiralnih centrov, zato med njihovimi masnimi spektri ni razlik. Zgoraj desno na sliki 4-7 je masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom), ki pripada kromatografskemu vrhu pri  $RT = 18,6$  min (izomer 1). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Masni spekter fragmentov je prikazan spodaj na sliki 4-7. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost HHC v vzorcu.



Slika 4-7: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_1, na katerem so vidni kromatografski vrhovi epimerov HHC (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri  $RT = 18,6$  min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Na enak način kot za izomer 1 HHC, so na sliki 4-8 prikazani rezultati za izomer 2 HHC, katerega predstavlja kromatografski vrh pri  $RT = 18,7$  min.

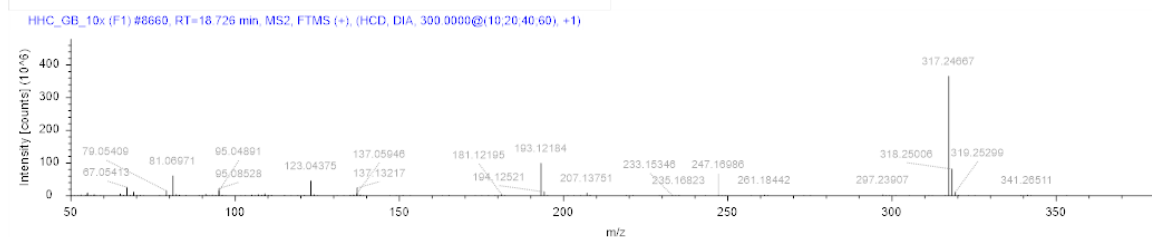
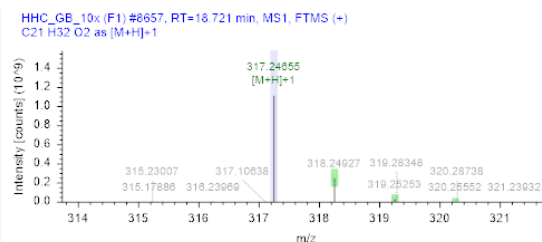
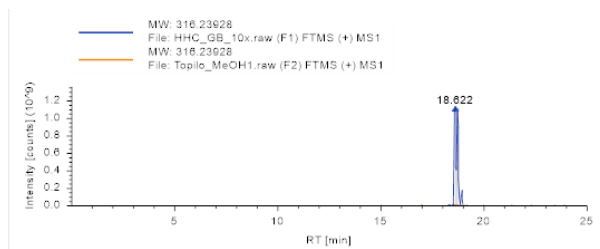
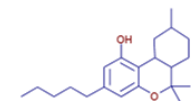
Compounds  
 05-Nov-2023 6:17

File name: HHC\_GB\_10x(1)



Study: HHC\_GB\_10x

Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Hexahydrocannabinol (HHC) (Isomer 2)	18.73	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316.23928	5.17e9

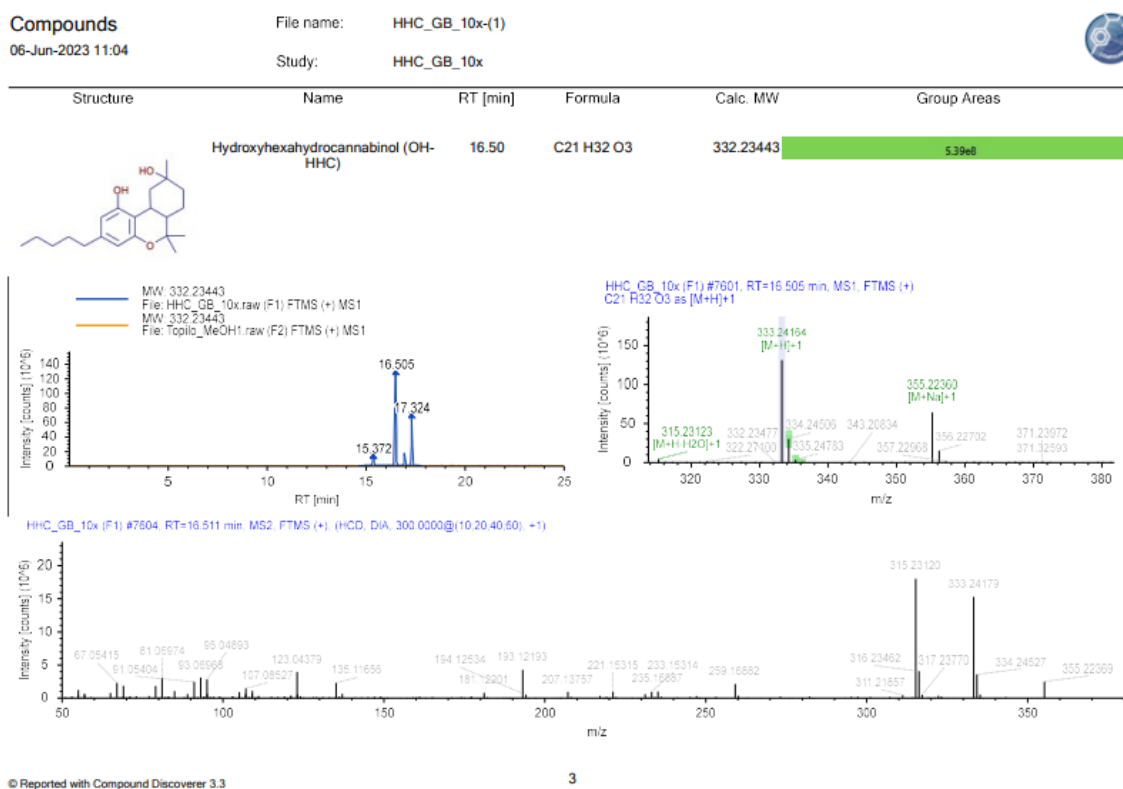


© Reported with Compound Discoverer 3.3

2

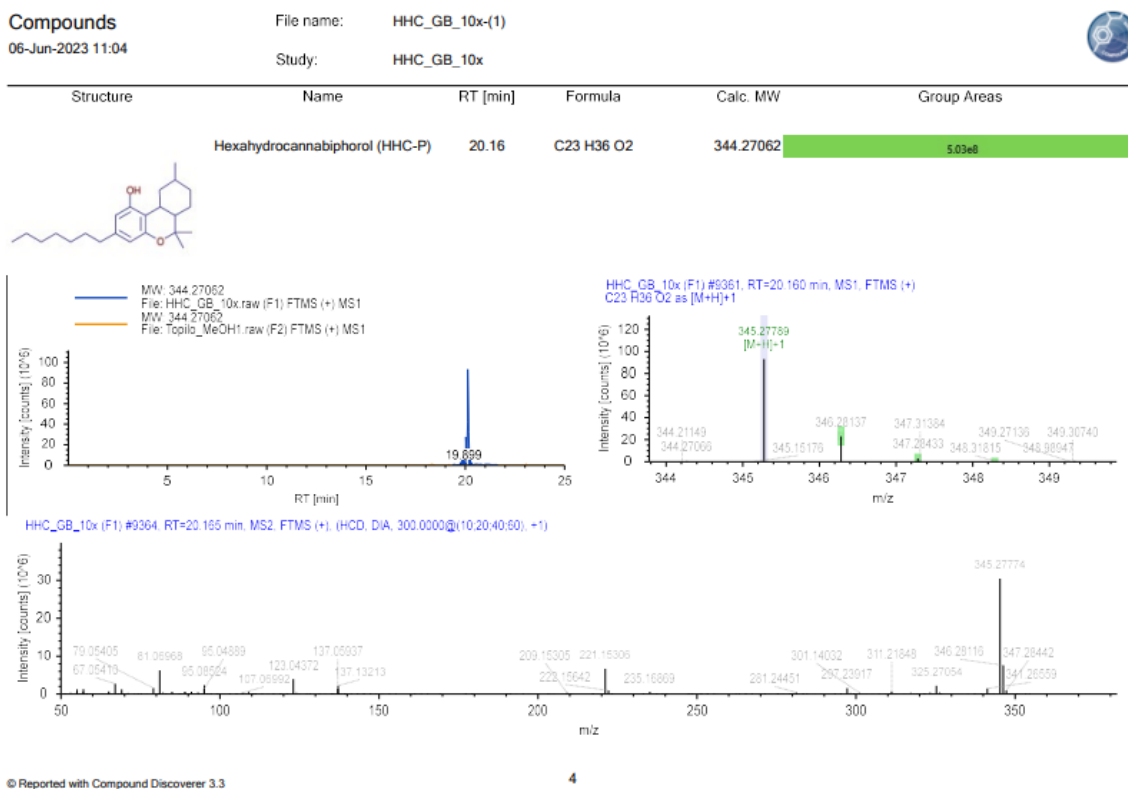
Slika 4-8: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_1, na katerem so vidni kromatografski vrhovi epimerov HHC (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri  $RT = 18,7$  min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Poleg HHC smo v vzorcu HHC\_GB\_1 identificirali tudi dva derivata HHC, in sicer OH-HHC in HHC-P. Slika 4-9 prikazuje kromatogram (zgoraj levo), na katerem so vidni štiri kromatografski vrhovi z masnim spektrom OH-HHC. Podobno kot HHC, ima tudi OH-HHC kiralne centre, kar pomeni, da obstaja več stereoizomerov OH-HHC, vendar med njihovimi masnimi spektri ni razlik. Zgoraj desno na sliki 4-9 je masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom), ki pripada kromatografskemu vrhu z največjo ploščino ( $RT = 16,5$  min). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Spodaj na sliki 4-9 je prikazan masni spekter fragmentov. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost OH-HHC v vzorcu.



Slika 4-9: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_1, na katerem so vidni kromatografski vrhovi epimerov OH-HHC (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri  $RT = 16,5$  min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Drugi izmed identificiranih derivatov HHC pa je bil HHC-P. Slika 4-10 prikazuje kromatogram (zgoraj levo), na katerem sta vidna dva kromatografska vrhova z masnim spektrom HHC-P. Ker se od HHC razlikuje le v dolžini stranske verige, se tudi HHC-P pojavlja v različnih konfiguracijah. Znani sta konfiguraciji (9S)-HHC-P in (9R)-HHC-P [17], katerih masna spektra sta enaka. Zgoraj desno na sliki 4-10 je masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom), ki pripada kromatografskemu vrhu z največjo ploščino ( $RT = 20,2$  min). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Spodaj na sliki 4-10 je prikazan masni spekter fragmentov. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost HHC-P v vzorcu.



Slika 4-10: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_1, na katerem sta vidna kromatografska vrhova epimerov HHC-P (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri  $RT = 20,2$  min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

#### 4.1.2 Vzorec HHC\_GB\_2

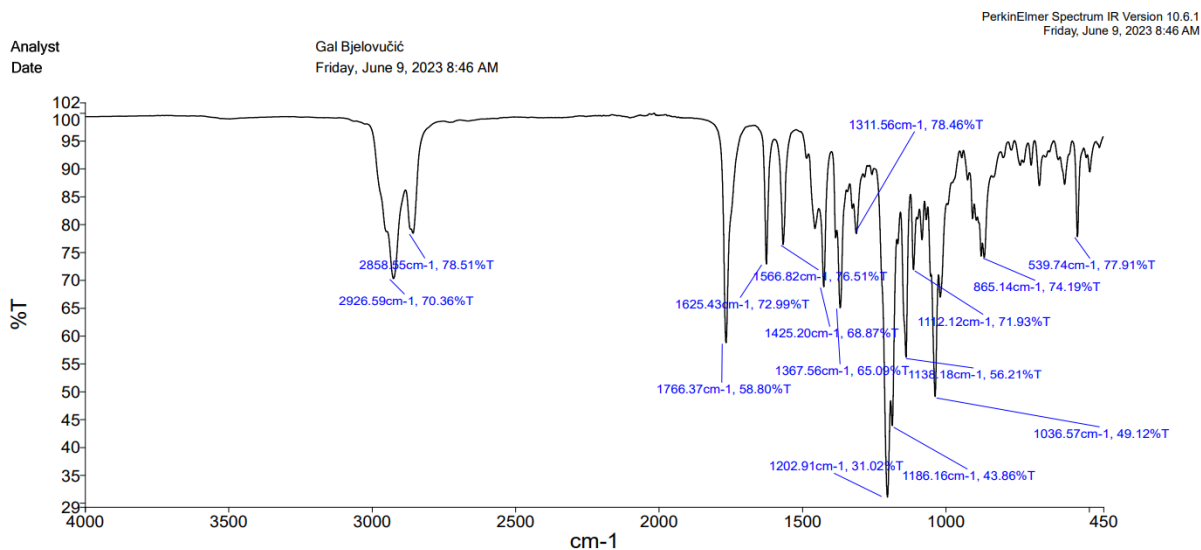
Izvedli smo analizo vzorca kartuše za e-cigareto, imenovane Amnesia, ki domnevno vsebuje HHC-O (slika 4-11). Izdelek je bil kupljen v trgovini s sedežem v Sloveniji.



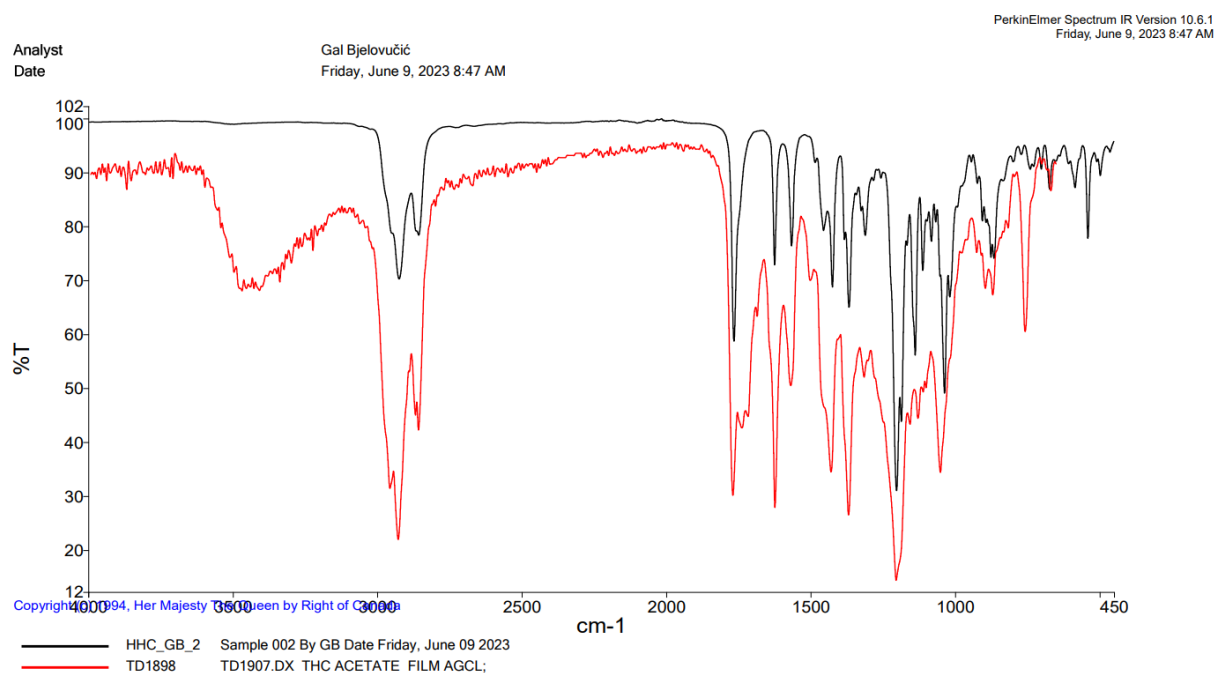
Slika 4-11: Vzorec HHC\_GB\_2.

##### 4.1.2.1 Analiza ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_2

Najprej smo izvedli analizo ATR-FTIR, ki je nakazala, da gre za drugačen tip kartuše kot pri vzorcu HHC\_GB\_1. Slika 4-12 prikazuje spekter ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_2 z označenimi najbolj intenzivnimi vrhovi, na sliki 4-13 pa je prikazana primerjava spektra vzorca (črno) s spektrom THC-acetata (rdeče), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje po primerjavi s knjižnico spektrov, in tabela desetih najvišjih ujemanj. Glede na relativno nizko ujemanje med spektroma vzorca HHC\_GB\_1 in THC-acetata (77 %) na podlagi ATR-FTIR ne moremo trditi, da vzorec vsebuje THC-acetat.



Slika 4-12: Spekter ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_2.

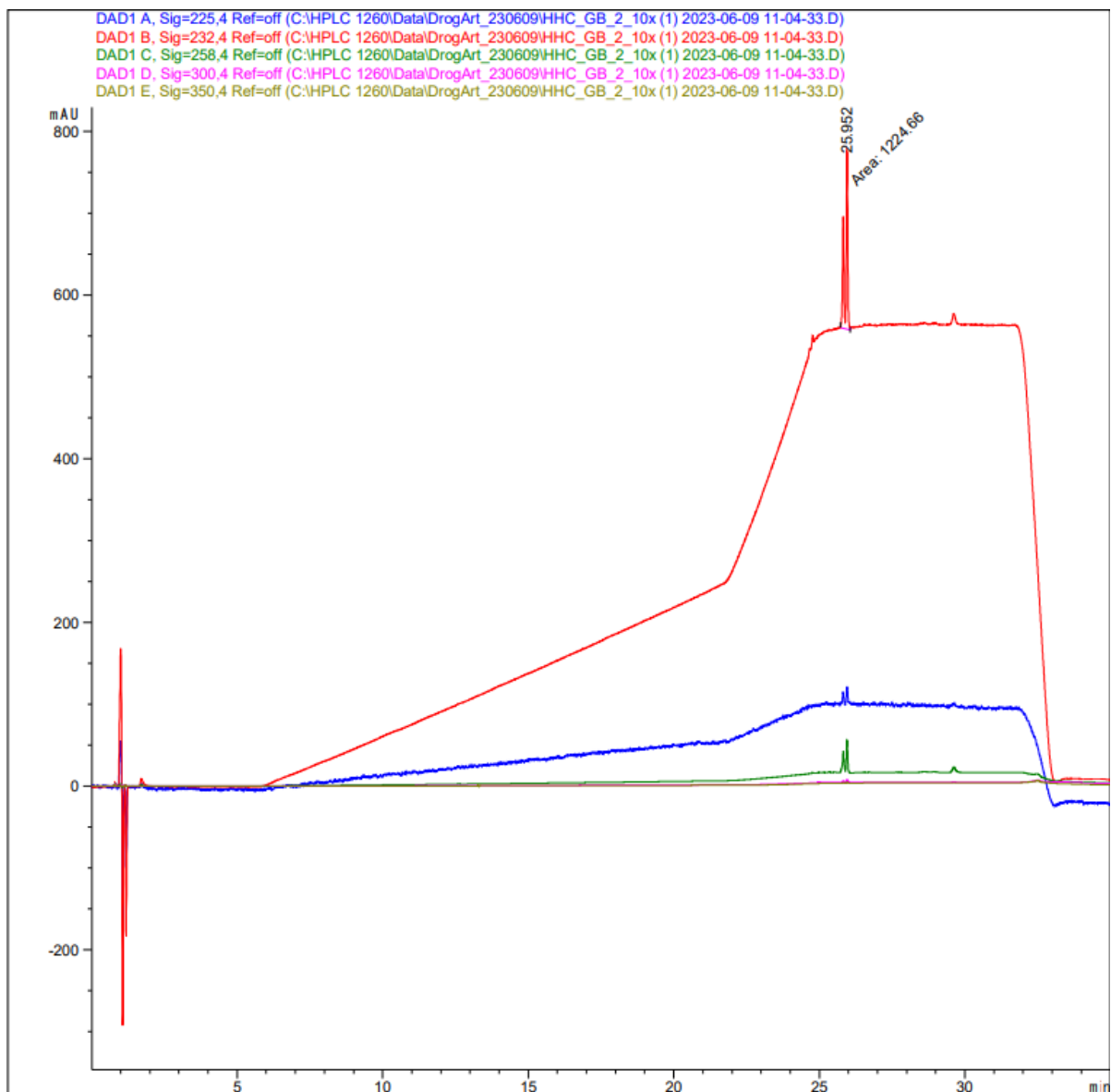


Source Spectra		
Sample Name	Search Best Hit	Search Best Hit Description
HHC_GB_2	TD1898	TD1907.DX THC ACETATE FILM AGCL;
Searched References		
Search Score	Search Reference Spectrum Description	
0.774272	TD1907.DX THC ACETATE FILM AGCL;	
0.753678	T1907.SP THC ACETATE FILM AGCL	
0.741786	T0077.SP CANNABINOL ACETATE NUJOL NACL	
0.735424	TD0077.DX CANNABINOL ACETATE NUJOL NACL; MAKOR LOT 8345	
0.708572	V05181.SP 4,4'-THIOBIS(O-CRESOL- 6-TERT-BUTYL)-, DIACETATE, 71173-06-3	
0.702451	VP2153.DX 4,4'-THIOBIS(O-CRESOL- 6-TERT-BUTYL)-, DIACETATE	
0.686759	4,4'-Thiobis(o-cresol- 6-tert-butyl)-, diacetate, 71173-06-3	
0.672774	F057.SP ESTRONE ACETATE	
0.665612	C09858.SP DL-1,1'-BI(2-NAPHTHYL DIACETATE), 100569-82-2	
0.65956	ESTRONE ACETATE	

Slika 4-13: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca HHC\_GB\_2 (črno) s spektrom HHC iz knjižnice spektrov (rdeče) in tabela desetih najvišjih ujemanj.

#### 4.1.2.2 Analiza HPLC-DAD vzorca HHC\_GB\_2

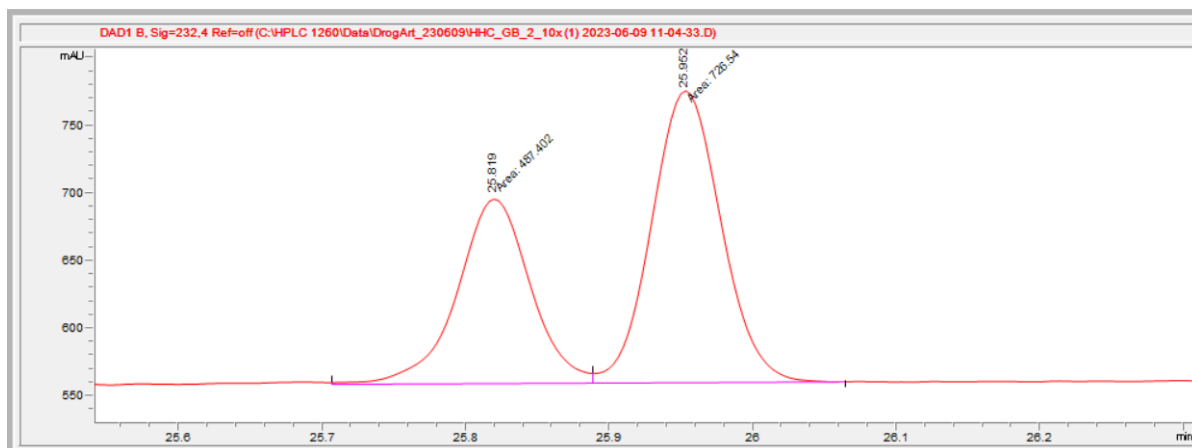
Po izvedbi analize ATR-FTIR smo naredili analizo HPLC-DAD (slika 4-14). Najbolj intenzivna sta bila vrhova pri  $RT = 25,8$  min in  $RT = 26,0$  min, ki imata enak UV-spekter, vendar s HPLC-DAD nismo določili, kateri spojini ustrežata.



Slika 4-14: Kromatogrami vzorca HHC\_GB\_2 pri  $\lambda = 225$  nm (modro),  $\lambda = 232$  nm (rdeče),  $\lambda = 258$  nm (zeleno),  $\lambda = 300$  nm (rožnato) in  $\lambda = 350$  nm (oker).

Na sliki 4-15 je prikazan približan kromatogram pri  $\lambda = 232$  nm, na katerem sta vidna kromatografska vrhova pri  $RT = 25,8$  min in  $RT = 26,0$  min.





Slika 4-15: Približan kromatogram vzorca HHC\_GB\_2 za časovni interval od 25,5 min do 26,3 min pri  $\lambda = 232$  nm.

#### 4.1.2.3 Analiza UHPLC-HRMS vzorca HHC\_GB\_2

Po izvedbi analize HPLC-DAD smo naredili analizo UHPLC-HRMS, s katero smo identificirali HHC-O. Slika 4-16 prikazuje kromatogram (zgoraj levo), na katerem sta vidna dva kromatografska vrhova z masnim spektrom HHC-O. V literaturi sta bila poročana dva epimera HHC-O: (9S)-HHC-O in (9R)-HHC-O, na podlagi česar smo sklepali, da kromatografska vrhova predstavljata omenjena epimera [16], ne moremo pa tega z gotovostjo trditi. Stereoizomeri HHC-O se razlikujejo le v konfiguraciji okrog kiralnih centrov, zato med njihovimi masnimi spektri ni razlik. Zgoraj desno na sliki 4-16 je masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom), ki pripada kromatografskemu vrhu pri  $RT = 20,2$  min (izomer 1). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Masni spekter fragmentov je prikazan spodaj na sliki 4-16. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost HHC-O v vzorcu.

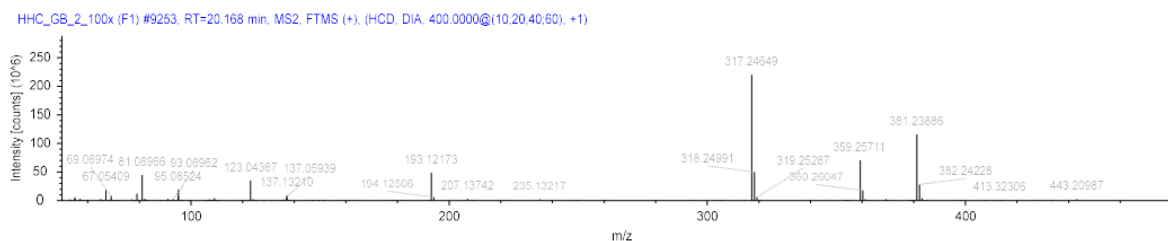
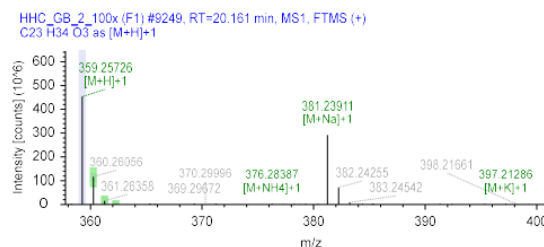
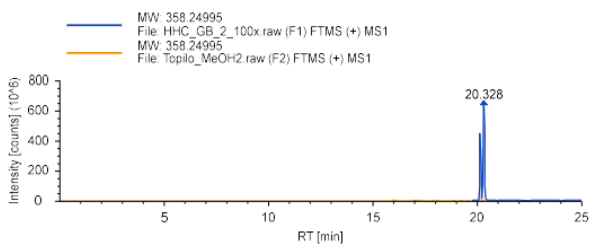
Compounds  
12-Jun-2023 2:45

File name: HHC\_GB\_2\_100x



Study: HHC\_GB\_2\_p

Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Hexahydrocannabinol acetate (HHC-O) (Isomer 1)	20.17	C23 H34 O3	358.24995	1.89e9

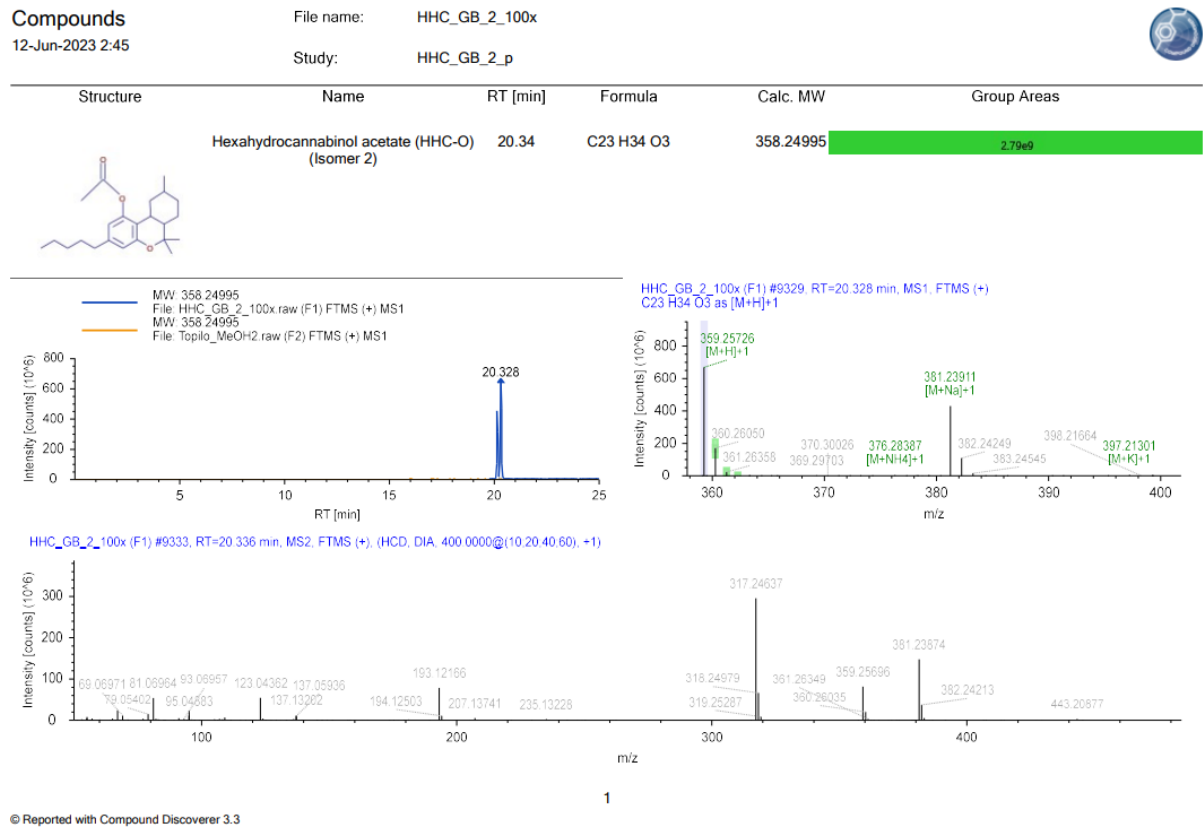


© Reported with Compound Discoverer 3.3

2

Slika 4-16: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_2, na katerem sta vidna kromatografska vrhova epimerov HHC-O (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri  $RT = 20,2$  min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

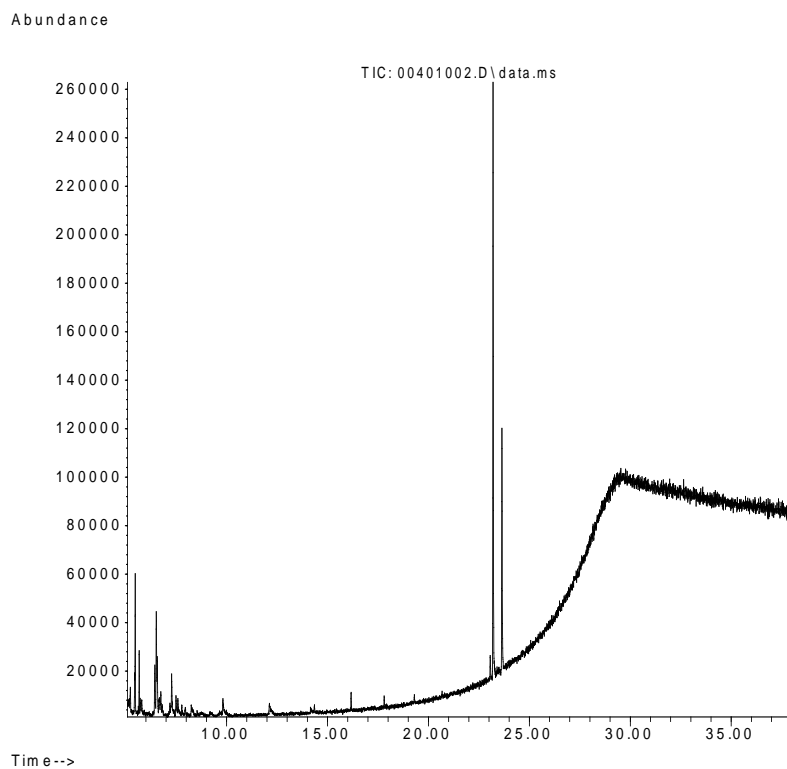
Na enak način kot za izomer 1 HHC-O, so na sliki 4-17 prikazani rezultati za izomer 2 HHC-O, katerega predstavlja kromatografski vrh pri  $RT = 20,3$  min.



Slika 4-17: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_2, na katerem sta vidna kromatografska vrhova epimerov HHC-O (zgoraj levo), masni spekter kromatografskega vrha pri  $RT = 20,3$  min (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

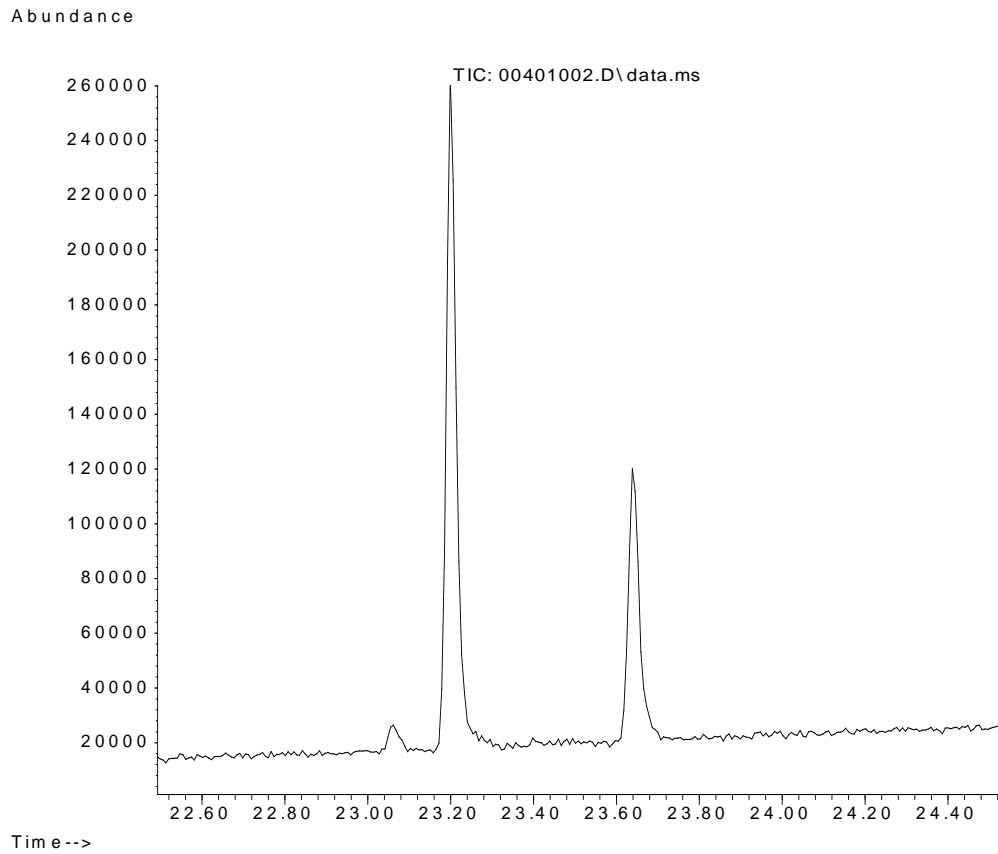
#### 4.1.2.4 Analiza GC-MS vzorca HHC\_GB\_2

Za dokončno potrditev smo izvedli analizo GC-MS. Slika 4-18 prikazuje kromatogram vzorca HHC\_GB\_2, na katerem sta bila najbolj intenzivna vrhova pri  $RT = 23,2$  min in  $RT = 23,6$  min.



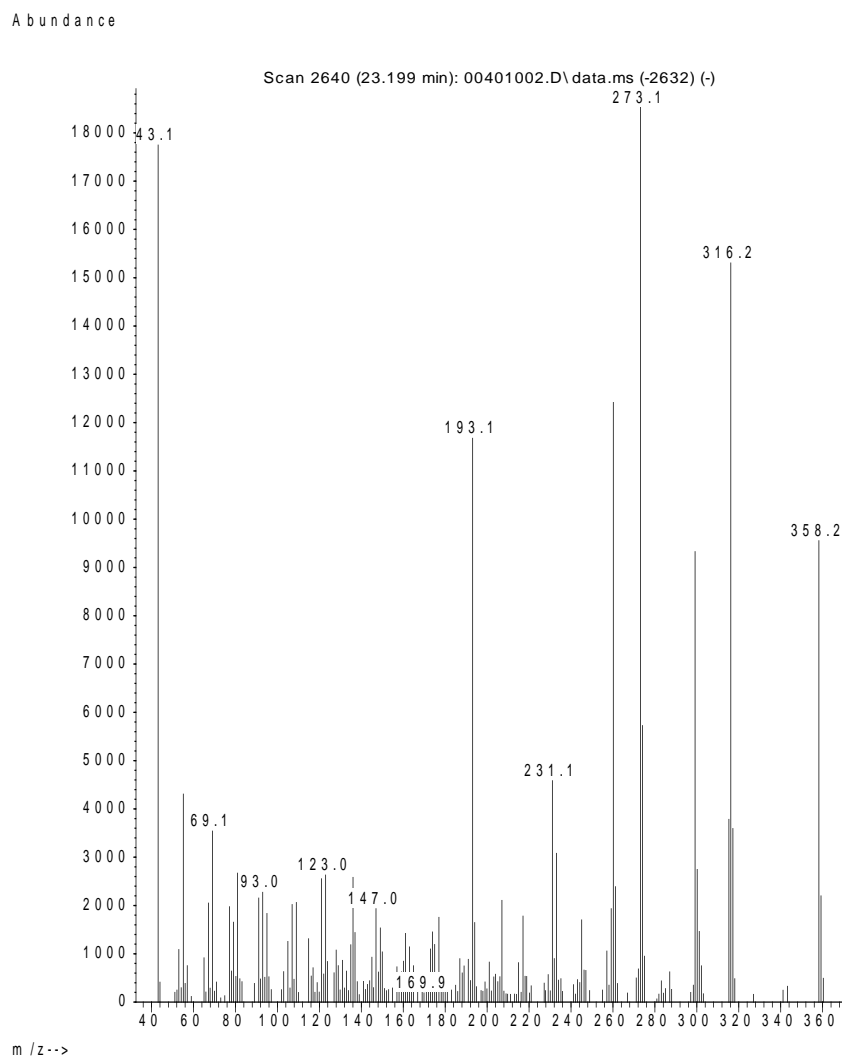
Slika 4-18: Kromatogram vzorca HHC\_GB\_2.

Na sliki 4-19 je prikazan približan kromatogram, na katerem sta vidna kromatografska vrhova pri  $RT = 23,2$  min in  $RT = 23,6$  min.

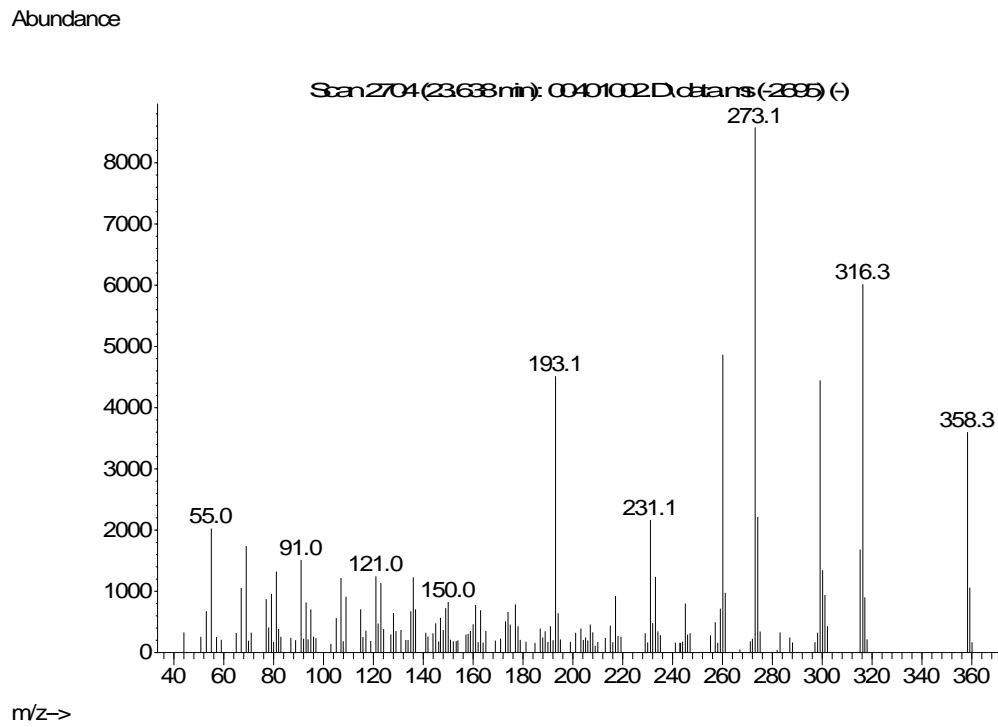


Slika 4-19: Približan kromatogram vzorca HHC\_GB\_2 za časovni interval od 22,5 min do 24,5 min.

Slika 4-20 prikazuje masni spekter pri  $RT = 23,2$  min (izomer 1), slika 4-21 pa masni spekter pri  $RT = 23,6$  min (izomer 2). Po primerjavi s spektrom iz podatkovne baze EDND smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost spojine HHC-O v vzorcu.



Slika 4-20: Masni spekter izomera 1 HHC-O ( $RT = 23,2$  min) z označenimi karakterističnimi vrhovi.



Slika 4-21: Masni spekter izomera 2 HHC-O ( $RT = 23,6$  min) z označenimi karakterističnimi vrhovi.

## 4.2 Analiza prehranskih dopolnil

Analizirali smo 58 vzorcev prehranskih dopolnil. Med njimi so bila prehranska dopolnila za izboljšanje spolne moči pri moških, za hujšanje, športna prehranska dopolnila ter dodatki za krepitev imunskega sistema. Skupno smo identificirali 37 različnih organskih spojin (tabela 4-2 in tabela 4-3).

Tabela 4-2: Vitamini, identificirani v različnih tipih prehranskih dopolnil.

VITAMIN	DRUGO IME	RT (HPLC-DAD) [min]	RT (UHPLC-HRMS) [min]	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>
C	askorbinska kislina	1,1	0,8	/	175,0248
B <sub>1</sub>	tiamin	/	0,8	265,1110	/
B <sub>6</sub>	piridoksin	/	1,1	170,0812	/
B <sub>3</sub>	niacin/niacinska kislina	/	1,1	124,0393	/
	fragment 1	/	1,1	80,0495	/
	fragment 2	/	1,1	96,0444	/
B <sub>5</sub>	pantotenska kislina	/	3,3	220,1171	/
B <sub>9</sub>	folna kislina	/	4,0	/	440,1324
B <sub>7</sub>	biotin	/	4,2	/	243,0809
B <sub>2</sub>	riboflavin	5,2	4,3	377,1455	/
E acetat	tokoferol acetat	/	22,8	473,3979	/
D <sub>3</sub>	holkalciferol	/	23,4	385,3465	/
E	tokoferol	/	23,5	/	429,3731

Tabela 4-3: Organske spojine, identificirane v različnih tipih prehranskih dopolnil.

SPOJINA	RT (HPLC-DAD) [min]	RT (UHPLC-HRMS) [min]	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>
tavrin	/	0,7	126,0219	/
arginin	/	0,7	175,1190	/
alanin	1,0	0,7	90,0550	/
trehaloza	/	0,7	/	341,1089
glutamin	/	0,7	147,0764	/
mlečna kislina	/	0,7	/	89,0244
karnitin	/	0,7	162,1125	/
kreatin	/	0,8	132,0768	/
vinska kislina	/	0,8	/	149,0092
citronska kislina	2,1	1,1	/	191,0194
acesulfam	3,0	1,4	/	161,9863
levcin	/	1,5	132,1019	/
paraksantin	/	3,4	181,0717	/
ciklamna kislina	/	3,5	/	178,0540



epigalokatehin galat	/	4,0	/	457,0771
katehin	/	4,1	/	289,0718
kofein	4,5	4,2	195,0877	/
vanilin	5,4	4,4	153,0544	/
aspartam	/	4,4	295,1289	/
naringin	/	5,0	581,1865	/
naringenin	/	5,1	273,0757	/
hesperidin	/	5,2	/	609,1825
sildenafil	7,9	7,1	475,2122	/
2-hidroksipropil nortadalafil	8,8	8,3	434,1711	/
sibutramin	8,8	8,8	280,1827	/
kapsaicin	/	11,4	306,2064	/
piperin	/	11,7	286,1433	/

Za analizo vseh vzorcev smo uporabili opisane metode. Predstavljeni so rezultati analize vzorcev PD29, PD30 in PD\_LA\_3.

#### 4.2.1 Vzorec PD29

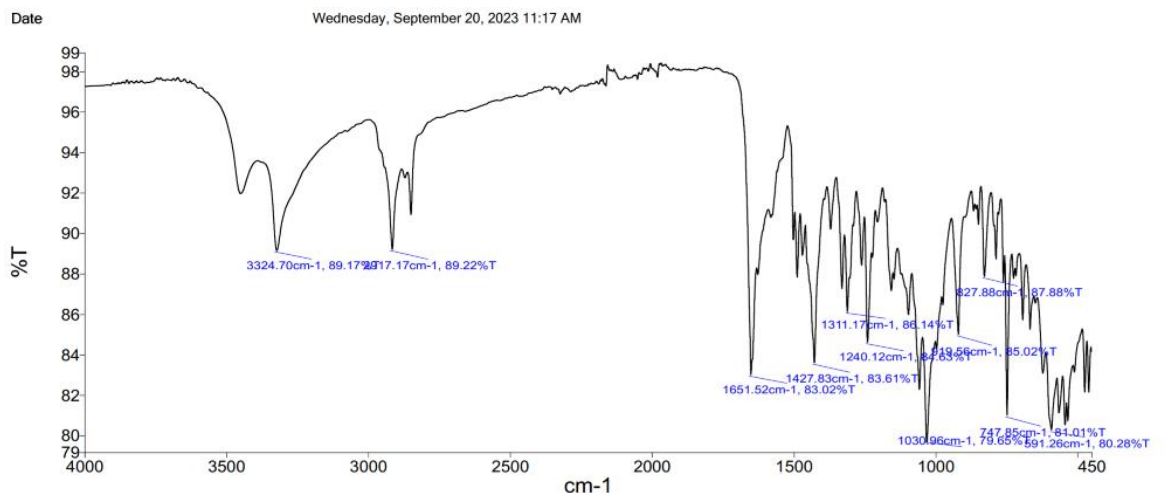
Izvedli smo analizo kapsule, imenovane LibiForMe, namenjene izboljšanju spolne moči pri moških (slika 4-22). Na embalaži je bilo navedeno, da naj bi kapsula vsebovala izključno naravne sestavine. Izdelek je bil kupljen v spletni trgovini s sedežem v Sloveniji.



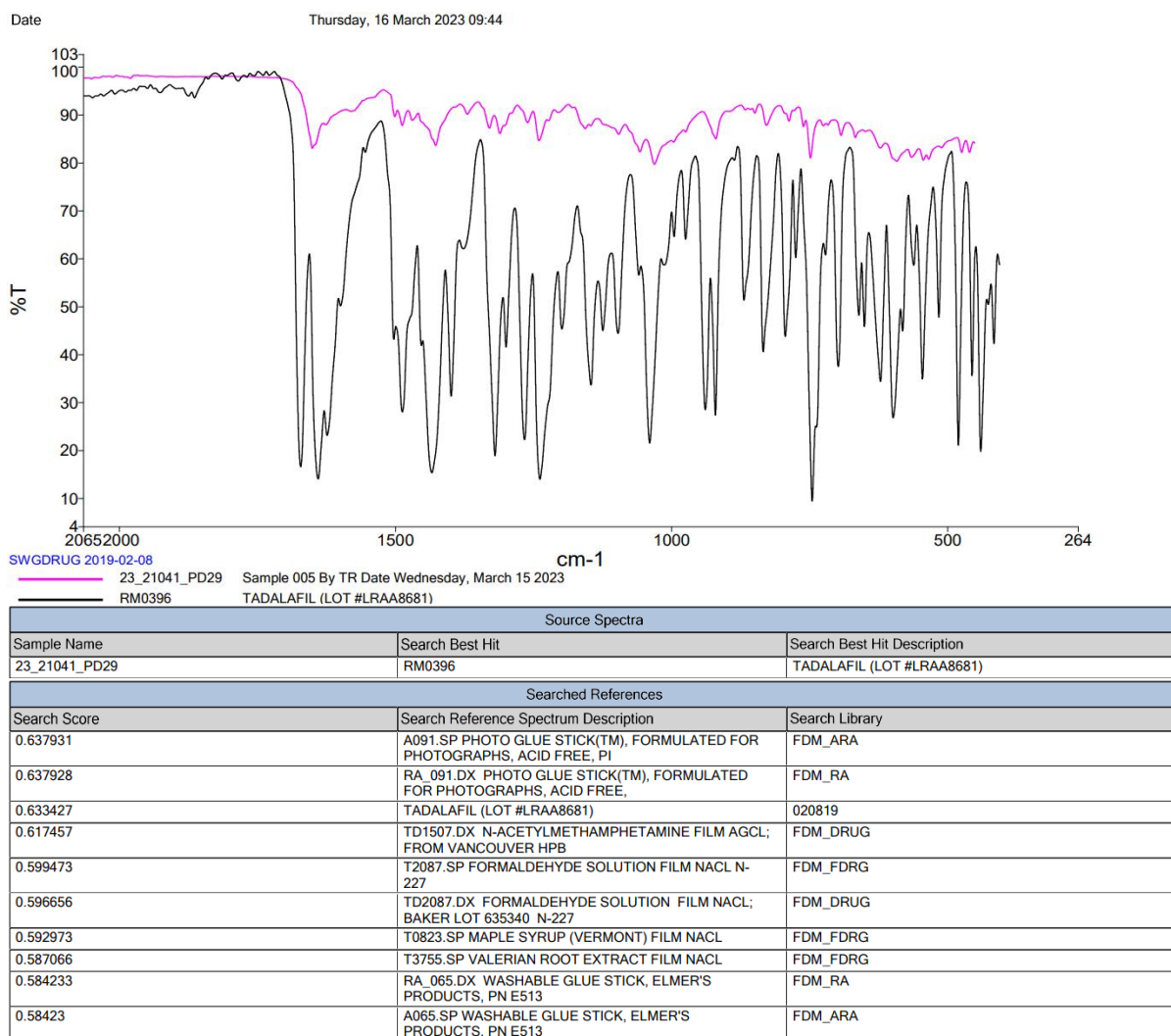
Slika 4-22: Vzorec PD29 [55].

##### 4.2.1.1 Analiza ATR-FTIR vzorca PD29

Najprej smo naredili analizo ATR-FTIR, ki je nakazala na možnost prisotnosti tadalafil v vzorcu. Slika 4-23 prikazuje spekter ATR-FTIR vzorca PD29 z označenimi najbolj intenzivnimi vrhovi, na sliki 4-24 pa je prikazana primerjava spektra vzorca (rožnato) s spektrom tadalafil (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj. Glede na relativno nizko ujemanje med spektroma vzorca PD29 in tadalafil (63 %) na podlagi ATR-FTIR ne moremo trditi, da vzorec vsebuje tadalafil.



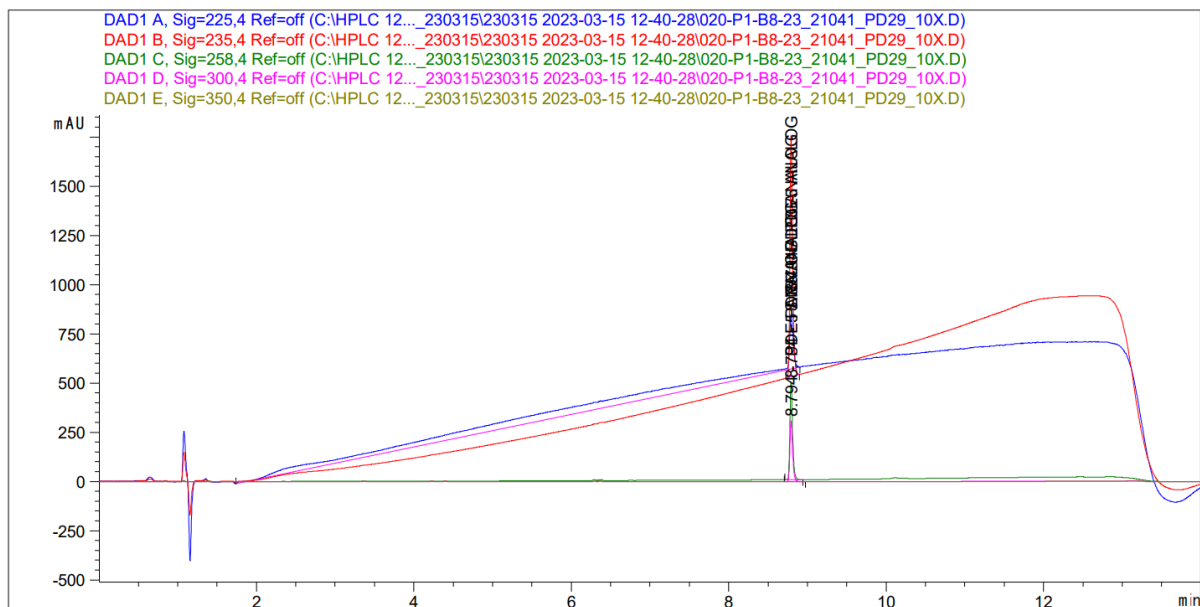
Slika 4-23: Spekter ATR-FTIR vzorca PD29.



Slika 4-24: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca PD29 (rožnato) s spektrom tadalafila (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj.

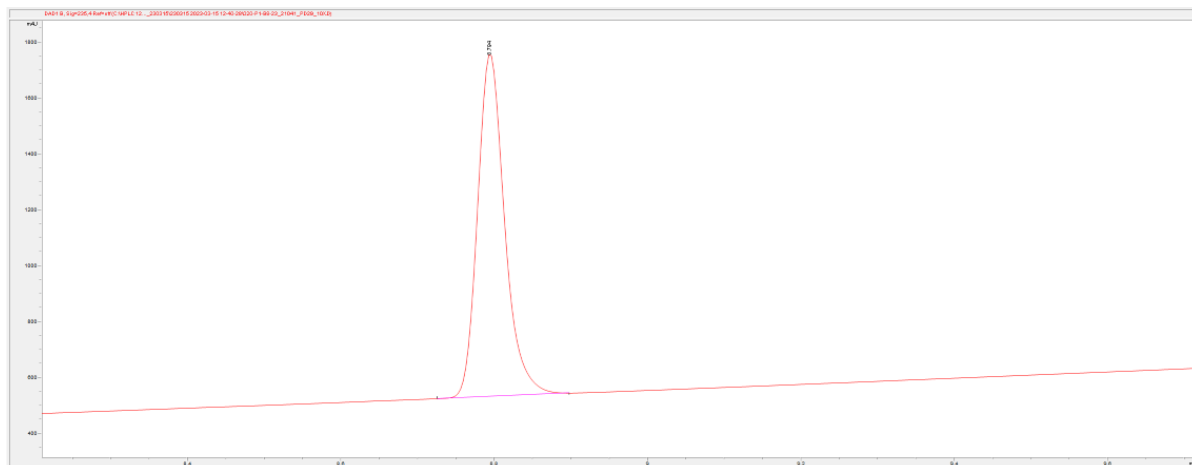
#### 4.2.1.2 Analiza HPLC-DAD vzorca PD29

Po izvedbi analize ATR-FTIR smo naredili analizo HPLC-DAD (slika 4-25). Edini prisoten vrh je bil pri  $RT = 8,8$  min, katerega UV-spekter se ujema z UV-spektrom tadalafila (slika 4-27).



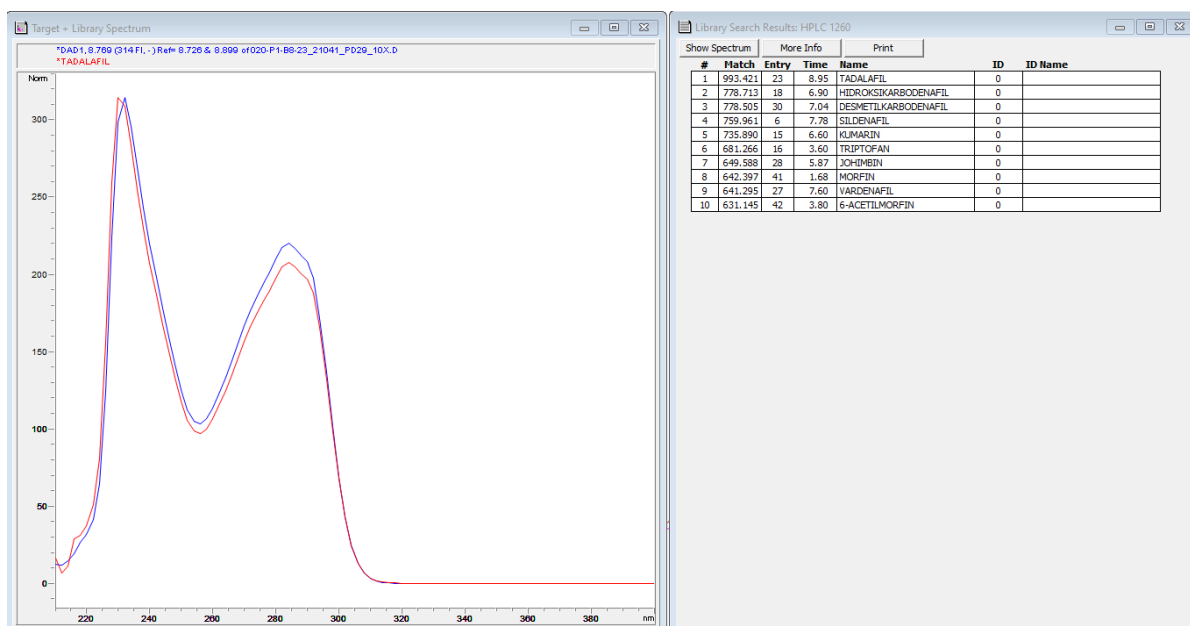
Slika 4-25: Kromatogrami vzorca PD29 pri  $\lambda = 225$  nm (modro),  $\lambda = 235$  nm (rdeče),  $\lambda = 258$  nm (zeleno),  $\lambda = 300$  nm (rožnato) in  $\lambda = 350$  nm (oker).

Na sliki 4-26 je prikazan približan kromatogram pri  $\lambda = 235$  nm, na katerem je viden kromatografski vrh pri  $RT = 8,8$  min.



Slika 4-26: Približan kromatogram vzorca PD29 za časovni interval od 8,3 min do 9,6 min pri  $\lambda = 235$  nm.

Slika 4-27 prikazuje primerjavo UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 8,8$  min (modro) in UV-spektra tadalafila iz knjižnice spektrov (rdeče), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje, in tabelo 10 najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.



Slika 4-27: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 8,8$  min (modro) in UV-spektra tadalafila iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.

#### 4.2.1.3 Analiza UHPLC-HRMS vzorca PD29

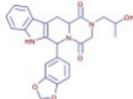
Kot potrditveno analizno tehniko smo uporabili UHPLC-HRMS, s katero smo identificirali derivat tadalafila, imenovan 2-hidroksipropil nortadalafil. Slika 4-28 prikazuje kromatogram (zgoraj levo), na katerem je viden kromatografski vrh identificirane spojine ( $RT = 8,3$  min). Zgoraj desno na sliki 4-28 je pripadajoč masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Masni spekter fragmentov je prikazan spodaj na sliki 4-28. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost 2-hidroksipropil nortadalafila v vzorcu.

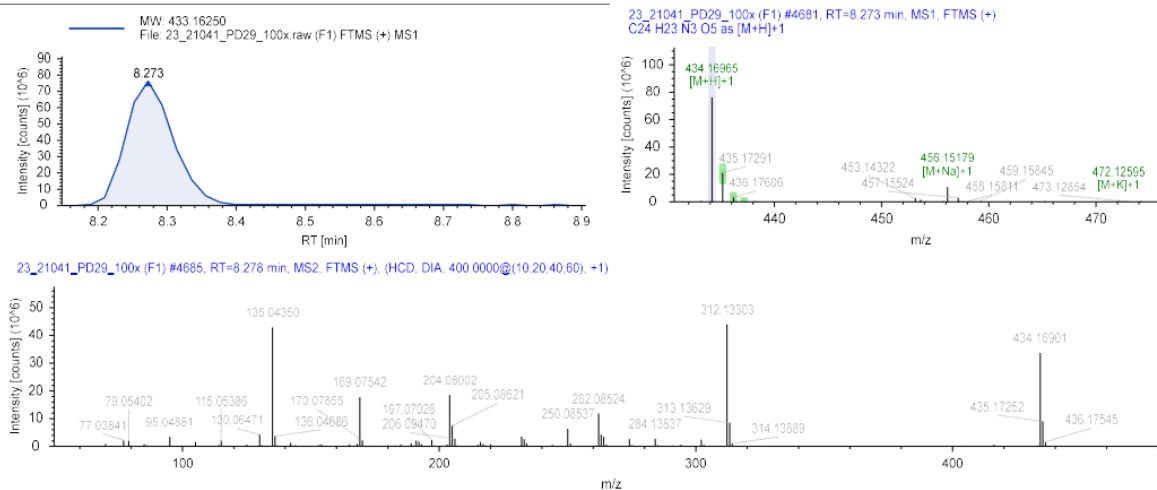
Compounds  
 16-Mar-2023 8:02

File name: 23\_21041\_PD29\_100x

Study: 23\_21041\_PD29



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	2-Hydroxypropyl nortadalafil	8.27	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	433.16250	n/a



1

© Reported with Compound Discoverer 3.3

Slika 4-28: Kromatogram vzorca PD29, na katerem je viden kromatografski vrh 2-hidroksipropil nortadalafila (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

2-hidroksipropil nortadalafil je derivat zaviralca PDE5, ki se nezakonito dodaja izdelkom za izboljšanje spolne moči. Analiziran izdelek je bil kasneje zaradi prisotnosti nedovoljene učinkovine s strani Zveze potrošnikov Slovenije (ZPS) odpoklican iz prodaje.

## 4.2.2 Vzorec PD30

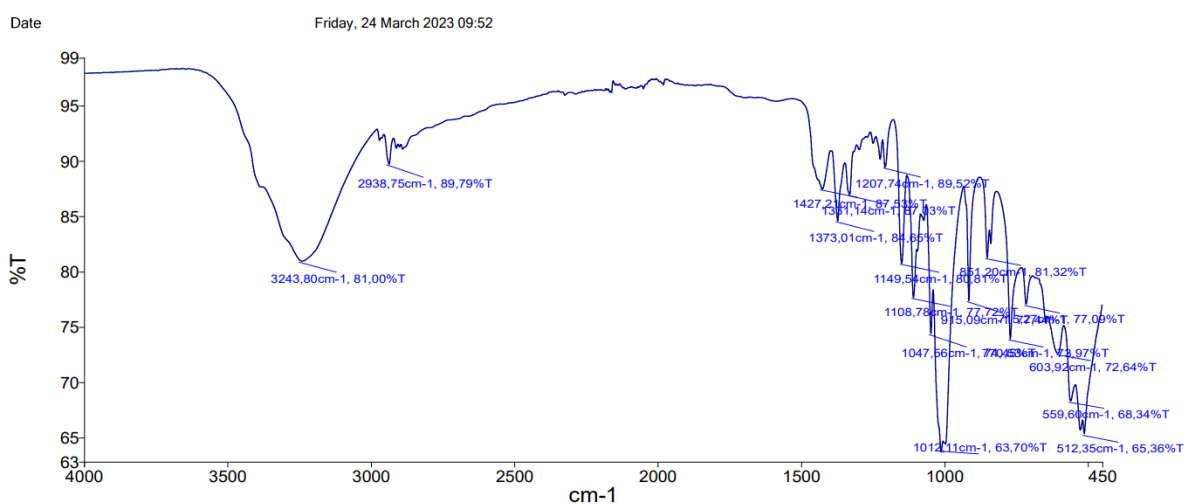
Izvedli smo analizo čaja, imenovanega TrexTea, ki je namenjen hujšanju (slika 4-29). Na embalaži je bilo navedeno, da naj bi čaj vseboval izključno naravne sestavine. Izdelek je bil kupljen v spletni trgovini s sedežem v Sloveniji.



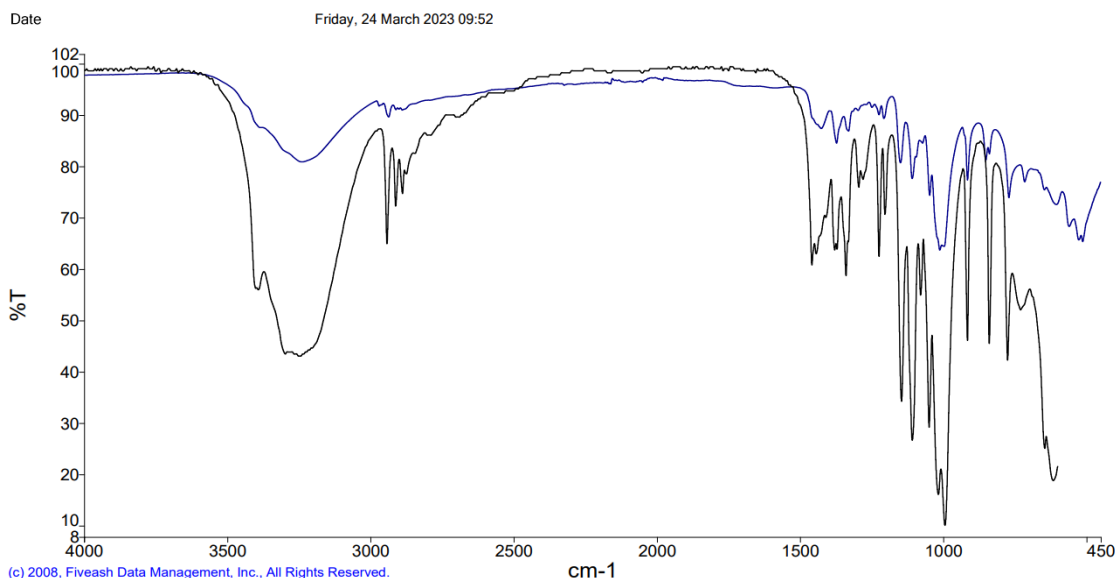
Slika 4-29: Vzorec PD30 [56].

### 4.2.2.1 Analiza ATR-FTIR vzorca PD30

Najprej smo naredili analizo ATR-FTIR, ki je nakazala na prisotnost glukoze, najverjetneje uporabljene kot polnilo. Slika 4-30 prikazuje spekter ATR-FTIR vzorca PD30 z označenimi najbolj intenzivnimi vrhovi, na sliki 4-31 pa je prikazana primerjava spektra vzorca (modro) s spektrom glukoze (črno), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje po primerjavi s knjižnico spektrov, in tabela desetih najvišjih ujemanj.



Slika 4-30: Spekter ATR-FTIR vzorca PD30.

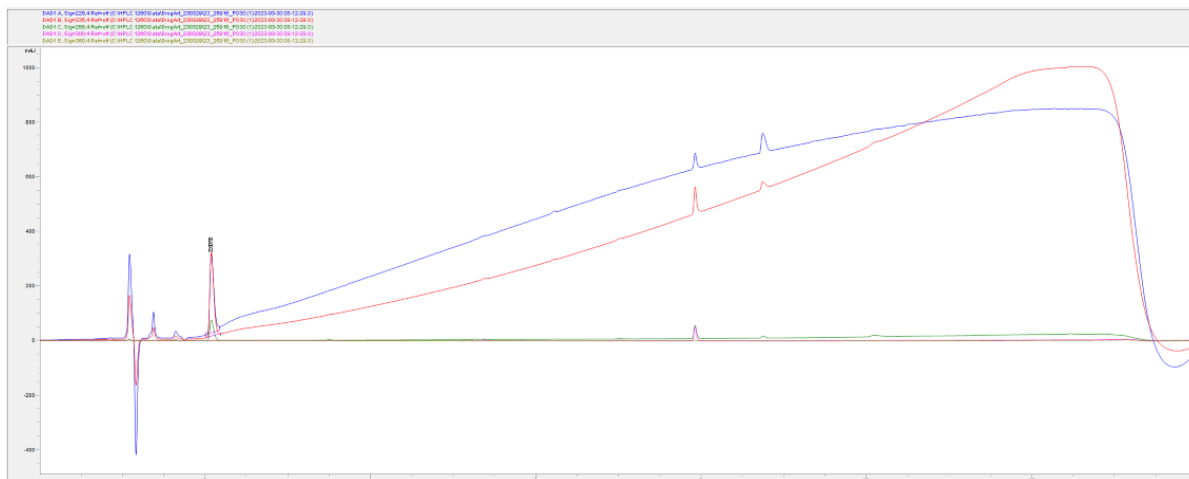


Source Spectra		
Sample Name	Search Best Hit	Search Best Hit Description
23_25916	AO0095	O0104.SP D-GLUCOSE, 50-99-7
Searched References		
Search Score	Search Reference Spectrum Description	Search Library
0.898573	O0104.SP D-GLUCOSE, 50-99-7	FDM_AOR
0.849119	DEXTROSE ANHYDROUS (LOT #30K0208)	020819
0.839935	O0366.SP FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE-DEXTRAN	FDM_AOR
0.833768	O0325.SP DEXTRAN, MW=497,000	FDM_AOR
0.824824	O0257.SP SEPHADEX G-50, 9048-71-9	FDM_AOR
0.819393	D011.DX BLUE DEXTRIN 2000	FDM_DYE
0.819393	DY011.SP BLUE DEXTRIN 2000	FDM_DYES
0.813436	ADRG_033.SP CORN STARCH NS	FDM_ATRD
0.812259	DEXTROSE NUJOL NACL	FDM FTIR Drugs
0.803975	OR0544.DX D-GLUCOSE	FDMORGNC

Slika 4-31: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca PD30 (modro) s spektrom glukoze (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj.

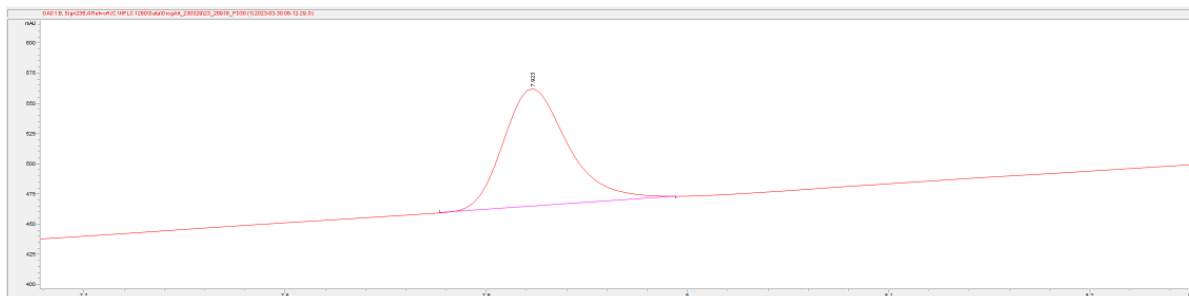
#### 4.2.2.2 Analiza HPLC-DAD vzorca PD30

Po izvedbi analize ATR-FTIR smo naredili analizo HPLC-DAD. Najbolj intenzivni so bili vrhovi pri  $RT = 2,1$  min (citronska kislina), pri  $RT = 7,9$  min, katerega UV-spekter se ujema z UV-spektrinom sildenafilu, in pri  $RT = 8,7$  min, katerega UV-spekter se ujema z UV-spektrinom sibutraminu (slika 4-32).



Slika 4-32: Kromatogrami vzorca PD30 pri  $\lambda = 225$  nm (modro),  $\lambda = 235$  nm (rdeče),  $\lambda = 258$  nm (zeleno),  $\lambda = 300$  nm (rožnato) in  $\lambda = 350$  nm (oker).

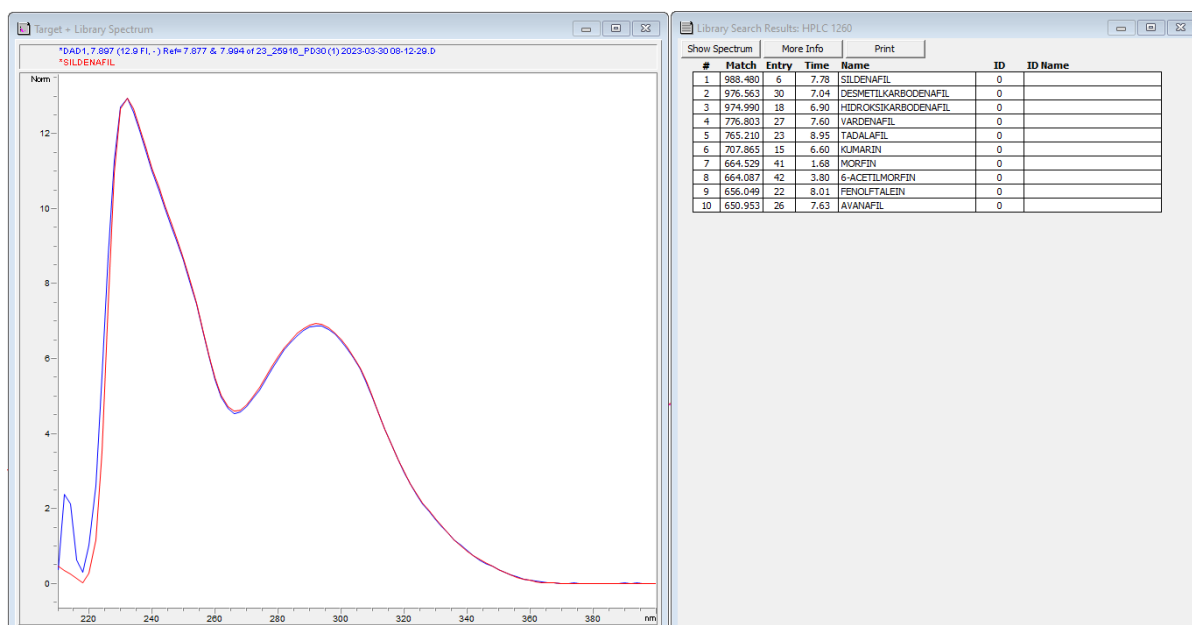
Na sliki 4-33 je prikazan približen kromatogram pri  $\lambda = 235$  nm, na katerem je viden kromatografski vrh pri  $RT = 7,9$  min.



Slika 4-33: Približen kromatogram vzorca PD29 za časovni interval od 7,7 min do 8,2 min pri  $\lambda = 235$  nm.

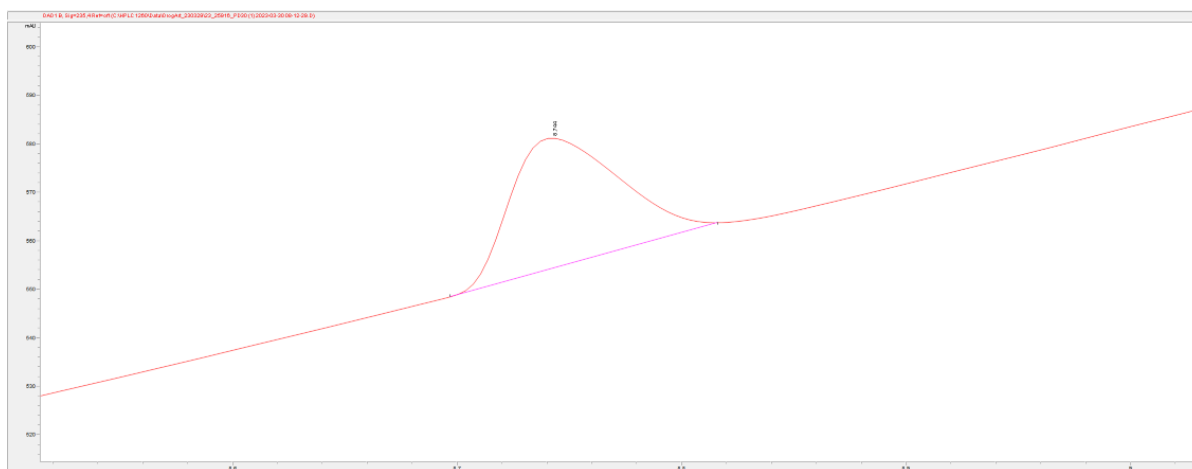
Slika 4-34 prikazuje primerjavo UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 7,9$  min (modro) in UV-spektra sildenafilu iz knjižnice spektrov (rdeče), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje, in tabelo 10 najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.





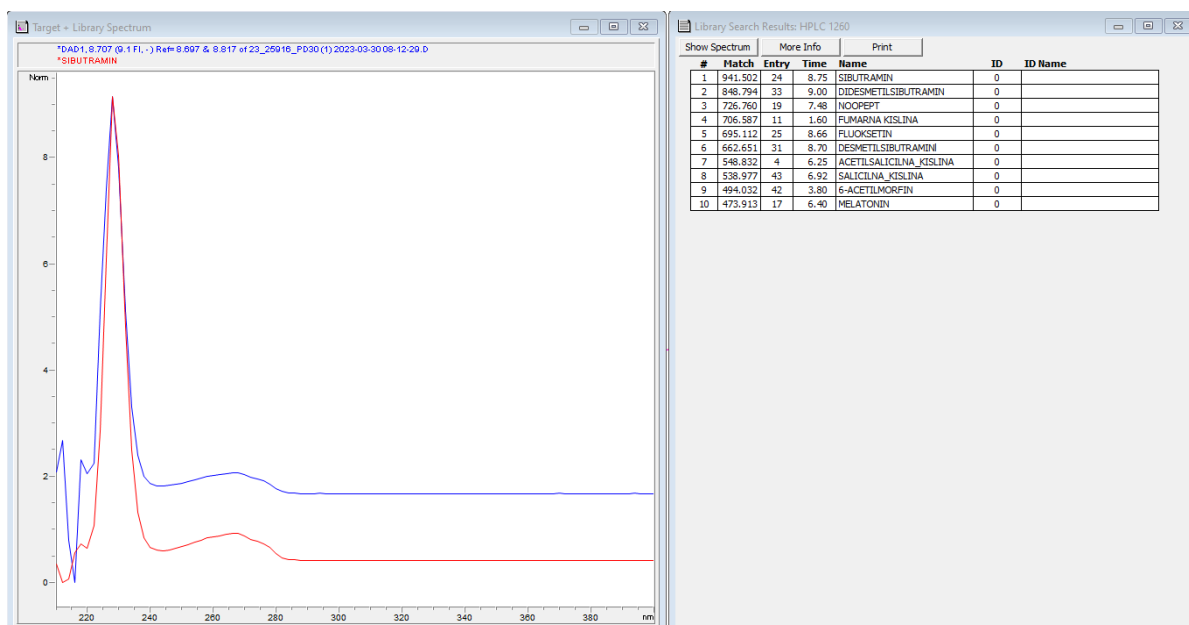
Slika 4-34: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 7,9$  min (modro) in UV-spektra sildenafilu iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.

Na sliki 4-35 je prikazan približen kromatogram pri  $\lambda = 235$  nm, na katerem je viden kromatografski vrh pri  $RT = 8,7$  min.



Slika 4-35: Približen kromatogram vzorca PD29 za časovni interval od 8,5 min do 9,0 min pri  $\lambda = 235$  nm.

Slika 4-36 prikazuje primerjavo UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 8,7$  min (modro) in UV-spektra sibutramina iz knjižnice spektrov (rdeče), za katerega je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje, in tabelo 10 najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.




Slika 4-36: Primerjava UV-spektra kromatografskega vrha pri  $RT = 8,7$  min (modro) in UV-spektra sibutramina iz knjižnice spektrov (rdeče). Priložena je tabela desetih najvišjih ujemanj iz knjižnice spektrov.

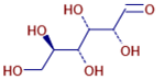

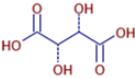
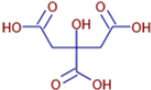
#### 4.2.2.3 Analiza UHPLC-HRMS vzorca PD30

Kot potrditveno analizo tehniko smo uporabili UHPLC-HRMS, s katero smo identificirali devet organskih spojin, med katerimi sta bila tudi sildenafil in sibutramin. Na slikah od 4-37 do 4-39 je prikazan seznam vseh identificiranih spojin v vzorcu, skupaj z njihovimi strukturnimi in molekulskimi formulami,  $RT$  ter molekulskimi masami.

Compounds  
05-Nov-2023 6:06

File name: 23\_25916\_PD30\_100x  
Study: 23\_25916\_PD30



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	D-(+)-Glucose	0.72	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.06304	n/a
	DL-Lactic Acid	0.73	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	90.03169	n/a
	L-(+)-Tartaric acid	0.78	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	150.01651	n/a
	Citric acid	1.09	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192.02705	n/a


1

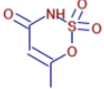
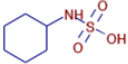
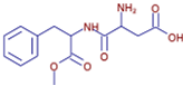
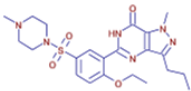
© Reported with Compound Discoverer 3.3

Slika 4-37: Seznam spojin, identificiranih z metodo UHPLC-HRMS v vzorcu PD30 (1/3).

Compounds  
05-Nov-2023 6:06

File name: 23\_25916\_PD30\_100x  
Study: 23\_25916\_PD30

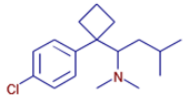


Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Acesulfame	1.43	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>0</sub> O <sub>4</sub> S	162.99393	n/a
	Cyclamic acid	3.46	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>0</sub> O <sub>3</sub> S	179.06154	n/a
	Aspartame	4.35	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	294.12117	n/a
	Sildenafil	7.11	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	474.20403	n/a

2

© Reported with Compound Discoverer 3.3

Slika 4-38: Seznam spojin, identificiranih z metodo UHPLC-HRMS v vzorcu PD30 (2/3).

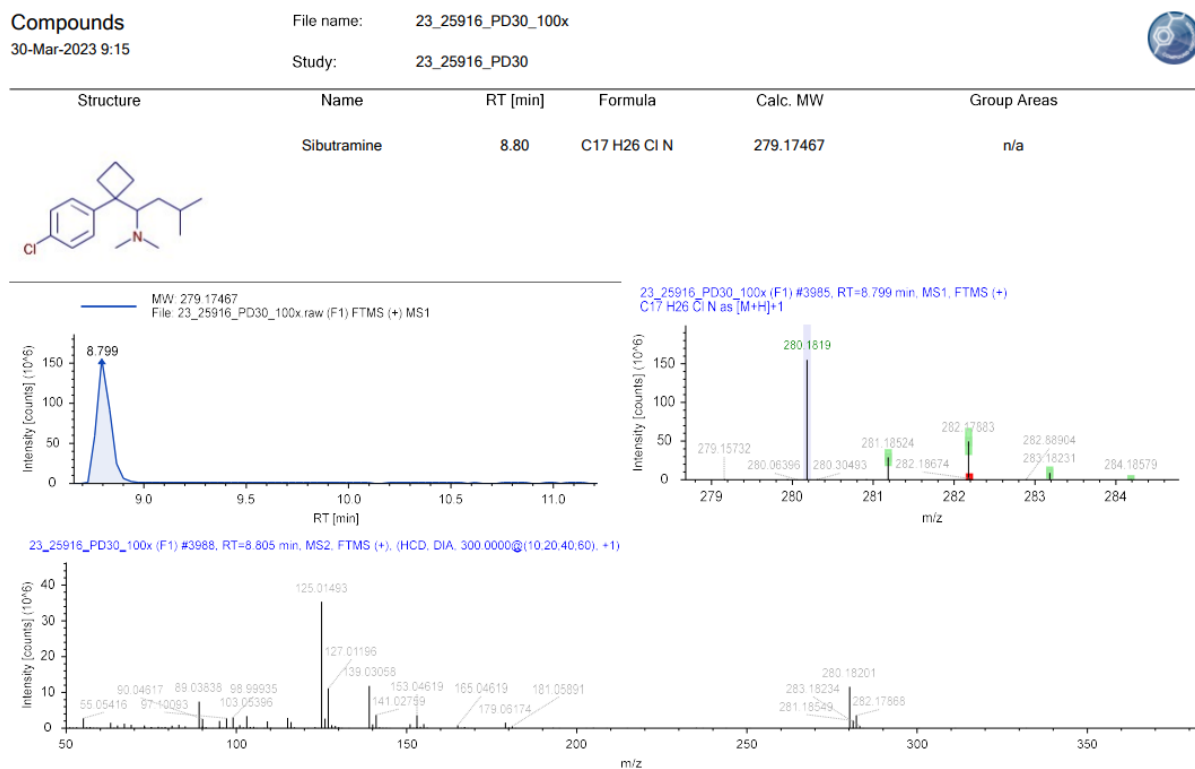
Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Sibutramine	8.80	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> ClN	279.17467	n/a

© Reported with Compound Discoverer 33

3

Slika 4-39: Seznam spojin, identificiranih z metodo UHPLC-HRMS v vzorcu PD30 (3/3).

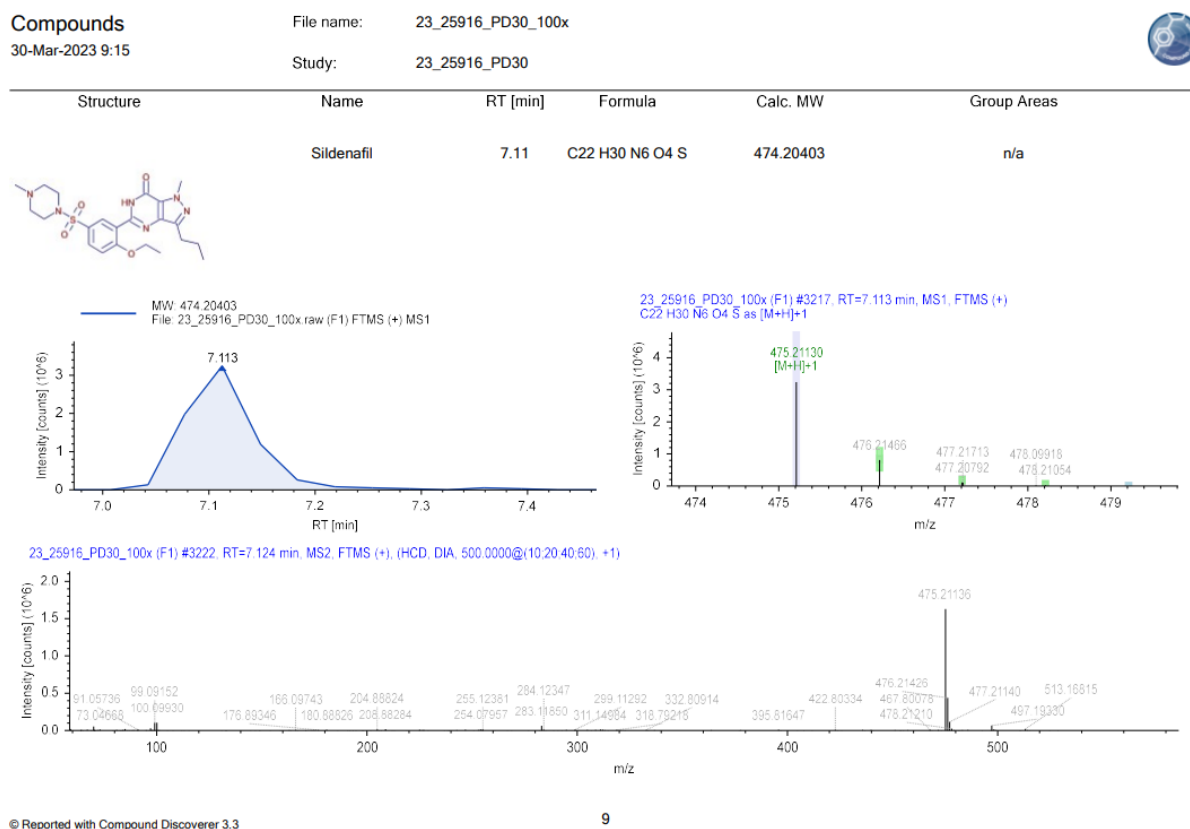
Slika 4-40 prikazuje kromatogram (zgoraj levo), na katerem je viden kromatografski vrh sibutramina ( $RT = 8,8$  min). Zgoraj desno na sliki 4-40 je pripadajoč masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Masni spekter fragmentov je prikazan spodaj na sliki 4-40. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost sibutramina v vzorcu.



© Reported with Compound Discoverer 3.3

Slika 4-40: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh sibutramina (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Na enak način kot za sibutramin, so na sliki 4-41 prikazani rezultati za sildenafil, katerega predstavlja kromatografski vrh pri  $RT = 7,1$  min.



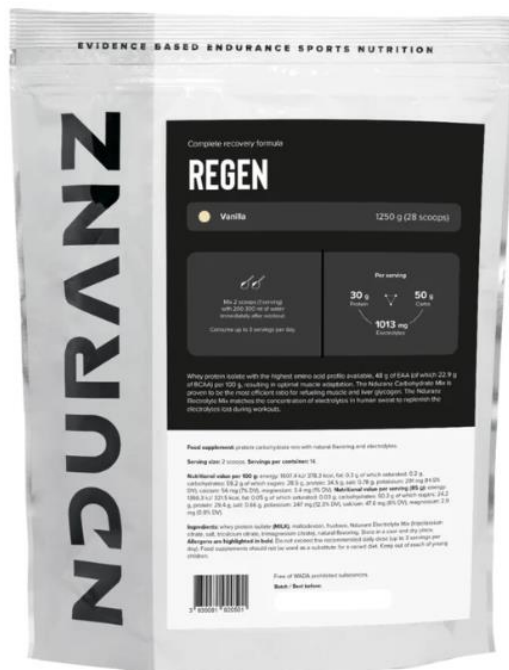
Slika 4-41: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh sildenafil (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Sibutramin spada med zaviralce apetita – zdravila, ki se uporabljajo pri zdravljenju debelosti, sildenafil pa je zaviralec PDE5. Analiziran izdelek je bil kasneje zaradi prisotnosti nedovoljenih učinkovin s strani ZPS odpoklican iz prodaje.

Rezultati analize UHPLC-HRMS za ostale identificirane spojine v vzorcu PD30 so predstavljeni v prilogi (od slike 7-1 do slike 7-7).

### 4.2.3 Vzorec PD\_LA\_3

Izvedli smo analizo regeneracijskega napitka, imenovanega Regen, ki namenjen uporabi v športu kot vir beljakovin in ogljikovih hidratov (slika 4-42). Na embalaži je bilo navedeno, da naj bi napitek vseboval izolat beljakovin sirotke, maltodekstrin, fruktozo, kakav v prahu, natrijev klorid, kalijev citrat, kalcijev citrat, magnezijev citrat in naravno aromo. Izdelek je bil kupljen v spletni trgovini s sedežem v Sloveniji.



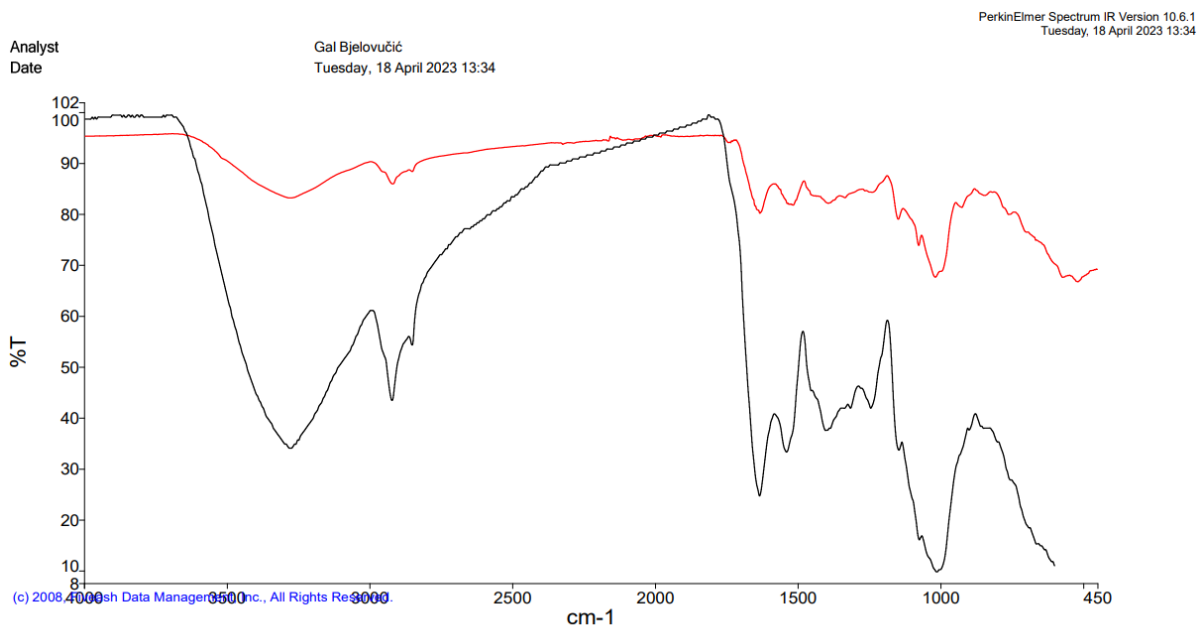
Slika 4-42: Vzorec PD\_LA\_3 [57].

#### 4.2.3.1 Analiza ATR-FTIR vzorca PD\_LA\_3

Najprej smo naredili analizo ATR-FTIR, ki je nakazala na prisotnost beljakovin. Slika 4-43 prikazuje spekter ATR-FTIR vzorca PD\_LA\_3 z označenimi najbolj intenzivnimi vrhovi, na sliki 4-44 pa je prikazana primerjava spektra vzorca s spektrom ureaze stročnice lat. *canavalia ensiformis* (angl. *jack bean*), za katero je bilo ugotovljeno najvišje ujemanje po primerjavi s knjižnico spektrov, in tabela desetih najvišjih ujemanj. Glede na relativno visoko ujemanje s spektri več različnih spojin, na podlagi ATR-FTIR ne moremo trditi, da vzorec vsebuje ureazo.



Slika 4-43: Spekter ATR-FTIR vzorca PD\_LA\_3.



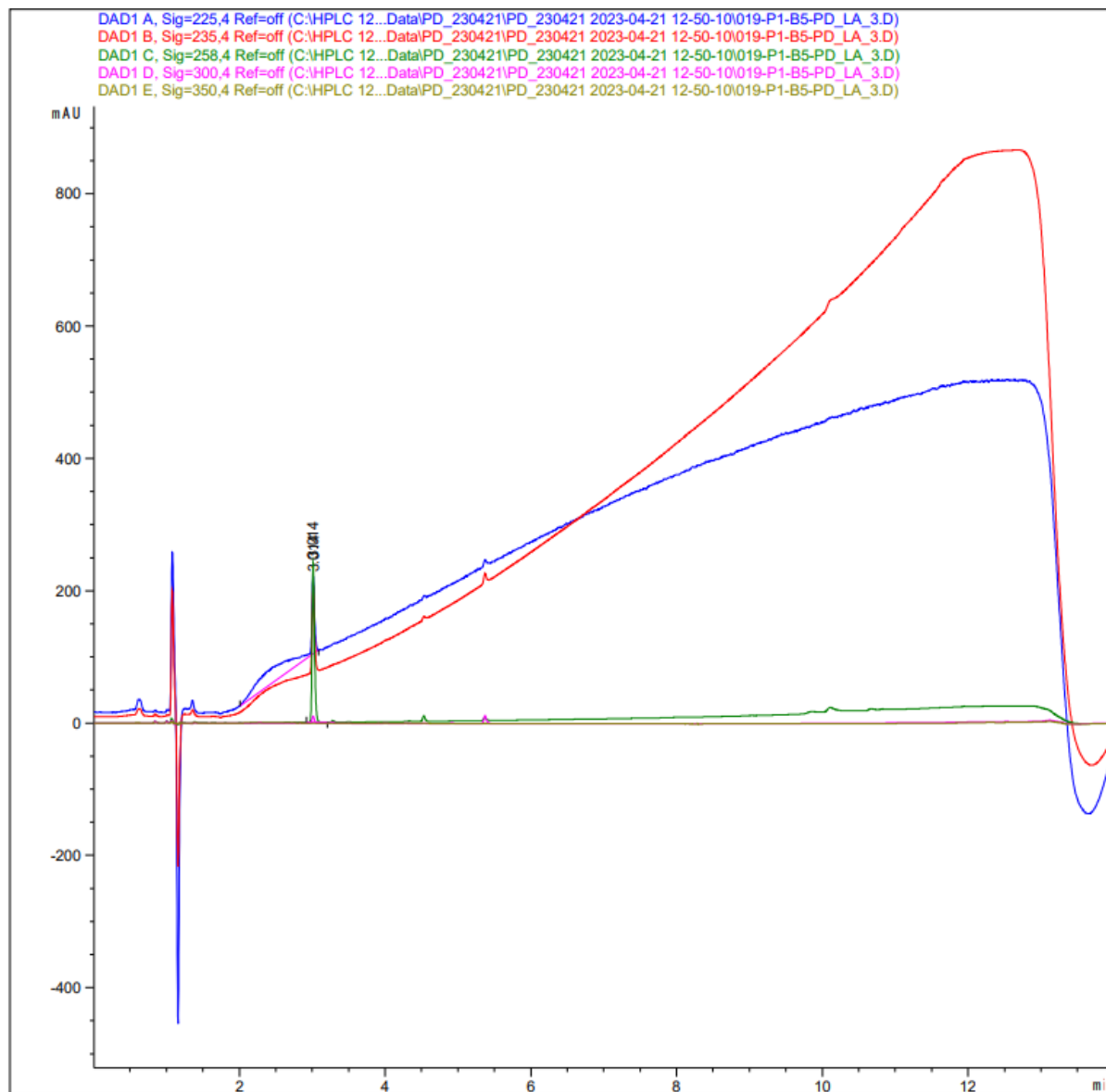
Source Spectra		
Sample Name	Search Best Hit	Search Best Hit Description
PD_LA_3	AO0136	O0152.SP JACK BEAN MEAL (CRUDE UREASE PROTEIN), 9002-13-5
Searched References		
Search Score	Search Reference Spectrum Description	
0.938702	O0152.SP JACK BEAN MEAL (CRUDE UREASE PROTEIN), 9002-13-5	
0.89153	H211.DX BOVEXAN-P (COLLAGEN), COSMETIC RAW MATERIAL	
0.89153	H211.SP BOVEXAN-P (COLLAGEN), COSMETIC RAW MATERIAL	
0.89153	H211.SP BOVEXAN-P (COLLAGEN), COSMETIC RAW MATERIAL	
0.854618	AD0014.SP BREWER'S YEAST, 68876-77-7	
0.843458	ADRG_014.SP BREWER'S YEAST	
0.83774	ADRG_033.SP CORN STARCH NS	
0.834108	Maltoheptaose, 34620-78-5	
0.819503	ADRG_105.SP RAUWOLFIA SERPENTINA USP 6533 NS	
0.817098	Corn Starch, 68412-29-3	

Slika 4-44: Primerjava spektra ATR-FTIR vzorca PD\_LA\_3 (rdeče) s spektrom ureaze (črno) in tabela desetih najvišjih ujemanj.



#### 4.2.3.2 Analiza HPLC-DAD vzorca PD\_LA\_3

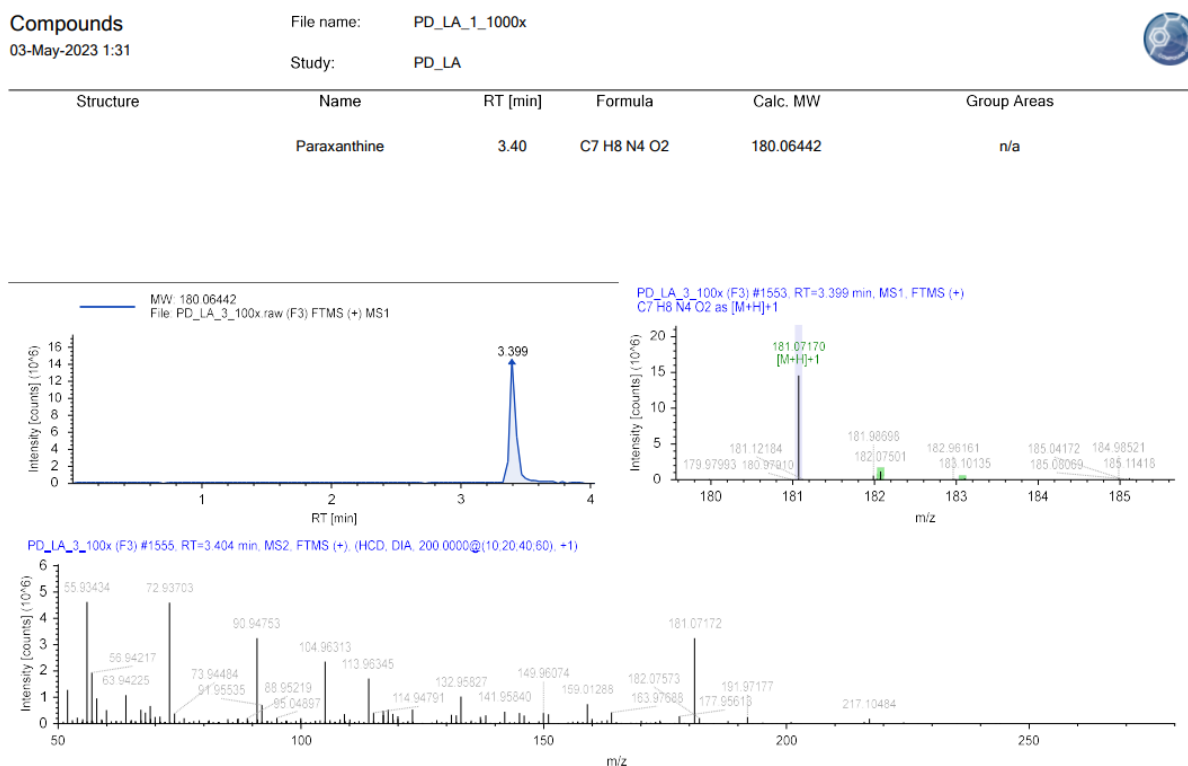
Po izvedbi analize ATR-FTIR smo naredili analizo HPLC-DAD (slika 4-45). Najbolj intenziven je bil vrh pri 3,0 min, vendar s HPLC-DAD nismo določili, kateri spojini ustreza.



Slika 4-45: Kromatogrami vzorca PD\_LA\_3 pri  $\lambda = 225$  nm (modro),  $\lambda = 235$  nm (rdeče),  $\lambda = 258$  nm (zeleno),  $\lambda = 300$  nm (rožnato) in  $\lambda = 350$  nm (oker).

### 4.2.3.3 Analiza UHPLC-HRMS vzorca PD\_LA\_3

Kot potrditveno analizo tehniko smo uporabili UHPLC-HRMS, s katero smo identificirali kofein in njegov metabolit paraksantin. Slika 4-46 prikazuje kromatogram (zgoraj levo), na katerem je viden kromatografski vrh paraksantina ( $RT = 3,4$  min). Zgoraj desno na sliki 4-46 je pripadajoč masni spekter (približan prikaz na območje okoli signala z najvišjo intenziteto, ki je označen s svetlo modrim pasom). Nato je bila izvedena fragmentacija v načinu DIA pri napetosti kolizijske celice 32,5 V. Masni spekter fragmentov je prikazan spodaj na sliki 4-46. Po primerjavi s knjižnico spektrov smo z ujemanjem vseh karakterističnih vrhov potrdili prisotnost paraksantina v vzorcu.

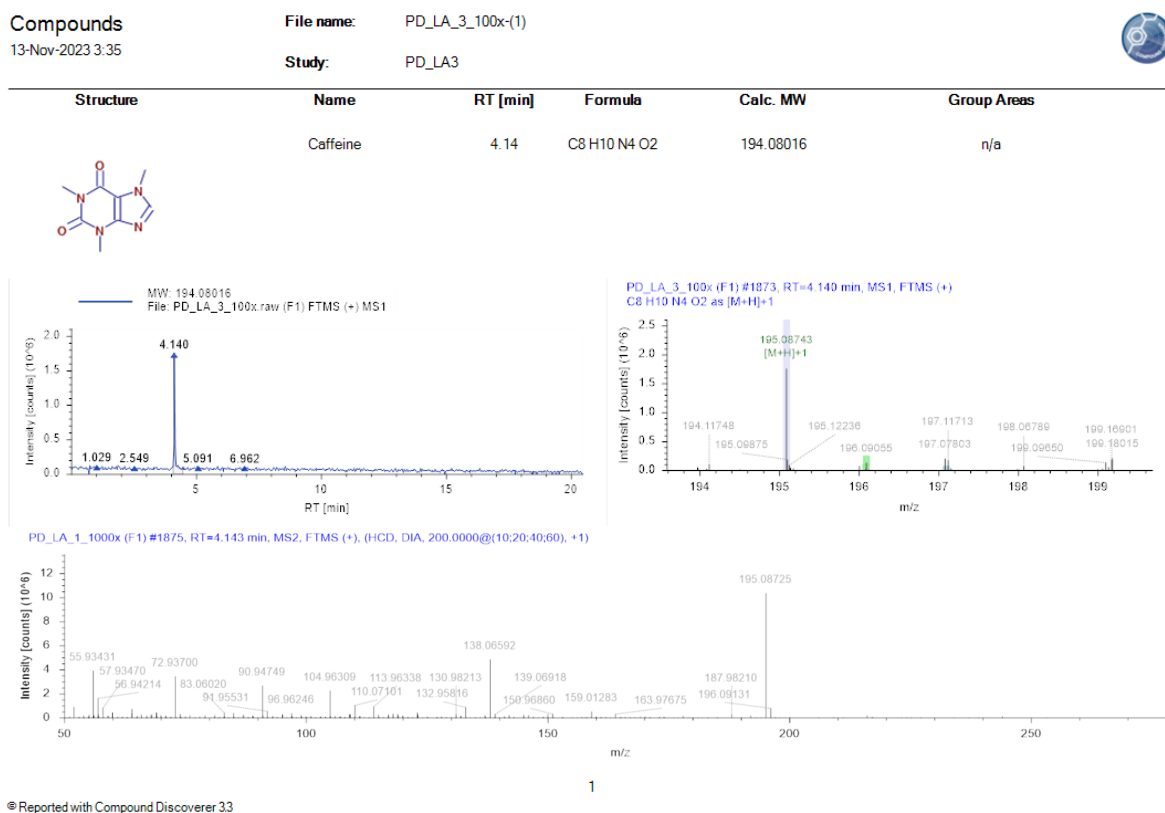


© Reported with Compound Discoverer 3.3

1

Slika 4-46: Kromatogram vzorca PD\_LA\_3, na katerem je viden kromatografski vrh paraksantina (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Na enak način kot za paraksantin, so na sliki 4-47 prikazani rezultati za kofein, katerega predstavlja kromatografski vrh pri  $RT = 4,1$  min.



Slika 4-47: Kromatogram vzorca PD\_LA\_3, na katerem je viden kromatografski vrh kofeina (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Nobena od identificiranih spojin ni bila zabeležena na seznamu sestavin izdelka. Na embalaži bi morale biti navedeno, da izdelek vsebuje kofein in njegov metabolit paraksantin.

## 5 Zaključek

V magistrskem delu je predstavljena uporaba UHPLC-HRMS za analizo psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil. Razvili smo metodo za identifikacijo večjega števila organskih snovi v analiziranih vzorcih.

Za določanje organskih snovi v vzorcih smo uporabili na novo razvito metodo UHPLC-HRMS in metode ATR-FTIR, HPLC-DAD ter GC-MS, ki jih uporabljajo v NLZOH. ATR-FTIR je služil za pridobitev prvih informacij o sestavi, predvsem o polnilih, kar je omogočilo ustrezno pripravo vzorcev za nadaljnjo analizo. HPLC-DAD je omogočal identifikacijo in tudi kvantifikacijo že znanih spojin, hkrati pa nakazal prisotnost novih spojin, ki smo jih nato z UHPLC-HRMS identificirali. GC-MS pa smo uporabili za dodatno potrditev prisotnosti spojin, ki jih je sistem UHPLC-HRMS predlagal, vendar v knjižnicah spektrov UHPLC-HRMS še niso bile zabeležene, medtem ko smo lahko spektre GC-MS primerjali z obstoječimi.

Izvedli smo analizo treh vzorcev psihoaktivnih snovi na osnovi HHC in 58 vzorcev prehranskih dopolnil. Z opisano metodo UHPLC-HRMS smo identificirali štiri različne NPS v vzorcih psihoaktivnih snovi in 37 različnih organskih spojin v vzorcih prehranskih dopolnil. Na EMCDDA smo za vnos v EDND poročali prvo identifikacijo HHC-O v Sloveniji. Pri analizi vzorcev prehranskih dopolnil smo ugotovili neskladnost pri sestavi 15 % analiziranih vzorcev. Problematični so bili predvsem izdelki, kupljeni na spletu, v katerih smo identificirali zaviralce PDE5 in njihove derivate ter anorektike, kot je sibutramin.

Tako hitro razvijajoča se proizvodnja psihoaktivnih snovi, kjer vsakodnevno nastajajo nove NPS, kot spletna trgovina s prehranskimi dopolnili, katere nadzor je z vidika globalne dostopnosti zelo težaven, zahtevata hitro in učinkovito metodo analize vzorcev in identifikacije morebitnih zdravju škodljivih oz. življenjsko nevarnih spojin. Razvita metoda predstavlja dobro podlago za nadaljnje raziskave na področju analiz psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil. V prihodnosti bo potrebna validacija razvite metode. Glavni cilj magistrskega dela je bila identifikacija spojin, kar metoda omogoča, z uporabo raztopin standardov pa bi lahko v prihodnje določili tudi vsebnost potencialno nevarnih spojin v vzorcih, kar je velikega pomena pri preprečevanju zdravstvenih tveganj z uporabo izdelkov.

## 6 Literatura

- [1] Pantano F., Graziano S., Pacifici R., Busardò F. P., Pichini S. New Psychoactive Substances: A Matter of Time. *Current Neuropharmacology*, 17 (9), 818–822, 2019.
- [2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. An Update from the EU Early Warning System New Psychoactive Substances: 25 Years of Early Warning and Response in Europe, 2022. [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14637/20222218\\_PDF\\_TD0522113ENN\\_002.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/14637/20222218_PDF_TD0522113ENN_002.pdf) (dostop: 3. 12. 2023).
- [3] Venhuis B. J., Zwaagstra M. E., van den Berg J. D. J., van Riel A. J. H P., Wagenaar H. W. G., van Grootheest K., Barends D. M., de Kaste D. Illicit erectile dysfunction products in the Netherlands: A decade of trends and a 2007-2010 product update. National Institute for Public Health and the Environment, Ministry of Health, Welfare and Sport, 2011.
- [4] Mohd Yusop A. Y. A forensic investigation into the presence of phosphodiesterase 5 inhibitors as adulterants in herbal remedies: doktorska disertacija. University of Technology Sydney, Faculty of Science, 2020.
- [5] Barhdadi S., Courselle P., Deconinck E., Vanhee C. The analysis of cannabinoids in e-cigarette liquids using LC-HRAM-MS and LC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 230, 115394, 2023.
- [6] Kim M., An S., Kim J., Jung H. Determination of cannabinoids in illegal e-cigarette fluids in Korea by LC-MS/MS. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 34 (3), 129, 2022.
- [7] Giannetti L., Gallo V., Necci F., Marini F., Giorgi A., Sonogo E., D'Onofrio F., Neri B. LC-HRMS analysis of 13 classes of pharmaceutical substances in food supplements. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1–13, 2023.
- [8] Kakitani A., Inoue T., Matsumoto K., Watanabe J., Nagatomi Y., Mochizuki N. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in beverages and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 31 (12), 1939–1948, 2014.
- [9] Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano. O nas, 2020. <https://www.nlzoh.si/o-nas/> (dostop: 3. 12. 2023).
- [10] DrogArt. Testirne točke, 2023. <https://www.drogart.org/testirne-tocke/> (dostop: 3. 12. 2023).
- [11] UNODC. Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances, 2023. <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (dostop: 3. 12. 2023).
- [12] UNODC. Drug Laws/Individual Listing for SLOVENIA, 2023. <https://www.unodc.org/LSS/Country/DetailsLegalSystem?code=DLIL&country=SI> (dostop: 3. 12. 2023).
- [13] EMCDDA. Hexahydrocannabinol (HHC) and related substances, 2023. [https://www.emcdda.europa.eu/publications/technical-reports/hhc-and-related-substances\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/technical-reports/hhc-and-related-substances_en) (dostop: 3. 12. 2023).
- [14] EMCDDA. Understanding the 'Spice' phenomenon, 2009. [https://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/understanding-spice-phenomenon\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/understanding-spice-phenomenon_en) (dostop: 3. 12. 2023).

- [15] Ujváry I. Hexahydrocannabinol and closely related semi-synthetic cannabinoids: A comprehensive review. *Drug testing and analysis* (spletna objava pred tiskom), 2023.
- [16] EMCDDA. Substance profiles: Hexahydrocannabinol acetate (HHC acetate), 2023. <https://ednd2.emcdda.europa.eu/ednd/substanceProfiles/1363> (dostop: 3. 12. 2023).
- [17] EMCDDA. Substance profiles: Hexahydrocannabiphorol (HHC-P), 2023. <https://ednd2.emcdda.europa.eu/ednd/substanceProfiles/1373> (dostop: 3. 12. 2023).
- [18] EMCDDA. Substance profiles: Tetrahydrocannabinol (H4-CBD), 2023. <https://ednd2.emcdda.europa.eu/ednd/substanceProfiles/1397> (dostop: 3. 12. 2023).
- [19] EMCDDA. Substance profiles: Hexahydrocannabihexol (HHCH), 2023. <https://ednd2.emcdda.europa.eu/ednd/substanceProfiles/1425> (dostop: 3. 12. 2023).
- [20] Uradni list Republike Slovenije. Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina?urlid=201366&stevilka=2603> (dostop: 3. 12. 2023).
- [21] Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije. PREHRANSKA DOPOLNILA, Napotki, 2023. <https://www.gov.si/assets/ministrstva/MZ/DOKUMENTI/DJZ-Preventiva-in-skrb-za-zdravje/varnost-zivil-in-hrane/prehranska-dopolnila/Napotki-prehranskih-dopolnil-2021.pdf> (dostop: 3. 12. 2023).
- [22] Boon H, Bozinovski N. A systematic narrative review of the evidence for labeling of natural health products and dietary supplements. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 25 (8), 777–788, 2019.
- [23] Skalicka-Wozniak K., Georgiev M. I., Orhan I. E. Adulteration of herbal sexual enhancers and slimmers: the wish for better sexual well-being and perfect body can be risky. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 355–364, 2017.
- [24] Haneef J., Shaharyar M., Husain A., Rashid M., Mishra R., Siddique N. A., Pal M. Analytical methods for the detection of undeclared synthetic drugs in traditional herbal medicines as adulterants. *Drug testing and analysis*, 5 (8), 607–613, 2013.
- [25] Primpray V., Chailapakul O., Tokeshi M., Rojanarata T., Laiwattanapaisal W. A paper-based analytical device coupled with electrochemical detection for the determination of dexamethasone and prednisolone in adulterated traditional medicines. *Analytica Chimica Acta*, 1078, 16–23, 2019.
- [26] Fibigr J., Šatínský D., Solich P. Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts. *Analytica Chimica Acta*, 1036, 1–15, 2018.
- [27] Champagne A. B., Emmel K. V. Rapid screening test for adulteration in raw materials of dietary supplements. *Vibrational Spectroscopy*, 55 (2), 216–223, 2011.
- [28] Marcus D. M. Dietary supplements: What's in a name? What's in the bottle? *Drug testing and analysis*, 8 (3-4), 410–412, 2016.
- [29] Mohd Yusop A. Y., Xiao L., Fu S. Determination of phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors in instant coffee premixes using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). *Talanta*, 204, 36–43, 2019.
- [30] Mateescu C., Popescu A. M., Radu G. L., Onisei T., Raducanu A. E. Spectroscopic and Spectrometric Methods Used for the Screening of Certain Herbal Food Supplements Suspected of Adulteration. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7 (2), 251–259, 2017.
- [31] Gratz S. R., Zeller M., Mincey D. W., Flurer C. L. Structural characterization of sulfoildenafil, an analog of sildenafil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (2), 228–231, 2009.

- [32] Strano-Rossi S., Odoardi S., Castrignanò E., Serpelloni G., Chiarotti M. Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC–HRMS) determination of stimulants, anorectic drugs and phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5I) in food supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 144–152, 2015.
- [33] Colmenero M. V., Martínez-Sanz J. M., Navarro A. N., Ortíz-Moncada R., Hurtado J. A., Baladia E. Variables used in questionnaires about ergonutritionals supplements intake. *Nutricion Hospitalaria*, 32, 556–572, 2015.
- [34] Maughan R. J., Greenhaff P. L., Hespel P. Dietary supplements for athletes: Emerging trends and recurring themes. *Journal of Sports Sciences*, 29 (1), 57–66, 2011.
- [35] Rodriguez-Lopez P., Rueda-Robles A., Sánchez-Rodríguez L., Blanca-Herrera R. M., Quirantes-Piné R. M., Borrás-Linares I., Segura-Carretero A., Lozano-Sánchez J. Analysis and Screening of Commercialized Protein Supplements for Sports Practice. *Foods*, 11 (21), 3500, 2022.
- [36] Martínez-Sanz J. M., Sospedra I., Baladía E., Arranz L., Ortiz-Moncada R., Gil-Izquierdo A. Current Status of Legislation on Dietary Products for Sportspeople in a European Framework. *Nutrients*, 9, 1225, 2017.
- [37] Martínez-Sanz, J. M., Sospedra I., Ortiz C. M., Baladía E., Gil-Izquierdo A., Ortiz-Moncada R. Intended or Unintended Doping? A Review of the Presence of Doping Substances in Dietary Supplements Used in Sports. *Nutrients*, 9, 1093, 2017.
- [38] Cianchino V., Acosta G., Ortega C., Martínez L. D., Gomez M. R. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 108 (3), 1075-1081, 2008.
- [39] Koncz D., Tóth B., Roza O., Csupor D. A Systematic Review of the European Rapid Alert System for Food and Feed: Tendencies in Illegal Food Supplements for Weight Loss. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2021.
- [40] Agilent Technologies. ATR Sampling Accessories for the Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer, 2022. <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-6858EN.pdf> (dostop: 3. 12. 2023).
- [41] Spragg R. A. IR Spectrometers v *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (tretja izdaja), 419–427. Cambridge, MA: Academic Press, 2017.
- [42] PerkinElmer. Using a Lithium Tantalate Detector in a High Performance FT-IR Spectrometer, 2010. [https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2020/04/LiTaO3-Detector\\_Technical-Note.pdf](https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2020/04/LiTaO3-Detector_Technical-Note.pdf) (dostop: 3. 12. 2023).
- [43] Lozano-Sánchez J., Borrás-Linares I., Sass-Kiss A., Segura-Carretero A. Chapter 13 - Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) v *Modern Techniques for Food Authentication* (druga izdaja), 459–526. Cambridge, MA: Academic Press, 2018.
- [44] Shimadzu. UV vs Diode-Array (PDA) Detectors for (U)HPLC, 2023. <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/liquid-chromatography/knowledge-base/uv-vs-pda-detectors/index.html> (dostop: 3. 12. 2023).
- [45] Igualada C., Giraldo J., Font G., Yusà V. Validation of a multi-residue UHPLC-HRMS method for antibiotics screening in milk, fresh cheese, and whey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106 (104265), 889–1575, 2022.
- [46] Zhao J.-J., Zhang Y., Wang X.-C., Wang X., Zhang Q., Lu P., Liu P.-P., Yu Y.-J., Han L., Zhou H.-N., Zheng Q.-X., Fu H.-Y. A new platform for untargeted UHPLC-HRMS

- data analysis to address the time-shift problem. *Analytica Chimica Acta*, 1193 (339393), 3–2670, 2022.
- [47] Craige Trenerry V., Rochfort S. J. *Natural Products Research and Metabolomics v Comprehensive Natural Products II*, 595–628. Amsterdam: Elsevier, 2010.
- [48] Ma J., Li K., Shi S., Li J., Tang S., Liu L. The Application of UHPLC-HRMS for Quality Control of Traditional Chinese Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 13 (922488), 2022.
- [49] Geer Wallace M. A., McCord J. P. Chapter 16 - High-resolution mass spectrometry v *Breathborne Biomarkers and the Human Volatilome (druga izdaja)*, 253–270. Amsterdam: Elsevier, 2020.
- [50] Zubarev R. A., Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85 (11), 5288–5296, 2013.
- [51] Michalski A., Damoc E., Lange O., Denisov E., Nolting D., Müller M., Viner R., Schwartz J., Remes P., Belford M., Dunyach J.-J., Cox J., Horning S., Mann M., Makarov A. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11 (3), O111.013698, 2011.
- [52] Rockwood A. L., Kushnir M. M., Clarke N. J. *Mass Spectrometry v Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, 33–65. Amsterdam: Elsevier, 2018.
- [53] Sparkman O. D., Penton Z. E., Kitson F. G. Chapter 1 - Introduction and History v *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (druga izdaja)*, 2–13. Cambridge, MA: Academic Press, 2011.
- [54] Sparkman O. D., Penton Z. E., Kitson F. G. Chapter 4 - Mass Spectrometry Instrumentation v *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (druga izdaja)*, 2–13. Cambridge, MA: Academic Press, 2011.
- [55] Zveza potrošnikov Slovenije. Odpoklic: prehransko dopolnilo LibiForMe, 2023. <https://www.zps.si/aktualne-vsebine/odpoklici-izdelkov/odpoklic-prehransko-dopolnilo-libiforme-2023-06-12> (dostop: 3. 12. 2023).
- [56] Trex Tea Slovenia. TREX TEA, 2023. [https://www.facebook.com/beautybymademoisellee/?paipv=0&eav=AfaQ9RWpGosb5dPym88DVOzi9-0h-R2oNqYQhMnpotbSzy9m6v6\\_ZV42srpdfnz5ASw&\\_rdr](https://www.facebook.com/beautybymademoisellee/?paipv=0&eav=AfaQ9RWpGosb5dPym88DVOzi9-0h-R2oNqYQhMnpotbSzy9m6v6_ZV42srpdfnz5ASw&_rdr) (dostop: 3. 12. 2023).
- [57] Nduranz. Regen, 2023. <https://nduranz.com/products/regen> (dostop: 3. 12. 2023).

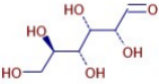


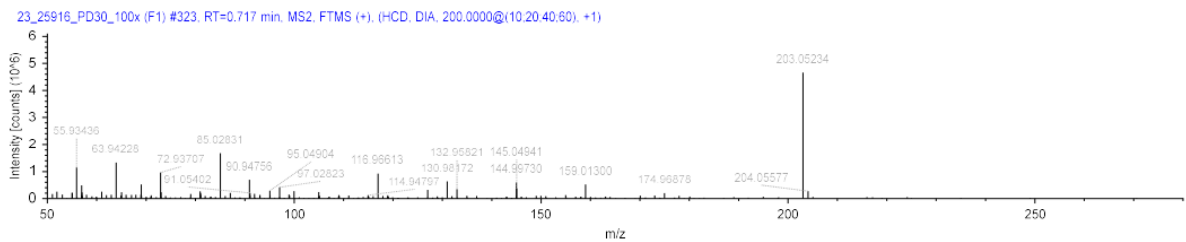
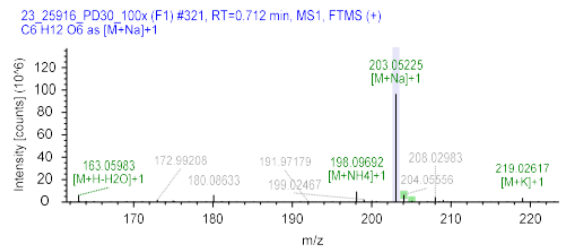
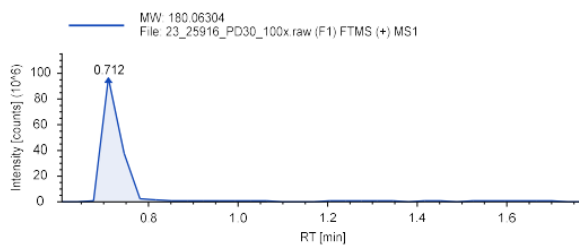
## 7 Priloga

Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x  
Study: 23\_25916\_PD30



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	D-(+)-Glucose	0.72	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180.06304	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

2

Slika 7-1: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh glukoze (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

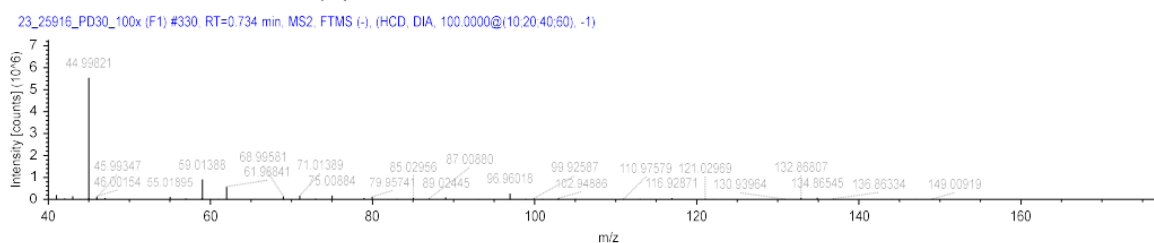
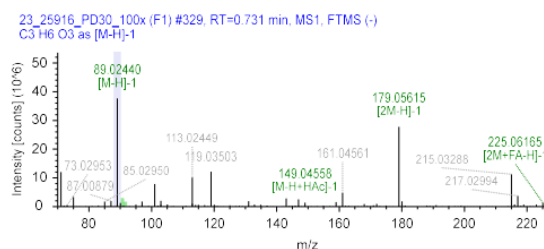
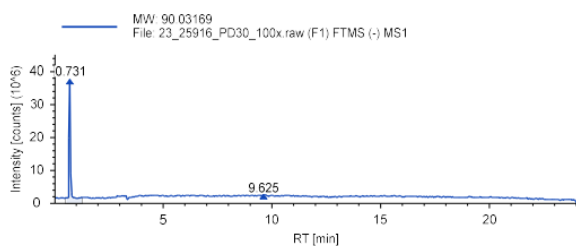
Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x

Study: 23\_25916\_PD30



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
<chem>CC(O)C(=O)O</chem>	DL-Lactic Acid	0.73	C3 H6 O3	90.03169	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

3

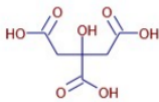
Slika 7-2: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh mlečne kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

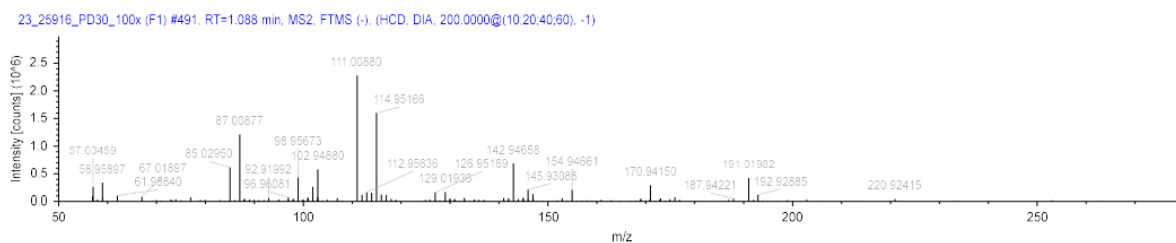
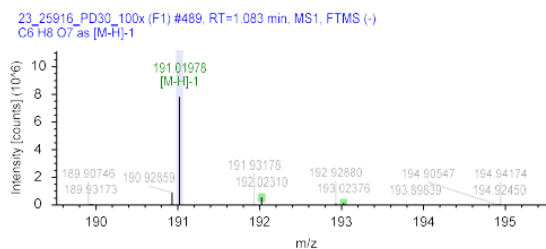
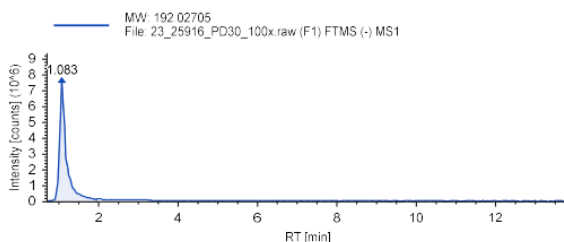
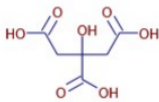
Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x



Study: 23\_25916\_PD30

Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Citric acid	1.09	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192.02705	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

4

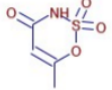
Slika 7-3: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh citronske kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

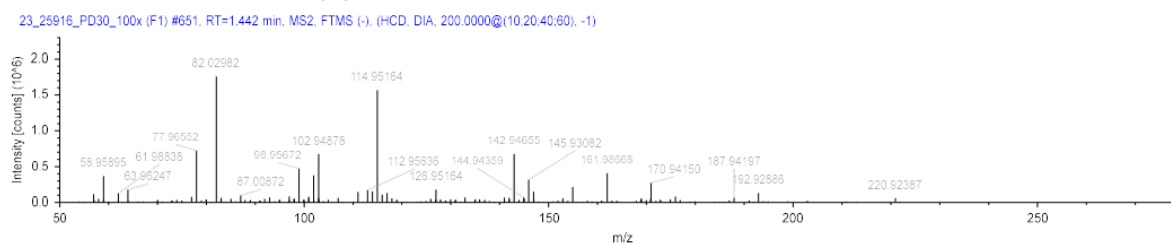
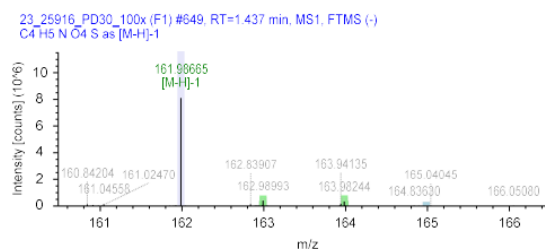
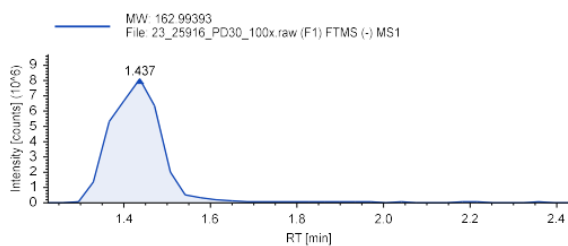
Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x



Study: 23\_25916\_PD30

Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Acesulfame	1.43	C4 H5 N O4 S	162.99393	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

5

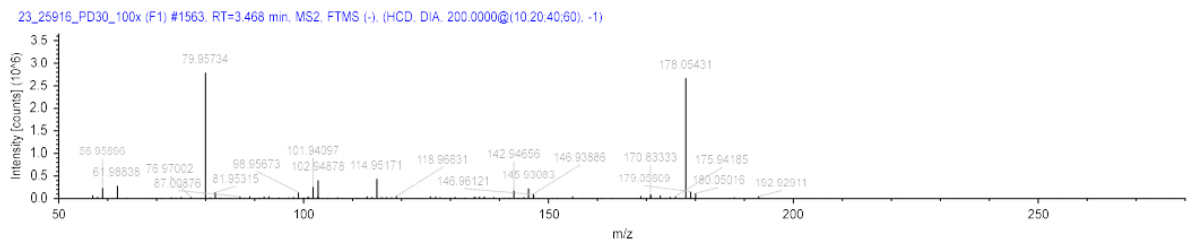
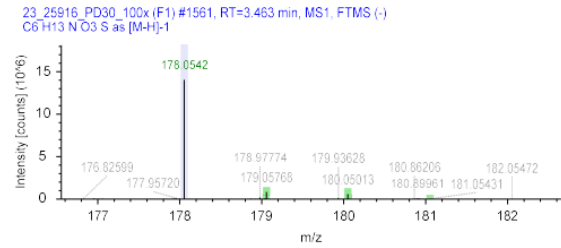
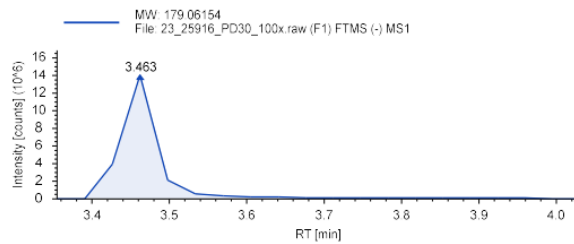
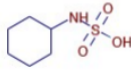
Slika 7-4: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh acesulfama (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x  
Study: 23\_25916\_PD30



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Cyclamic acid	3.46	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub> S	179.06154	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

6

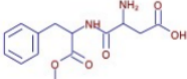
Slika 7-5: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh ciklamne kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

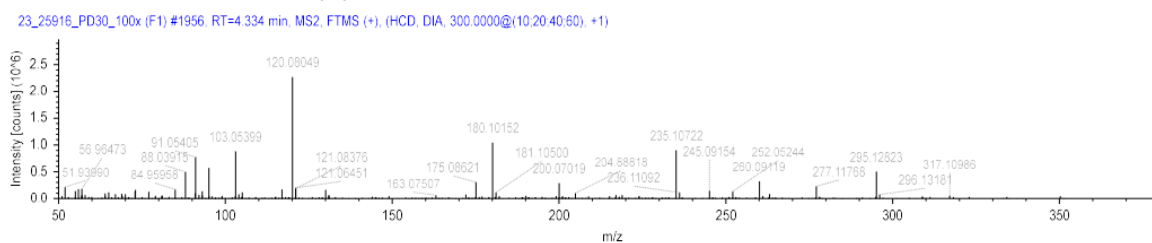
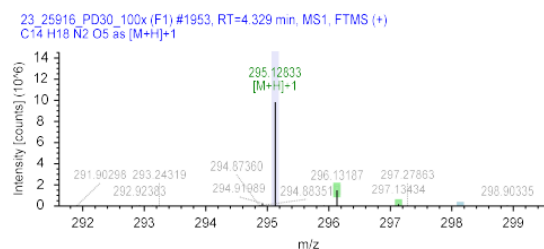
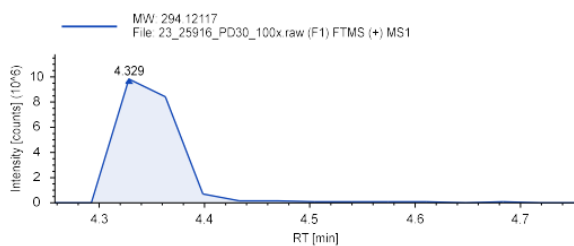
Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x



Study: 23\_25916\_PD30

Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	Aspartame	4.35	C14 H18 N2 O5	294.12117	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

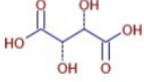
7

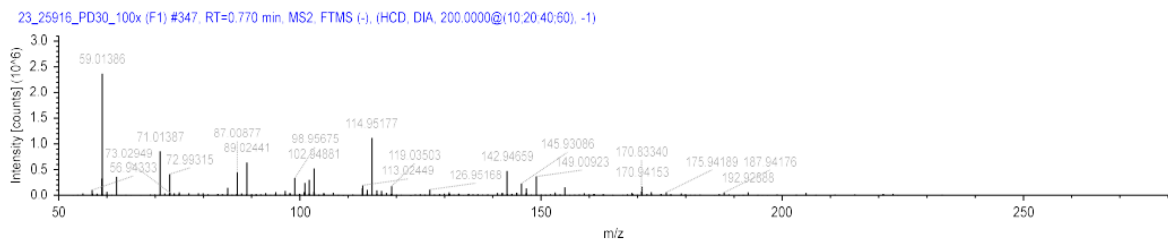
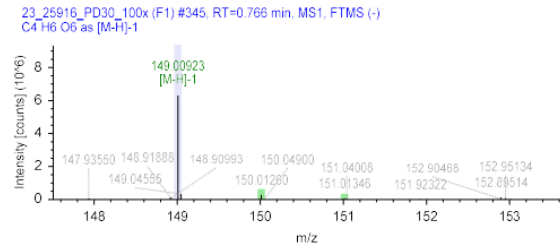
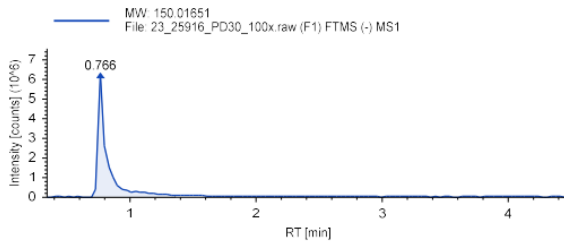
Slika 7-6: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh aspartama (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Compounds  
30-Mar-2023 9:15

File name: 23\_25916\_PD30\_100x  
Study: 23\_25916\_PD30



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	L-(+)-Tartaric acid	0.78	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	150.01651	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

8

Slika 7-7: Kromatogram vzorca PD30, na katerem je viden kromatografski vrh vinske kisline (zgoraj levo), pripadajoč masni spekter (zgoraj desno) in masni spekter fragmentov po fragmentaciji v načinu DIA (spodaj).

Izjava o avtorstvu zaključnega dela



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

(ime članice UM)

**IZJAVA O AVTORSTVU ZAKLJUČNEGA DELA**

Ime in priimek študenta/-ke: Gal Bjelovučič

Študijski program: KEMIJA

Naslov zaključnega dela: Uporaba UHPLC-HRMS za določanje organskih spojin v vzorcih  
psihoaktivnih snovi in prehranskih dopolnil

Mentor/-ica: Matjaž Finšgar

Somentor/-ica: Roman Kranvogl

Podpisani/-a študent/-ka Gal Bjelovučič

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelal/-a ob pomoči mentorja/-ice oz. somentorja/-ice;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjen/-a, da bodo dela, deponirana/objavljena v DKUM, dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela.

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: \_\_\_\_\_  
(navedite obliko)

Kraj in datum:  
Maribor, 04.12.2023

Podpis študenta/-ke: