

# Dokazivanje novih psihoaktivnih droga u biološkim uzorcima urina primjenom GC-MS metode

---

**Smoljanović, Antonia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:627718>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Antonia Smoljanović**

**DOKAZIVANJE NOVIH PSIHOAKTIVNIH DROGA**  
**U BIOLOŠKIM UZORCIMA URINA PRIMJENOM GC-MS METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2015./2016.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Davorka Sutlović**

**U Splitu, rujan 2016.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Antonia Smoljanović**

**DOKAZIVANJE NOVIH PSIHOAKTIVNIH DROGA**  
**U BIOLOŠKIM UZORCIMA URINA PRIMJENOM GC-MS METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2015./2016.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Davorka Sutlović**

**U Splitu, rujan 2016.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Farmaceutska toksikologija  
**Tema rada** je prihvaćena na \_\_\_ sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na \_\_\_ sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i \_\_\_ sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** prof. dr. sc. Davorka Sutlović  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

### **Dokazivanje novih psihoaktivnih droga u biološkim uzorcima urina primjenom GC-MS metode**

Antonia Smoljanović, 31

**Sažetak:** *Ciljevi istraživanja:* Cilj ovog eksperimentalnog istraživanja bio je kvalitativno dokazati prisutnost novih psihoaktivnih droga (NPD) u biološkim uzorcima osoba suspektnih na konzumaciju NPD GC-MS metodom, te identificirati NPD u istim uzorcima. *Materijali i metode:* Biološki uzorci urina i/ili krvi 52 ispitanika suspektnih na konzumaciju NPD i 46 kupljenih referentnih standarda NPD ekstrahirani su na različitim nosačima i analizirani GC-MS metodom istovremenim snimanjem ukupnog ionskog kromatograma u području m/z vrijednosti od 40 do 600, s optimiranim temperaturnim programom za određivanje NPD u biološkim uzorcima, u kemijsko-toksikološkom laboratoriju Kliničkog odjela za sudsku medicinu, Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu. Pikovi kromatograma bioloških uzoraka uspoređivani su s retencijskim vremenom i omjerom masa i naboja analiziranih referentnih standarda NPD. Analizirana je podudarnost karakterističnih signala kromatograma bioloških uzoraka s bazama spektara DD2015, PMW\_tox3, SWGDRUG3, SWGDRUG4 i SWGDRUG5 i raspoloživom literaturom. *Rezultati:* Dokazana je prisutnost metedrona u uzorku urina Ispitanika br. 43, a vjerojatno je isti konzumirao i  $\alpha$ -PVP, što se ne može sa sigurnošću tvrditi s obzirom na nedostatak referentnog standarda. Ispitanici su vjerojatno konzumirali i druge NPD, ali njihovu prisutnost teško je dokazati zbog nedostatka raspoloživih referentnih standarda NPD. *Zaključak:* Zbog sve većeg priljeva velikog broja NPD na tržište droga, trud uložen u otkrivanje NPD u biološkim uzorcima nesrazmjeran je rezultatima. Potrebno je razvijanje specifičnijih, bržih i jeftinijih metoda za otkrivanje NPD u biološkim uzorcima.

**Ključne riječi:** nove psihoaktivne droge, urin, GC-MS

**Rad sadrži:** 59 stranica, 30 slika, 2 tablice, 39 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| 1. prof. dr. sc. Darko Modun        | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić | član        |
| 3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović   | član-mentor |

**Datum obrane:** 27. rujna 2016.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Pharmaceutical toxicology  
**Thesis subject** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. \_\_\_ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. \_\_\_ and Faculty Council of School of Medicine, session no. \_\_\_  
**Mentor:** Davorka Sutlović, PhD, full prof.  
**Technical assistance:** Maja Veršić Bratinčević, PhD

### Evidence of new psychoactive substances by GC-MS method in urine biological samples

Antonia Smoljanović, 31

**Summary:** *Objectives:* Aim of this experimental study was qualitative determination of new psychoactive substances (NPS) in biological samples by GC-MS method collected from subjects suspected of NPS consumption, as well as identification of NPS in those samples. *Materials and methods:* Biological samples of urine and/or blood collected from 52 subjects suspected of NPS consumption as well as 46 bought NPS reference standards were extracted on different carriers and analyzed by GC-MS, at toxicology laboratory of Department of Pathology and Forensic Medicine, University Hospital Centre Split. Analysis was performed by a method that simultaneously records total ion chromatogram in the area of 40-600 m/z, with optimized temperature program for NPS determination in biological samples. Chromatogram peaks of biological samples were compared to the retention times and mass and charge ratios of NPD reference standards. Characteristic signals of chromatograms of biological samples were compared to DD2015, PMW\_tox3, SWGDRUG3, SWGDRUG4 and SWGDRUG5 spectral databases as well as the available literature. *Results:* Methedrone was detected in a urine sample collected from Subject No. 43 raising suspicion that the subject has also consumed  $\alpha$ -PVP. However, as there is no reference standard for  $\alpha$ -PVP, the consumption could not be confirmed. Subjects probably consumed other NPS, but it is difficult to detect them due to the lack of available NPS reference standards. *Conclusion:* Due to the increasing influx of numerous NPS on illicit market, efforts invested in NPS detection in biological samples are disproportionate to the results. There is a need for development of more specific, inexpensive and faster methods for NPS detection in biological samples.

**Key words:** new psychoactive substances, urine, GC-MS

**Thesis contains:** 59 pages, 30 figures, 2 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Darko Modun, PhD, full prof.
2. Vedrana Čikeš Čulić, PhD, associate prof.
3. Davorka Sutlović, PhD, full prof.

chair person  
member  
supervisor

**Defence date:** September 27 2016

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sredstva ovisnosti i opojne droge.....	2
1.2. Nove psihoaktivne droge.....	3
1.2.1. Podjela novih psihoaktivnih droga.....	3
1.2.1.2. Stimulansi slični kokainu, amfetaminima i ekstaziju.....	5
1.2.1.3. Fenetilamini.....	6
1.2.1.4. Sintetski katinoni.....	7
1.2.1.5. Derivati pipradola.....	8
1.2.1.6. Piperazini.....	9
1.2.1.7. Aminoindani.....	10
1.2.1.8. Halucinogeni po uzoru na psilocibin i LSD.....	11
1.2.1.9. Disocijativne supstancije nalik na ketamin i fenciklidin.....	12
1.3. Problematika novih psihoaktivnih droga.....	13
1.4. Određivanje opojnih droga.....	15
1.4.1. Određivanje opojnih droga u zaplijenjenom materijalu.....	15
1.4.2. Određivanje opojnih droga u biološkim uzorcima.....	15
1.4.2.1. Urin.....	15
1.4.2.2. Krv.....	16
1.5. Metode ekstrakcije.....	17
1.6. Plinska kromatografija.....	17
1.7. Spektrometrija masa.....	18
1.8. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa, GC-MS.....	18
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
3.1. Ispitanici i uzorci.....	22
3.2. Referentni standardi novih psihoaktivnih droga.....	22
3.3. Kemikalije.....	25
3.4. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa, GC-MS.....	25
3.4.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske metode.....	26
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>27</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>36</b>

<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>40</b>
<b>7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....</b>	<b>42</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>47</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>49</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>51</b>

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na vođenju i svesrdnoj pomoći.*

*Zahvaljujem dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na potpori i savjetima.*





## **1.1. Sredstva ovisnosti i opojne droge**

Sredstva ovisnosti su tvari čijom se konzumacijom stvara fizička i psihička ovisnost (1). Induciraju osjećaj euforije i nagrade aktivacijom mezolimbicnog dopaminergičnog sustava. Djelatna tvar sredstva ovisnosti na nekoliko načina može aktivirati stanične mehanizme koji rezultiraju otpuštanjem dopamina: vezanjem za receptore spregnute s  $G_{i\alpha}$ -proteinom, na ionotropne receptore ili ionske kanale, te vezanjem na dopaminergični transporter.

Svakom sljedećom primjenom sredstva ovisnosti želi se postići isti osjećaj euforije i nagrade, kao kod prethodne primjene. Ponavljana konzumacija uzrokuje toleranciju zbog adaptivnih promjena u mozgu, pa je potrebna veća doza za postizanje istog učinka. U slučaju da sredstvo ovisnosti nije više dostupno, kod kroničnog konzumenta nastupaju znakovi ustezanja. Kombinacija tolerancije i znakova ustezanja naziva se sindromom ustezanja koji definira ovisnost, a time i sredstva ovisnosti kojima se želi postići ovaj učinak. Stvara se navika; kompulzivna, relapsirajuća konzumacija sredstva ovisnosti unatoč negativnim posljedicama (2).

Opojne droge su psihoaktivne tvari i nisu nužno sredstva ovisnosti jer neke od njih nemaju učinak na dopaminergični sustav (npr. halucinogeni, LSD, ketamin) i ne uzrokuju naviku. One su supstancije koje nakon konzumacije mijenjaju svijest, raspoloženje ili proces mišljenja konzumenta. Mnoge od njih su lijekovi: služe za umanjene boli, održavanje budnosti ili smirenje, te za liječenje poremećaja raspoloženja i ponašanja.

### **1.1.1. Podjela opojnih droga**

Opojne droge mogu se podijeliti obzirom na mehanizam djelovanja, tj. način aktivacije mezolimbicnog dopaminergičnog sustava, s obzirom na učinak te s obzirom na podrijetlo droge (3). S obzirom na učinak, većinu opojnih droga možemo svrstati u jednu od skupina: psihostimulansi, halucinogeni, narkotici ili opijati, sedativi i hipnotici (4). S obzirom na podrijetlo, opojna droga može biti prirodnog tj. organskog porijekla, polusintetska - nastala laboratorijskom modifikacijom supstancije organskog porijekla, te sintetska droga - u potpunosti nastala procesom sinteze u laboratoriju, najčešće iz organskih prekursora.

## **1.2. Nove psihoaktivne droge**

Nove psihoaktivne droge (*engl. „new psychoactive substances“*, NPD), poznate pod nazivom dizajnerske droge (internetske droge, kemikalije za istraživanja, „legalice“) su psihoaktivne tvari koje se zloupotrebljavaju u skorije vrijeme (5). One su analozi ili kemijski derivati kontroliranih droga, dizajnirane da iskažu učinke slične kontroliranim drogama, ali s namjerom izbjegavanja primjene kaznene politike zbog različitosti u strukturi u odnosu na nacionalne liste ilegalnih droga (6). Lista ilegalnih droga u Republici Hrvatskoj je Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga, donesena na temelju Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (7). Mnoge NPD su nastale primjenom literature koju je na raspolaganje javnosti pružila farmaceutska industrija i znanstvena zajednica. Neke od njih se i danas koriste kao lijekovi ili su opsolentni lijekovi, a neke nikad nisu ni bile registrirane kao lijek, zbog svojih štetnih ili neočekivanih učinaka ili neisplativosti daljnjeg razvoja. Kemičari amateri sintetiziraju i nove supstancije, iz znatiželje ili s namjerom da ih stave na tržište kao NPD. Ponekad novi NPD nastane kao posljedica promjene prekursora korištenih u ilegalnim laboratorijima za sintezu droga poput amfetamina i MDMA (3,4-metilendioksimetamfetamina) (8).

### **1.2.1. Podjela novih psihoaktivnih droga**

Nove psihoaktivne droge mogu se svrstati u pet skupina, s obzirom na tvari po čijem su uzoru nastale (9):

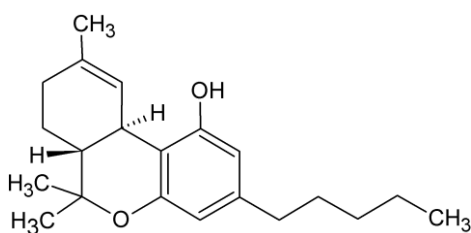
- sintetski kanabinoidi
- psihostimulansi slični kokainu, amfetaminima i ekstaziju
- halucinogeni po uzoru na psilocibin i LSD
- disocijativne supstancije nalik na ketamin i fenciklidin
- supstancije slične benzodiazepinima

### 1.2.1.1. Sintetski kanabinoidi

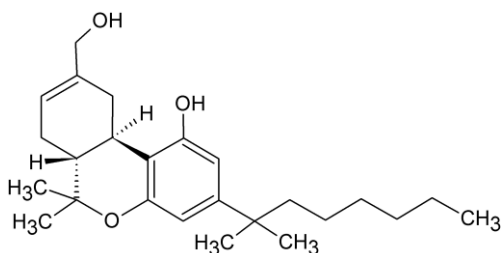
Sintetski kanabinoidi su agonisti kanabinoidnih receptora koji se zlopotrebljavaju kao legalna zamjena za kanabis i  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Slika 1), njegov najznačajniji psihoaktivni sastojak (5, 9). Prvotno su bili sintetizirani za istraživanje interakcija lijek-receptor, a danas uglavnom radi zlouporabe u „uradi sam“ laboratorijima (9). Do 2008. godine samo je nekolicina eksperimentalnih korisnika droga imala pristup sintetskim kanabinoidima, nakon čega su se na području Europe počeli učestalije pojavljivati pod imenom „Spice“, u obliku biljnih mješavina poprskanih otopinom sintetskih kanabinoida, namjerno pogrešno označeni kao mješavine za osvježivanje prostora ili pušenje (10). Danas su najzastupljenija skupina NPD po broju zapljena (5).

S obzirom na kemijsku strukturu, mogu se podijeliti u više skupina (8):

- klasični kanabinoidi (Slika 2)
- neklasični kanabinoidi (Slika 3)
- aminoalkilindoli
- aminoalkilindazoli
- eikosanoidi
- inhibitori hidrolaze masno kiselinskih amida
- ostali

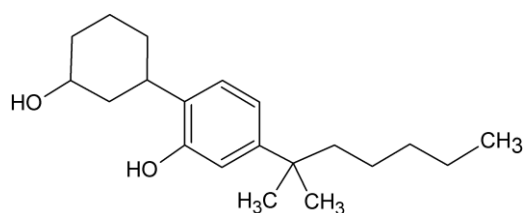


**Slika 1.**  $\Delta^9$ -THC



**Slika 2.** HU-210

(klasični sintetski kanabinoid)



**Slika 3.** CP-47,497

(neklasični sintetski kanabinoid)

### 1.2.1.2. Stimulansi slični kokainu, amfetaminima i ekstaziju

Stimulansi su tvari koje aktiviraju središnji živčani sustav (SŽS) što se očituje povećanom aktivnosti ponašanja, mišljenja i raspoloženja. Stimulansi se mogu podijeliti na: psihomotorne stimulanse (amfetamin, kokain, metilfenidat), metilksantine (kofein, teobromin, tein), konvulzante (strijnin, pikrotoksin), kliničke antidepresive i nikotin (11).

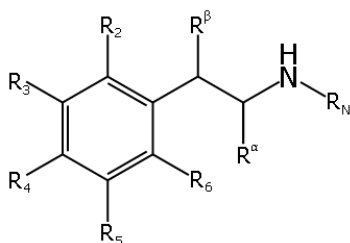
Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama (*engl.* European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA) je razvrstao NPD u kategorije ovisno o njihovoj zajedničkoj kemijskoj jezgri. Psihostimulirajuće, ali u određenoj mjeri i halucinogeno djelovanje, obilježje je pripadnika sljedećih skupina NPD (12):

- fenetilamini
- arilalkilamini
- sintetski katinoni
- derivati pipradola
- piperazini
- aminoindani

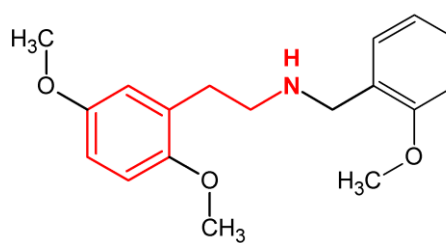
### 1.2.1.3. Fenetilamini

Fenetilaminski derivati su psihoaktivni stimulansi. Najpoznatiji pripadnici skupine su amfetamin, metamfetamin i MDMA, kontrolirani Konvencijom Ujedinjenih naroda o psihotropnim tvarima iz 1971. godine (13).

Fenetilamini nastaju dodavanjem supstituenata na osam mogućih položaja fenetilaminske jezgre (Slika 4) što rezultira bezbrojem mogućih struktura. Novonastali derivati su stimulirajućeg i psihoaktivnog djelovanja (10). U različitoj mjeri inhibiraju dopaminske, serotoninске i noradrenalinске transportere, te uzrokuju otpuštanje monoamina.



**Slika 4.** Fenetilaminska jezgra s mogućim položajima supstituenata



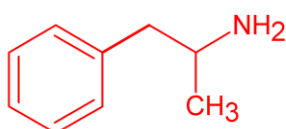
**Slika 5.** 25H-NBOMe

Ovoj skupini pripadaju i supstituirani metamfetamini i brojni drugi derivati s raznolikim heterocikličkim, heteroatomskim i alkilnim supstituentima (Slika 5). Neki od njih se prodaju kao zamjena za ecstasy, u obliku tableta i sa sličnim oznakama.

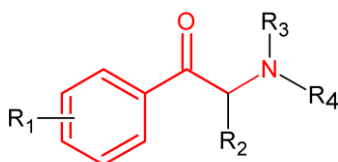
#### 1.2.1.4. Sintetski katinoni

Katinon je prirodni alkaloid stimulirajućeg djelovanja, sastojak biljke *Catha edulis*. Sintetski katinoni, po uzoru na amfetamin (Slika 6), nastaju supstitucijom na benzenskom prstenu i/ili na dušiku fenetilaminske strukture (Slika 7). Svi sadrže  $\beta$ -keto skupinu na etilnom lancu amfetaminske jezgre (Slike 8-11).

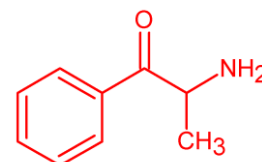
Katinoni imaju psihostimulirajući učinak, sličan i obično manje potentan od amfetamina, a uključuje euforiju, budnost i psihomotornu hiperreaktivnost. Stoga se i prodaju kao zamjena za amfetamine (katinon), MDMA (mefedron) i kokain (metilon), a po zastupljenosti na tržištu su odmah nakon sintetskih kanabinoida (10, 14).



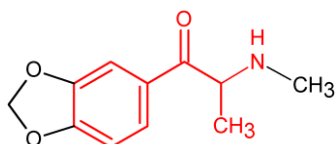
**Slika 6.** Amfetamin



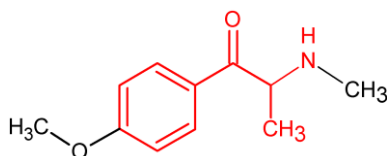
**Slika 7.** Struktura katinona s mjestima moguće supstitucije



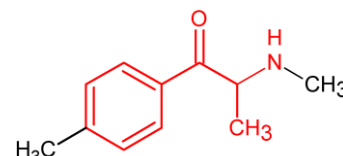
**Slika 8.** Katinon



**Slika 9.** Metilon



**Slika 10.** Metedron



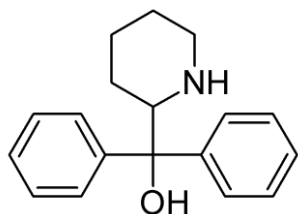
**Slika 11.** Mefedron

Mogu se kupiti putem interneta pod nazivima „kemikalije za istraživanje“, „dohrana za biljke“, „soli za kupanje“ ili „sredstva za čišćenje stakla“; obično u obliku prašaka, tableta ili kapsula. Primjenjuju se šmrkanjem, gutanjem – zamotani u papirnate kuglice (bombice), pomiješani s pićem, ali i parenteralno.

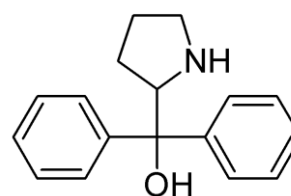
### 1.2.1.5. Derivati pipradola

Pipradol i derivati pipradola pripadaju skupini stimulansa amfetaminskog tipa. Strukturno su povezani s metilamfetaminom, a karakterizirani su prisustvom velikog hidrofobnog difenilmetilnog supstituenta vezanog na  $\alpha$ -ugljik cikličkog amina (Slika 12).

Pipradol je blagi stimulans, sintetiziran 1940-ih u SAD-u gdje je i patentiran i stavljen na tržište lijekova kao antidepresiv. Derivat pipradola, dezoksipipradol je također sredinom 1950-ih patentiran kao potencijalni psihomotorni stimulans i narkoleptik.



Slika 12. Pipradol



Slika 13. Difenilprolinol

Pipradol i amfetamin imaju isti učinak na središnji živčani sustav (SŽS) (inhibitor ponovnog unosa dopamina i noradrenalina), ali je pipradol znatno manje potentan. Nema značajna simpatomimetička svojstva, stoga ni učinak na krvni tlak. Nema utjecaja na apetit, a na budnost i anksioznost slabije od amfetamina. Dezoksipipradol se pojavio na tržištu Velike Britanije 2009. godine pod imenom „Ivory Wave“, a poslije je zamijenjen pirolidinskim derivatima, difenilprolinolom (D2PM) (Slika 13) i 2-(difenilmetil)pirolidinom (deoksi-D2PM).

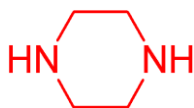
U potrazi za lijekovima sa stimulativnim djelovanjem na SŽS nastale su razne varijacije derivata pipradola, dodavanjem supstituenata na ishodnu strukturu pipradola te zamjenom piperidinskog prstena drugim cikličkim aminima: morfolinskim, tiomorfolinskim, azepanskim ili piridinskim prstenom. Primjenjuju se oralno (dezoksipipradol), intranazalno i rektalno (difenilprolinol) (15).



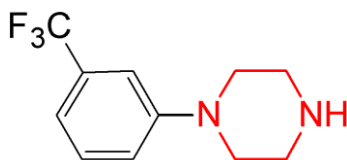
### 1.2.1.6. Piperazini

Piperazin (1,4-heksahidropirazin) je ciklička organska molekula koja sadrži dva dušikova atoma na suprotnim pozicijama šesteročlanog heterocikličkog prstena (Slika 14). Sam piperazin nema psihoaktivne učinke, a koristio se kao potentni anthelmintik u suzbijanju glista u probavnom traktu životinja (8).

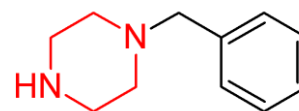
Derivati piperazina mogu se podijeliti u dvije skupine: benzilpiperazine (Slika 15) kod kojih su aromatska struktura i piperazin povezani metilenskim mostom, te fenilpiperazine (Slika 16) kod kojih je aromatska skupina direktno vezana na dušik piperazina (8).



Slika 14. Piperazin



Slika 15. BZP



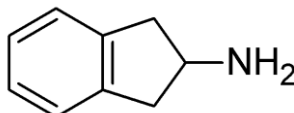
Slika 16. TFMPP

N-benzilpiperazin (BZP), pripadnik benzilskog tipa piperazina, ima tipičnu strukturu stimulansa središnjeg živčanog sustava (Slika 15). Okidač je otpuštanja dopamina i noradrenalina te inhibitor ponovnog unosa dopamina, noradrenalina i serotonina. Iako je BZP strukturno sličan amfetaminu, ima samo desetinu njegove potentnosti. Ipak, u većim dozama može uzrokovati i halucinacije (16). S druge strane trifluorometilfenilpiperazin (TFMPP), pripadnik fenilpiperazina, nema dopaminergična i adrenergična svojstva, već je agonist serotoninskih 5-HT receptora i inhibitor ponovnog unosa serotonina (8). TFMPP i njegov benzilpiperazinski srodnik, m-klorofenilpiperazin (mCPP) su supstrati serotoninskog transportera (SERT) i pri većim koncentracijama potiču otpuštanje endogenog serotonina iz presinaptičkih neurona na sličan način kao MDMA (17).

Piperazinski derivati su se na tržištu rekreativnih droga u većem broju pojavili zadnjih desetak godina. Traženi su zbog učinaka nalik onih amfetamina i MDMA. Njihova zlouporaba je prvi put prijavljena 1990-ih u SAD-u i Skandinaviji odakle se uskoro njihova pojavnost proširila po Europi i Australaziji (8).

### 1.2.1.7. Aminoindani

Aminoindani su sintetski psihostimulansi nastali ciklizacijom etilaminskog lanca amfetamina u indanski ili tetralinski biciklički prsten (18). Najjednostavniji aminoindan je 2-aminoindan (2-AI) - rigidni analog amfetamina (Slika 17), uz kojeg se kao NPD najčešće zloupotrebljavaju 5-jodo-2-aminoindan (5-IAI) i 5,6-metilendioksi-2-aminoindan (MDAI) (10).



**Slika 17.** 2-aminoindan

Aminoindani imaju potentne i vrlo selektivne učinke na otpuštanje i ponovni unos serotonina, ali su za razliku od MDA i MDMA manje neurotoksični, vjerojatno jer ne uzrokuju inhibiciju ponovnog unosa serotonina u presinaptički neuron ni serotoninsku terminalnu degeneraciju (19, 20).

MDAI je indirektni derivat metilendioksiamfetamina (MDA). Osim otpuštanja i inhibicije ponovnog unosa serotonina, inhibira i ponovni unos noradrenalina i dopamina te se prodaje kao legalna zamjena za MDMA. Nakon uvrštavanja mefedrona na listu zabranjenih droga 2010. godine, MDAI se počeo reklamirati i konzumirati kao legalna alternativa mefedronu. Uzrokuje euforiju, empatiju, povećava osjetilne podražaje, a konzumenti opisuju i spiritualna iskustva (20).

Na tržištu droga aminoindani se nalaze u obliku praška i kristala, a obično se konzumiraju gutanjem, ali i šmrkanjem (10).

### 1.2.1.8. Halucinogeni po uzoru na psilocibin i LSD

Triptamini su halucinogene droge, monoaminski alkaloidi čiji su najpoznatiji predstavnici dietilamid lizerginske kiseline (LSD) i psilocibin.

U ljudskom organizmu triptamini imaju važnu ulogu, primjerice serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je fiziološki neurotransmiter i hormon koji regulira i modulira mnoge procese u središnjem živčanom sustavu (21, 22).

Sintetski triptamini su se na tržištu droga pojavili 1990-ih (10). U usporedbi s pojavnošću ostalih NPD na tržištu droga, vrlo su malo zastupljeni, što je neobično s obzirom da se jednostavno mogu sintetizirati iz lako dostupnih prekursora. Ipak, nakon 2010. godine povećan je broj zapljena i njihova zlouporaba.

Prvenstveno uzrokuju halucinacije, posredovane agonizmom za serotoninске 5HT<sub>1A</sub> i 5HT<sub>2A</sub> receptore. U usporedbi s fenetilaminima, imaju više halucinogena nego stimulirajuća i entaktogena svojstva. Psihoaktivni učinak ispoljava se već nakon nekoliko minuta od primjene djelotvornih doza, a zbog velike potentnosti nerijetko uzrokuju intoksikaciju i fatalne ishode.

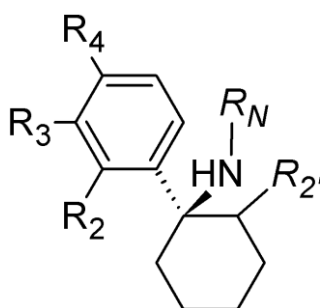
Na tržištu NPD najčešće su tri podskupine triptamina: jednostavni triptamini (bez modifikacije indolskog prstena), te triptamini s modifikacijama indolskog prstena na položajima 4 i 5 (22).

Mnogi triptamini sa supstituentima na položaju 4 indolskog prstena imaju jači noradrenergični učinak i oralno su aktivni. Učinci su slični kao kod konzumacije psilocibina, uzrokuju vizualne halucinacije, euforiju, povećan libido, energiju, poboljšanu kogniciju i povećano uživanje u glazbi. Sintetski triptamini sa supstituentima na položaju 5 imaju veću potentnost od ostalih triptamina, ali ispoljavaju slične učinke (8, 22).

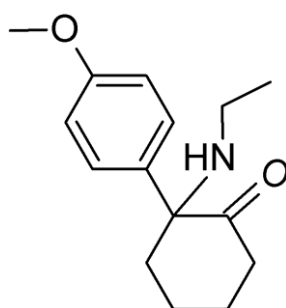
### 1.2.1.9. Disocijativne supstancije nalik na ketamin i fenciklidin

Arilcikloheksilamini su disocijativni anestetici koji u subanestezijskim dozama mijenjaju percepciju vida i sluha, uzrokuju disocijaciju od okoliša i vlastitog tijela i izostanak reakcije na podražaje (16). Sintetizirani su po uzoru na ketamin i fenciklidin (23).

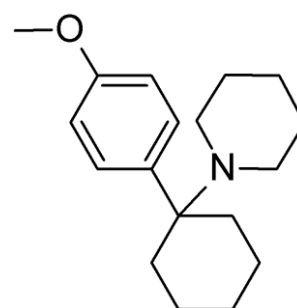
Jezgru arilcikloheksilamina čini benzen povezan s cikloheksanom na kojemu se nalazi amino skupina (Slika 18). U novije vrijeme su na tržištu NPD neke od slijedećih supstancija: metoksetamin, 2-MeO-ketamin, 3-MeO-PCE, 3-MeO-PCP, 4-MeO-PCP.



**Slika 18.** Jezgra arilcikloheksilamina



**Slika 19.** Metoksetamin



**Slika 20.** Metoksidin

Arilcikloheksilamini su prvenstveno selektivni antagonisti NMDA podtipa glutamatnih receptora. U različitoj mjeri blokiraju monoaminske transportere te imaju različiti afinitet za  $\mu$ -opioidne, nikotinske i dopaminske receptore (23).

Psihodelični učinci ketamina, najpoznatijeg arilcikloheksilamina, opisani kao putovanje izvan granica stvarnosti, ovisni su o dozi i očituju se u subanestezijskim dozama, a bihevioralno i neurofiziološki odgovaraju shizofrenoj psihozi. Ovi učinci uključuju anksioznost, agitaciju, promjenu percepcije, poremećaj motoričke funkcije i analgeziju (24).

Metoksetamin (MXE) (Slika 19) ima dugotrajniji i snažniji učinak od ketamina, po čijem je uzoru sintetiziran, ali s manje anestezije i analgezije. Na tržištu se nalazi u obliku praška ili tableta. Konzumira se oralno, ušmrkavanjem, te parenteralno, a zabilježena je i rektalna i sublingvalna primjena. Metoksidin (4-MeO-PCP) je izveden iz fenciklidina (Slika 20), navodno je halucinogenih učinaka (25).

### 1.3. Problematika novih psihoaktivnih droga

Uporaba NPD prisutna je kod različitih skupina kao što su školska djeca, posjetitelji objekata za noćnu zabavu, psihonauti tj. konzumenti halucinogenih supstancija s ciljem postizanja dubljeg uvida u spiritualna iskustva, osobe sklone samoliječenju, željne boljeg radnog učinka ili koje žele poboljšati svoj izgled, zatvorenici te kronični i marginalizirani korisnici droga (5, 26, 27).

Na europskom tržištu prisutna je sve veća raznolikost i količina novih psihoaktivnih droga, a samo u 2014. godini prvi put je otkrivena 101 takva nova tvar (26). Tome pripomaže činjenica što su NPD jeftinija alternativa klasičnim stimulansima ili narkoticima, lako dostupne konzumentima koji ih mogu kupiti putem interneta gdje se reklamiraju kao soli za kupanje, gnojivo za biljke, osvježivači prostora, kemikalije za istraživanje i slično (15).

Sve veći broj NPD na tržištu droga posljedica je i ažurnijeg dopunjavanja listi zabranjenih tvari supstancijama koje se zloupotrebljavaju kao droge, što je i obveza svake države članice EU (6, 25). EMCDDA prikuplja informacije o ovim supstancijama od raznih europskih izvora (policija, carina, mreža forenzičnih laboratorija, sustavi zdravstva, organizatori događaja). Ukupni broj nadziranih NPD od strane EMCDDA u 2015. godini se povećao na preko 560 supstancija, od čega ih je više od 70% otkriveno u zadnjih pet godina. Od tog broja ih je tek polovina kontrolirana zakonom (5).

Istraženost učinaka NPD na ljudski organizam je vrlo ograničena, a malo se zna i o njihovoj genotoksičnosti i kancerogenosti (5). Dosadašnja znanstvena istraživanja toksičnosti temelje se na istraživanjima na životinjama, na fatalnim trovanjima i na kliničkom promatranju intoksiciranih pacijenata. Rizik za konzumente predstavljaju i onečišćenja i ostatna otapala te moguća unakrsna kontaminacija produkata sinteze u laboratorijima koji proizvode i mnoge farmakološki aktivne tvari i kemikalije, a koji se većinom nalaze u Kini i Indiji (10). Pogrešno označavanje i nepoznat sadržaj djelatne tvari dodatno povećava rizik intoksikacije i fatalnih ishoda. Štetni učinci izazvani primjenom ovih supstancija uglavnom su teško prepoznati od strane kliničara, budući da ne postoje brzi probirni testovi za NPD te da je njihova detekcija u biološkim uzorcima zahtjevna i spora (28). Liječnicima na odjelu hitne službe preostaje samo simptomatsko liječenje kardiovaskularnih, gastrointestinalnih, metaboličkih, neuroloških i psihičkih poremećaja, u nadi da će se stanje pacijenta stabilizirati

s eliminacijom toksične tvari iz organizma. Stoga NPD predstavljaju ozbiljan izazov istraživačima i regulatorima zakona u procjeni rizika štete koju mogu uzrokovati i poduzimanju prikladnih mjera kontrole (10).

## **1.4. Određivanje opojnih droga**

Opojne droge, pa tako i nove psihoaktivne droge, mogu se određivati u forenzičnim laboratorijima iz bioloških uzoraka, prikupljenih od strane medicinskog osoblja i policije, i iz zaplijenjenog materijala, oduzetog od strane policijskih službenika sa sumnjom da se radi o opojnoj drogi, sukladno Zakonu o kaznenom postupku (29, 30).

### **1.4.1. Određivanje opojnih droga u zaplijenjenom materijalu**

Zaplijenjeni materijal može biti tvar ili materijal koji je policijski službenik zaplijeni od pojedinca sa sumnjom da se radi o drogi, i prosljedi forenzičnom laboratoriju u kojem se vrši njihova identifikacija, tj. vještačenje (30). Određivanje opojnih droga u zaplijenjenom materijalu manje je zahtjevno od određivanja iz bioloških uzoraka, zbog odsustva metabolita opojnih droga, interferencija s organskim sastojcima prisutnim u biološkim uzorcima, te drugih tvari i njihovih metabolita iz hrane i pića.

### **1.4.2. Određivanje opojnih droga u biološkim uzorcima**

Biološki uzorci su tkiva i biološke tekućine. Tkiva se izuzimaju i analiziraju u mrtvih osoba, a biološke tekućine samo ako su dostupne. U živih osoba izuzimaju se i analiziraju biološke tekućine (urin, slina, krv) te rjeđe kosa, nokti i stolica (29). Najčešće analizirane biološke tekućine živih osoba su urin i krv. Određivanje opojnih droga u biološkim uzorcima otežano je zbog njihovog metabolizma u organizmu, i interferencija s drugim biološkim molekulama uzorka iz kojih se određuju, kao i s metabolitima ostalih tvari unesenih u organizam, poput hrane, pića i lijekova.

#### **1.4.2.1. Urin**

Urin je uz krv najpogodniji uzorak za analizu opojnih droga, zbog svoje prirode (vodena otopina) i neinvazivnosti prikupljanja te sadržaja metabolita konzumiranih supstancija, a ponekad i nepromijenjene konzumirane tvari. Dostupan je u velikom volumenu i obično sadrži veće koncentracije opojnih droga nego krv. Za toksikološku analizu prikuplja se 50 mL uzorka, u zapečaćeni, sterilni spremnik, bez dodatka konzervansa. Uzorak bi se trebao prikupiti što je prije moguće, prije primjene drugih lijekova ukoliko je osoba

zaprimljena u bolnicu zbog narušenog zdravstvenog stanja uzrokovanog zlouporabom opojnih droga (31).

#### **1.4.2.2. Krv**

Krv je biološki uzorak koji se u toksikološkoj analizi najčešće koristi kao referentni uzorak (4). Prikuplja se minimalno invazivnim postupkom, a uspješnost detekcije opojne droge u uzorku krvi ovisi o proteklom vremenu od primjene droge, farmakokinetici droge te interferencijama s lijekovima primijenjenim za vrijeme liječenja intoksiciranog pacijenta.

Koncentracija opojnih droga u krvi, plazmi ili serumu općenito pokazuje najbolju korelaciju s njihovim učincima na ljudski organizam pa se ovi uzorci najčešće koriste za kvantitativno određivanje i temelj su definiranja farmakoloških učinaka i određivanje toksičnih doza opojnih droga, a tako i NPD (8).



## 1.5. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je analitička metoda razdvajanja analita iz smjese, a temelji se na razdiobi analita između dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Najčešće korištena metoda ekstrakcije analita iz bioloških uzoraka u toksikološkim laboratorijima je ekstrakcija tekuće-tekuće (*engl.* liquid-liquid extraction, LLE), a prihvaćena je i ekstrakcija na čvrstom nosaču (*engl.* solid phase extraction, SPE). Ekstrakcijske metode provode se za pripremu uzoraka za kvalitativno i kvantitativno određivanje analita kromatografskim metodama.

Kromatografske tehnike kojima se mogu identificirati i kvantificirati analiti u ekstrakcijom pripremljenim biološkim uzorcima su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC), plinska kromatografija (*engl.* gas chromatography, GC) te vezane tehnike plinske kromatografije sa spektrometrom masa (*engl.* gas chromatography – mass spectrometry) i tekućinske kromatografije sa spektrometrom masa (*engl.* liquid chromatography – mass spectrometry, LC-MS) (4).

## 1.6. Plinska kromatografija

Kromatografija je najčešće korištena metoda koja omogućuje razdvajanje, identifikaciju i određivanje analita u kompleksnim smjesama. Svim kromatografskim metodama zajedničko je prisustvo mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne) faze. Sastojci uzorka nošeni tokom mobilne faze prolaze kroz stacionarnu fazu, a razdvajanje se temelji na različitoj brzini gibanja komponenti nošenih mobilnom fazom i posljedica je različitog afiniteta analita prema stacionarnoj fazi. Kromatografska metoda u osnovi može biti kolonska ili plošna. Kod kolonske kromatografije stacionarna faza se nalazi u uskoj cjevčici, a mobilna se faza potiskuje kroz cjevčicu djelovanjem gravitacije ili povećanog tlaka.

S obzirom na prirodu mobilne faze, kolonska kromatografija može biti plinska (*engl.* gas chromatography, GC), tekućinska (*engl.* liquid chromatography, LC) i kromatografija superkritičnim fluidom (*engl.* supercritical fluid chromatography, SFC).

Plinska kromatografija (GC) je najčešće korištena tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koje je moguće prevesti u plinovito stanje bez da se raspadnu pri temperaturama od nekoliko stotina Celzijevih stupnjeva. Temelji se na razdvajanju analita

između plinovite mobilne faze i tekuće faze imobilizirane na inertnom nosaču stijenki kapilarne cjevčice (kapilarne kolone). Mobilna faza je plinovita i kemijski inertna (helij, dušik, vodik) (30). Upareni uzorak injektira se kroz injektor na početku kolone i prolazi kroz nju nošen mobilnom fazom pod povišenim tlakom. Sastojci uzorka se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava razdvajaju na kromatografskoj koloni i dolaze do detektora u različitom vremenu.

### **1.7. Spektrometrija masa**

Spektrometrija masa (*engl.* mass spectrometry, MS) je tehnika kojom je moguće odrediti analit koji se u spektrometru masa ionizira pri čemu nastaju molekularni ioni i nabijeni fragmenti koji ulaze u magnetski analizator gdje im se pod djelovanjem jakog magnetskog polja može zakrenuti putanja ovisno o omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Tako ionizirani spojevi dolaze na detektor gdje nastaje električni signal u obliku omjera  $m/z$  koji se zapisuje na pisaču (4).

### **1.8. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa, GC-MS**

Plinska kromatografija sa spektrometrom masa (GC-MS) je zlatni standard kod kvantitativne i kvalitativne forenzične i kliničke analize lijekova, sredstava ovisnosti i bioloških uzoraka. Plinska kromatografija je pogodna za odjeljivanje i kvantifikaciju smjesa, a spektrometar masa za kvalitativnu analizu. Karakteristični podaci dobiveni korištenjem GC-MS su vrijeme zadržavanja i površina ispod pika koja je proporcionalna količini sastojka (4). Omogućuje najučinkovitije razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih i poluhlapljivih metabolita u biološkim uzorcima. Pogodna je za provedbu kemijske derivatizacije uzorka, pri čemu se poboljšava hlapljivost i termička stabilnost komponenti uzorka. Elektronska ionizacija kod GC-MS je prilično reproducibilna, a karakteristični i konstantni produkti fragmentacije komponenti uzorka olakšavaju strukturalnu identifikaciju pretraživanjem biblioteka referentnih spektara kao što su baze spektara NIST (*engl.* National Institute of Standards and Technology), EPA (*engl.* Environmental Protection Agency), Wiley i SWGDRUG (*engl.* Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs). Sprega kromatografskih i spektrometrijskih tehnika povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost. Zbog niskog limita detekcije pogodnija je od klasičnih kvantifikacijskih biokemijskih metoda (33).

## **2. CILJEVI**

**Ciljevi ovog istraživanja su:**

1. Kvalitativno dokazati prisutnost NPD u biološkim uzorcima osoba suspektnih na konzumaciju NPD korištenjem GC-MS metode.
2. Identificirati NPD u biološkim uzorcima osoba suspektnih na konzumaciju NPD korištenjem GC-MS metode, odnosno usporedbom spektara masa analiziranih uzoraka s bazama spektara masa DD2015, PMW\_tox3, SWGDRUG3, SWGDRUG4 i SWGDRUG5.
3. Usporediti m/z vrijednosti i retencijska vremena referentnih standarda NPD sa spektrometrima masa bioloških uzoraka osoba suspektnih na konzumaciju NPD pribavljenih GC-MS metodom.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Ispitanici i uzorci**

Ispitanici su bili posjetitelji festivala elektronske glazbe „Ultra Europe“ koji se održao u Splitu, u srpnju 2015. godine, koji su zatražili medicinsku pomoć. Po prijemu na Zavod za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije pacijentima je pružena medicinska pomoć te su izuzeti uzorci urina i/ili krvi za toksikološku i biokemijsku analizu. Uzorci su pohranjeni u prikladne spremnike i čuvani u hladnjaku na +4°C do analize. Osigurana je tajnost osobnih podataka, uzorci su šifrirani i analizirani. Prikupljeni su i analizirani uzorci urina i/ili seruma 52 ispitanika i njihov naziv ne odgovara laboratorijskim brojevima pod kojima su zavedeni u Kemijsko-toksikološkom laboratoriju Kliničkog odjela za sudsku medicinu, Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

Uzorci su obrađeni različitim metodama ekstrakcije, primjerice tekuće-tekuće i ekstrakcija na čvrstom nosaču (različiti nosači) (4).

### **3.2. Referentni standardi novih psihoaktivnih droga**

Referentne standarde novih psihoaktivnih droga predstavlja 46 supstancija visoke kemijske čistoće, kupljenih od Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, SAD). Standardi su prikazani u Tablici 1. Njihova skraćena, uobičajena i ulična imena upotpunjena su podacima preuzetim iz Europske baze novih droga (*engl.* European database on new drugs, EDND). Standardi su pripremljeni i analizirani na isti način kao i biološki uzorci i objedinjeni u bazu spektara DD2015 za usporedbu s kromatogramima bioloških uzoraka.

**Tablica 1.** Prikaz kupljenih referentnih standarda NPD od Cayman Chemical (11, 32).

Vrsta NPD	Skraćeno ime	Uobičajeno / ulično ime	Kemijsko ime	Kemijska čistoća
<b>AMINOINDANI</b>				
<b>2-AI</b>		2-aminoindan, SU 8629	2,3-dihidro-1H-inden-2-amin	≥95%
<b>5-IAI</b>		5-jodo-2-aminoindan	2,3-dihidro-5-jodo-1H-inden-2-amin	≥98%
<b>MDAI</b>		-	6,7-dihidro-5H-indeno[5,6-d]-1,3-dioksol-6-amin	≥95%
<b>ARILCIKLOHEKSILAMINI</b>				
<b>3-MeO-PCP</b>		3-metoksifenciklidin	1-[1-(3-metoksifenil)cikloheksil]piperidin	≥98%
<b>4-MeO PCP</b>		4-metoksifenciklidin, metoksidin	1-[1-(4-metoksifenil)cikloheksil]piperidin	≥98%
<b>MXE</b>		metoksetamin, 3-metoksi-2-okso-PCE	2-(etilamino)-2-(3-metoksifenil)cikloheksanon	≥98%
<b>FENETILAMINI</b>				
<b>25 D-NBOMe</b>		2C-D-NBOMe, Cimbi-138	2-(2,5-dimetoksi-4-metilfenil)-N-(2-metoksibenzil)etanamin	≥98%
<b>25 H-NBOMe</b>		2C-H-NBOMe	2-(2,5-dimetoksifenil)-N-(2-metoksibenzil)etanamin	≥98%
<b>2C-E</b>		etil-DMPEA	2-(2,5-dimetoksi-4-etilfenil)etilamin	≥95%
<b>2C-N</b>		-	2-(2,5-dimetoksi-4-nitrofenil)etanamin	≥98%
<b>KANABINOIDI</b>				
<b>(±)-CP 47,497-C8-homolog</b>		kanabicykloheksanol, CAY10596	rel-2-[(1S,3R)-3-hidroksicikloheksil]-5-(2-metilonan-2-il)fenol	≥98%
<b>5F-AKB48</b>		AKB-48F, 5F-APINACA	N-((3s,5s,7s)-adamantan-1-il)-1-(5-fluoropentil)-1H-indazol-3-karboksamid	≥98%
<b>AB-FUBINACA</b>		-	N-[(1S)-1-(aminokarbonil)-2-metilpropil]-1-[(4-fluorofenil)metil]-1H-indazol-3-karboksamid	≥98%
<b>ADB-PINACA</b>		Sirius	N-[1-(aminokarbonil)-3,3-dimetilpropil]-1-pentil-1H-indazol-3-karboksamid	≥98%
<b>AM-2201</b>		-	[1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-1-naftalenilmetanon	≥98%
<b>AM-2233</b>		-	(2-jodofenil)[1-[(1-metil-2-piperidinil)metil]-1H-indol-3-il]metanon	≥98%
<b>AM-694</b>		-	1-[(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-2-jodofenilmetanon	≥95%
<b>JWH-007</b>		-	(2-metil-1-pentil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥98%
<b>JWH-016</b>		-	(1-butil-2-metil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥95%
<b>JWH-018</b>		-	(1-pentil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥98%
<b>JWH-019</b>		-	[5-(2-fluorofenil)-1-pentil-1H-pirol-3-il]-1-naftalenilmetanon	≥96%

**Tablica 1. nastavak**

<b>JWH-073</b>	-	(1-butil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥97%
<b>JWH-081</b>	-	(4-metoksi-1-naftalenil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanon	≥98%
<b>JWH-122</b>	-	(4-metil-1-naftalenil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanon	≥98%
<b>JWH-200</b>	-	[1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il]-1-naftalenilmetanon	≥98%
<b>JWH-210</b>	-	(4-etil-1-naftalenil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanon	≥98%
<b>JWH-250</b>	-	1-(1-pentil-1H-indol-3-il)-2-(2-metoksifenil)etanon	≥98%
<b>JWH-251</b>	-	2-(2-metilfenil)-1-(1-pentil-1H-indol-3-il)etanon	≥98%
<b>JWH-307</b>	-	(5-(2-fluorofenil)-1-pentilpirol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥98%
<b>JWH-398</b>	-	(4-kloronaftalen-1-il)(1-pentilindolin-3-il)metanon	≥95%
<b>WIN-48,098</b>	pravadolil	(4-metoksifenil)-[2-metil]-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il]metanon	≥98%
<b>KATINONI</b>			
<b>2-FMC</b>	2-fluorometkatinon	1-(2-fluorofenil)-2-(metilamino)propan-1-on	≥98%
<b>3,4-DMMC</b>	3,4-dimetilmetkatinon	1-(3,4-dimetilfenil)-2-(metilamino)propan-1-on	≥98%
<b>4-MEC</b>	metiletkatinon, 4-MEC	2-etilamino-1-(4-metilfenil)propan-1-on	≥98%
<b>BUFEDRON</b>	MABP	2-(metilamino)-1-fenilbutan-1-on	≥98%
<b>ETKATINON</b>	etilpropion, N-etilkatinon, Eth-Cat, RMI 8201A	2-etilamino-1-fenilpropan-1-on	≥98%
<b>MDPV</b>	MDPK	1-(1,3-benzodioksol-5-il)-2-pirolidinilpentan-1-on	≥98%
<b>MEFEDRON</b>	4-metilmetkatinon, 4-metilefedron, 4-MMC, 4-MeMC	2-(metilamino)-1-(4-metilfenil)propan-1-on	≥98%
<b>METEDRON</b>	metoksifedrin, 4-metedron, bk-PMMA, PMMC	1-(4-metoksifenil)-2-(metilamino)propan-1-on	≥98%
<b>METILON</b>	bk-MDMA, M1, MDMCAT, MDMC, Explosion	1-(1,3-benzodioksol-5-il)-2-(metilamino)propan-1-on	≥98%
<b>METKATINON</b>	Ephedrine, DL-Ephedrone, Cath, Jeff	2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-on	≥98%
<b>PENTILON</b>	βk-MBDP	1-(1,3-benzodioksol-5-il)-2-(metilamino)pentan-1-on	≥98%
<b>PIPERAZINI</b>			
<b>BZP</b>	1-benzilpiperazin, A2, Legal E, Legal X, Legal XTC	1-(fenilmetil)piperazin	≥98%
<b>m-CPP</b>	Arleqin, Duhovka, Rainbow, Rolls Royce	1-(3-klorofenil)piperazin	≥98%
<b>TRIPTAMINI</b>			
<b>4-OH DiPT</b>	4-hidroksi-N,N-diizopropiltriptamin	3-[2-[bis(1-metiletil)amino]etil]-1H-indol-4-ol	≥95%
<b>5-MeO DiPT</b>	5-metoksi-N,N-diizopropiltriptamin, Foxy Methoxy, Foxy	5-metoksi-N,N-bis(1-metiletil)-1H-indol-3-etanamin	≥98%



### **3.3. Kemikalije**

U ovom istraživanju korištene su slijedeće kemikalije:

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Heksan p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev volframat, Merck, Darmstadt, Njemačka

BSTFA + 1% TMCS, Supelco, Sigma Aldrich, SAD

Voda, redestilirana, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

### **3.4. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa, GC–MS**

Ekstrakti su analizirani korištenjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010. Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCMS Solution računalnim programom. Korištena je kapilarna kolona plinskog kromatografa Restek, RTx–5MS, dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25  $\mu\text{m}$  (4).

### 3.4.1. Radni uvjeti GC–MS kromatografske metode

Kromatografska analiza pripremljenih ekstrakata uzoraka i referentnih standarda izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa, metodom koja omogućuje istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (*engl.* Total Ion Chromatogram, TIC) u području od 40 – 600 m/z. Optimiran je temperaturni program (4).

Optimalni radni uvjeti:

- volumen injektiranja            1  $\mu$ L (*splitless*)
- temperatura injektora            250 °C
- protok plina nosioca            1,5 mL/min

Ukupno trajanje temperaturnog programa je 37 minuta na sljedeći način:

1. 90 °C izotermno            3 minute
2. 20 °C /min do 270 °C            25 minuta
3. 270 °C izotermno            9 minuta

#### **4. REZULTATI**

Rezultati pribavljeni analizom referentnih standarda i bioloških uzoraka GC-MS metodom prikazani su tablicama i grafički.

U Tablici 2. su prikazane vrijednosti omjera mase i naboja ( $m/z$ ) i retencijska vremena ( $t_R$ ) referentnih standarda iz Tablice 1.

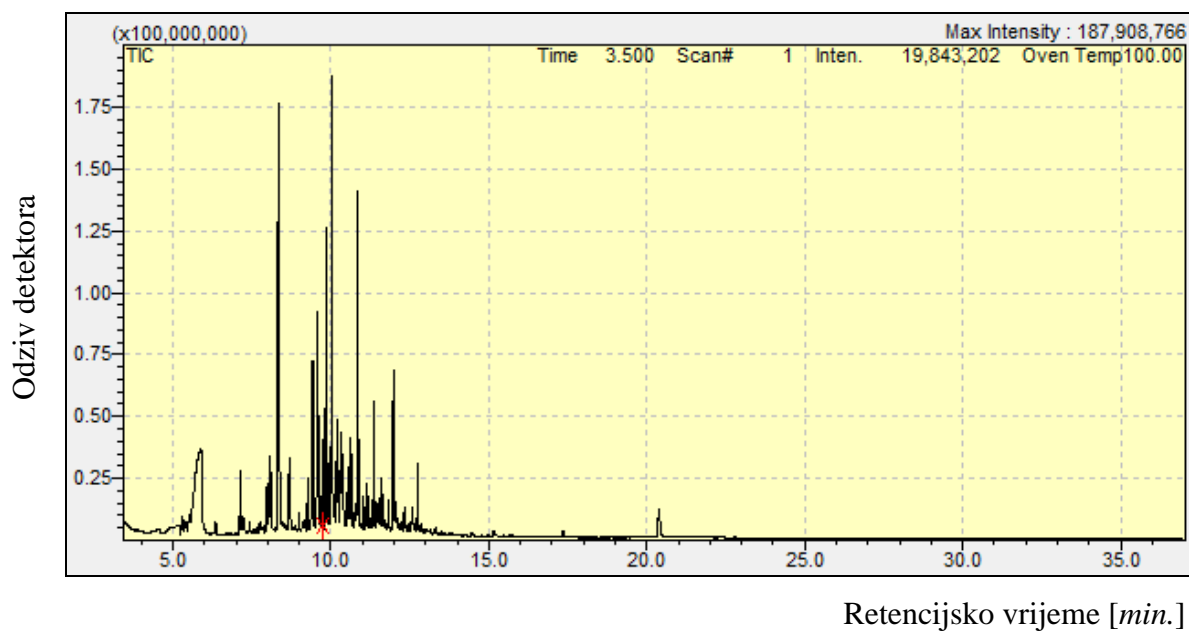
Grafički su prikazani kromatogrami bioloških uzoraka, karakteristični spektri masa bioloških uzoraka i njihova usporedba sa spektrima iz baza spektara.

U grafičkom prikazu kromatograma na apscisi se prikazuje retencijsko vrijeme ( $t_R$ ) u minutama, a predstavlja vrijeme izlaska karakterističnog signala na detektor. Na ordinati se prikazuje odaziv detektora, odnosno intenzitet signala.

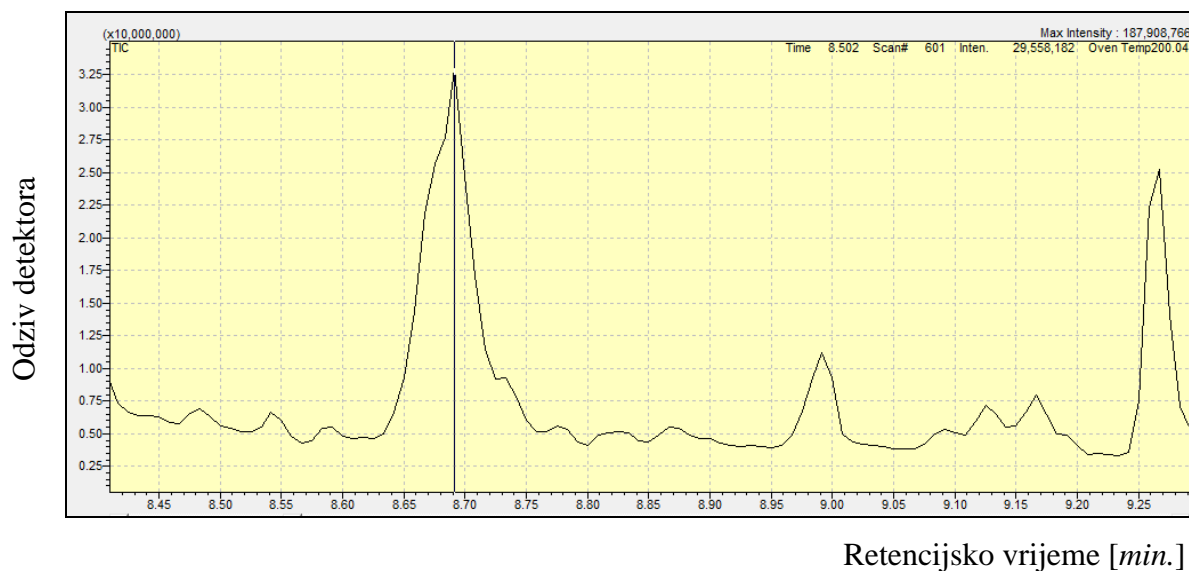
U grafičkom prikazu karakterističnog spektra masa na apscisi se prikazuje omjer mase i naboja ( $m/z$ ) molekulskih fragmenata pristiglih na detektor, a na ordinati odaziv detektora, odnosno intenzitet signala. Vrijednosti  $m/z$  prikazuju se redom od većeg intenziteta prema manjem.

**Tablica 2.** Prikaz retencijskih vremena ( $t_R$ ) i omjera mase i naboja ( $m/z$ ) analiziranih referentnih standarda novih psihoaktivnih droga GC-MS metodom iz Tablice 1.

Skraćeno ime NPD	$t_R$	$m/z$				
2-AI	7,292	133	116	91	132	115
5-IAI	9,258	259	115	117	242	105
MDAI	8,825	160	177	149	130	135
3-MeO-PCP	11,733	230	272	273	121	166
4-MeO PCP	9,308	188	160	159	129	173
MXE	10,658	190	219	134	176	218
25 D-NBOMe	13,458	121	150	166	91	122
25 H-NBOMe	13,208	121	150	91	122	151
2C-E	9,433	180	165	209	179	91
2C-N	10,925	197	167	120	180	149
(±)-CP 47,497-C8-homolog	15,325	215	233	216	81	322
5F-AKB48	25,483	233	345	145	294	383
AB-FUBINACA	21,158	109	253	324	325	254
ADB-PINACA	16,292	215	300	145	216	271
AM-2201	27,433	359	284	232	342	127
AM-2233	29,783	98	70	99	42	231
AM-694	21,675	232	435	220	144	436
JWH-007	24,933	356	155	340	127	298
JWH-016	23,050	341	340	127	155	326
JWH-018	24,067	341	284	214	324	127
JWH-019	26,825	355	284	338	228	127
JWH-073	21,867	327	200	284	310	127
JWH-081	34,733	371	314	354	370	214
JWH-122	28,092	355	298	338	214	354
JWH-200	42,025	100	101	56	386	70
JWH-210	30,550	369	312	352	214	144
JWH-250	18,492	214	144	215	43	116
JWH-251	17,183	214	144	215	43	116
JWH-307	25,500	385	155	384	127	314
JWH-398	30,433	375	318	214	144	358
WIN-48,098	31,917	100	135	56	101	70
2-FMC	7,308	56	42	57	77	161
3,4-DMMC	8,833	58	56	77	59	42
4-MEC	8,350	72	44	91	73	119
BUFEDRON	7,733	72	77	57	42	105
ETKATINON	8,017	72	44	77	73	42
MDPV	11,817	126	84	55	149	97
MEFEDRON	8,008	58	56	91	65	42
METEDRON	9,100	58	56	77	135	92
METILON	9,600	58	56	65	149	121
METKATINON	7,308	58	77	56	51	42
PENTILON	10,383	86	44	87	42	149
BZP	8,633	91	134	176	56	65
m-CPP	9,867	154	156	196	56	138
4-OH DiPT	12,800	114	72	115	260	146
5-MeO DiPT	12,483	114	72	115	160	43

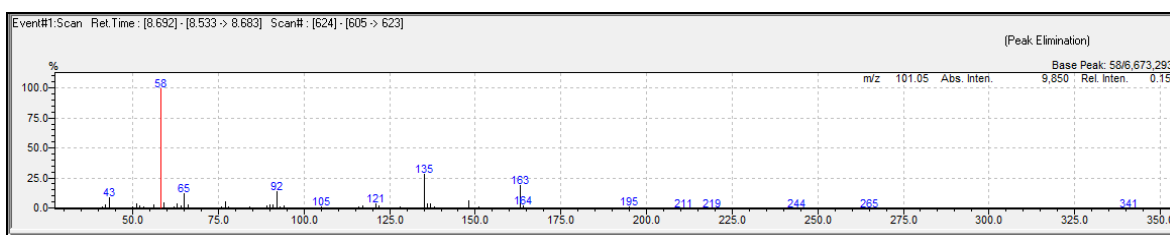


**Slika 21.** Kromatogram (TIC) ekstrahiranog biološkog uzorka urina (Ispitanik br. 43), analiziranog GC-MS metodom.



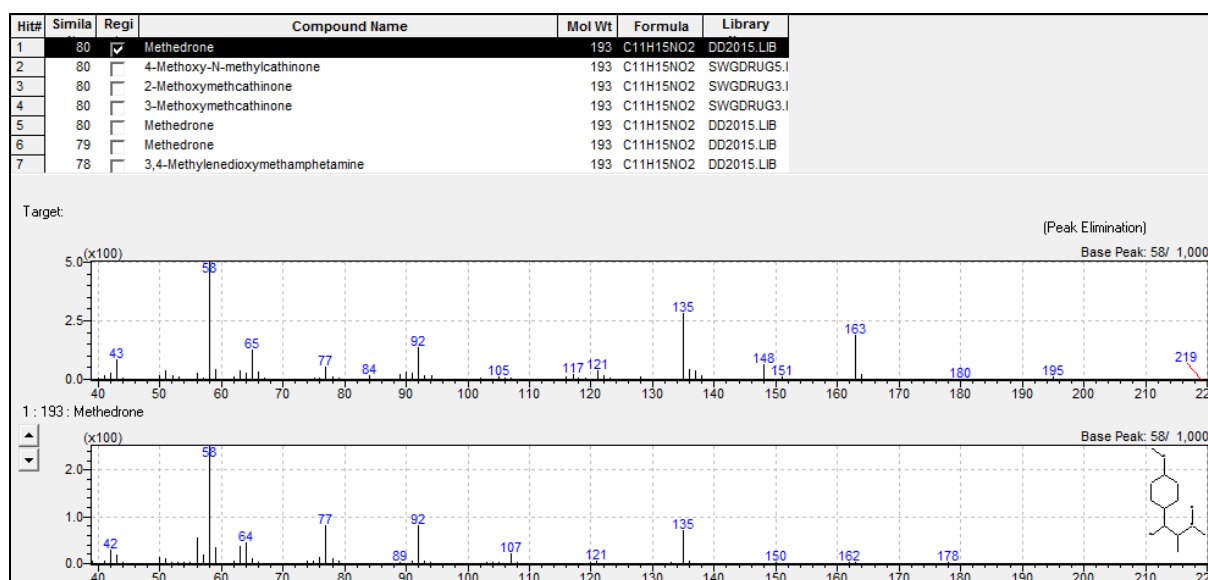
**Slika 22.** Uvećani prikaz dijela kromatograma sa Slike 21, s karakterističnim signalom (vrijeme zadržavanja metedrona,  $t_R=8,692$ ).

Odziv detektora

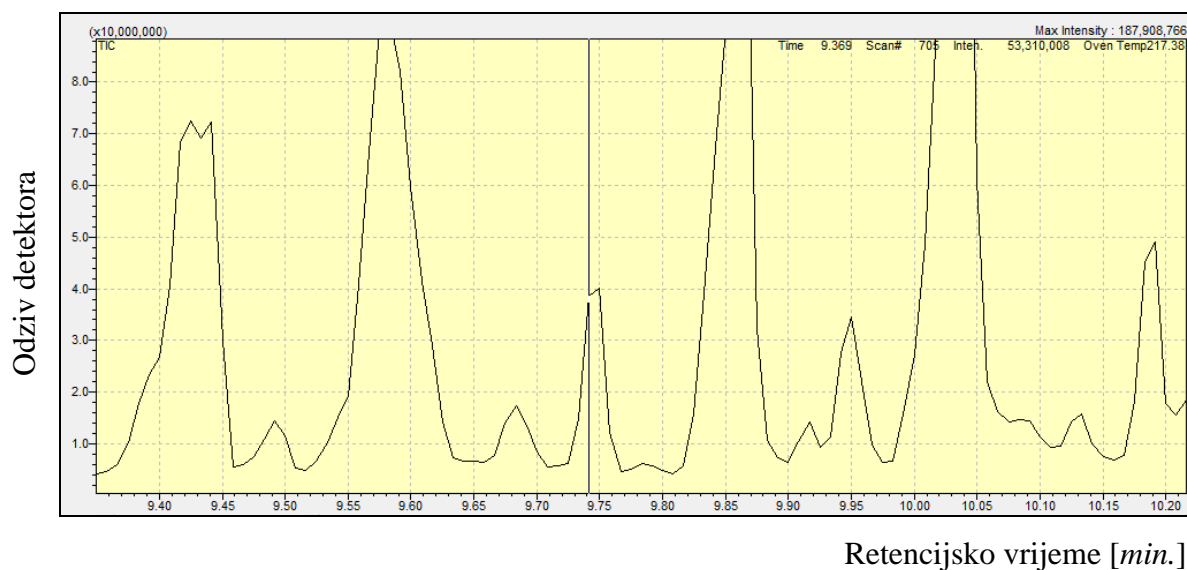


m/z

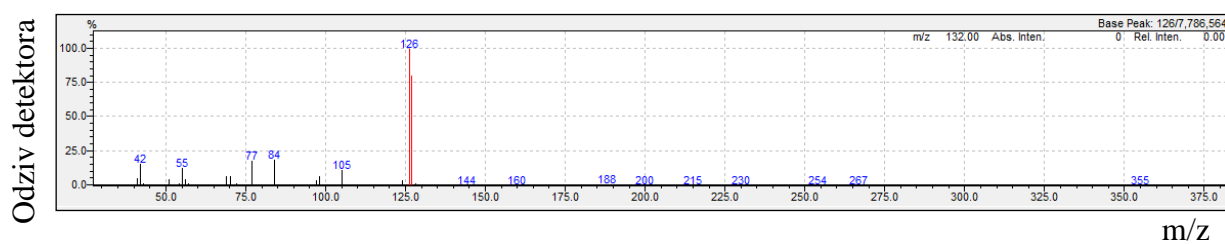
**Slika 23.** Karakterističan spektar masa za metedron (Ispitanik br. 43, uzorak urina,  $t_R=8,692$ ), omjera mase i naboja (m/z).



**Slika 24.** Prikaz rezultata usporedbe kromatograma (Ispitanik br. 43, uzorak urina,  $t_R=8,692$ ) i kromatograma iz baze podataka za metedron (DD2015 baza kromatograma).

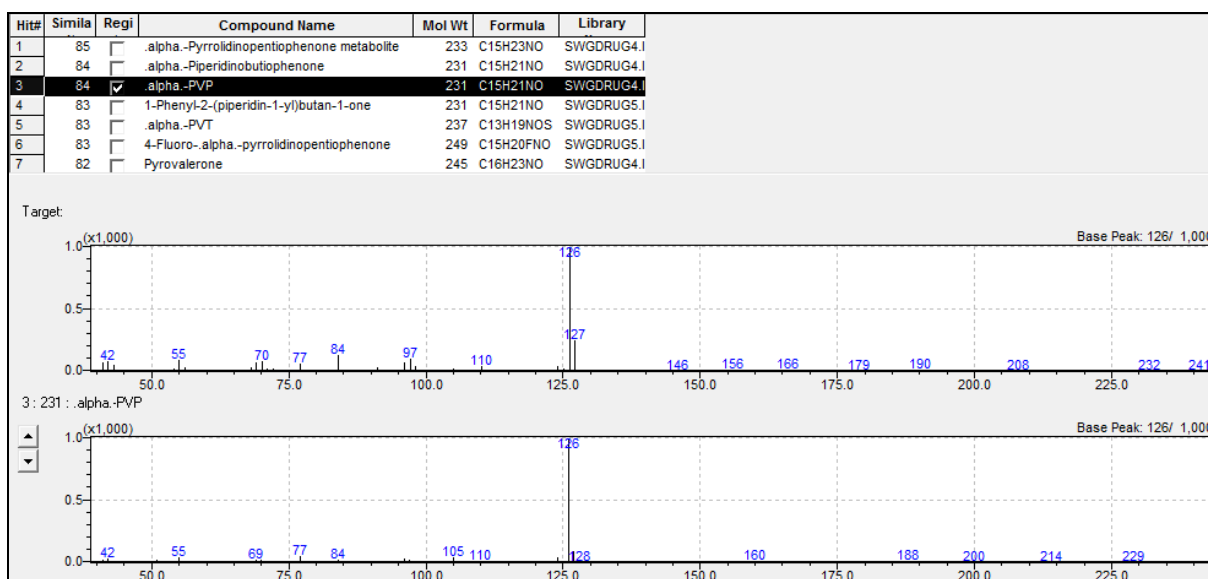


**Slika 25.** Uvećani prikaz dijela kromatograma sa Slike 21, s karakterističnim signalom (vrijeme zadržavanja  $\alpha$ -PVP,  $t_R=9,742$ ).

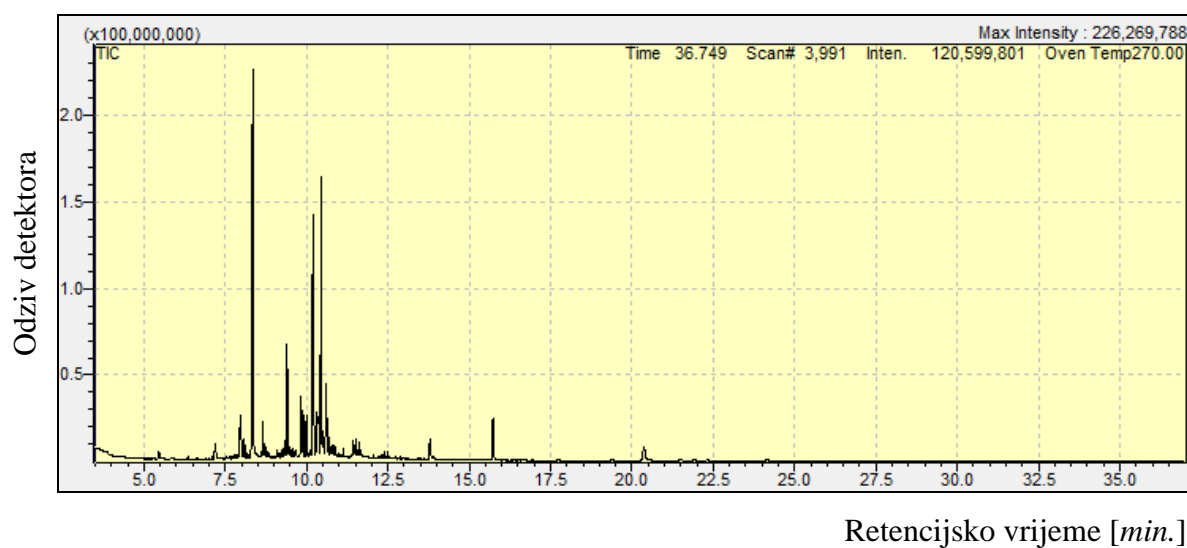


**Slika 26.** Karakterističan spektar masa za  $\alpha$ -PVP (Ispitanik br. 43, uzorak urina,  $t_R=9,742$ ), omjera mase i naboja (m/z).

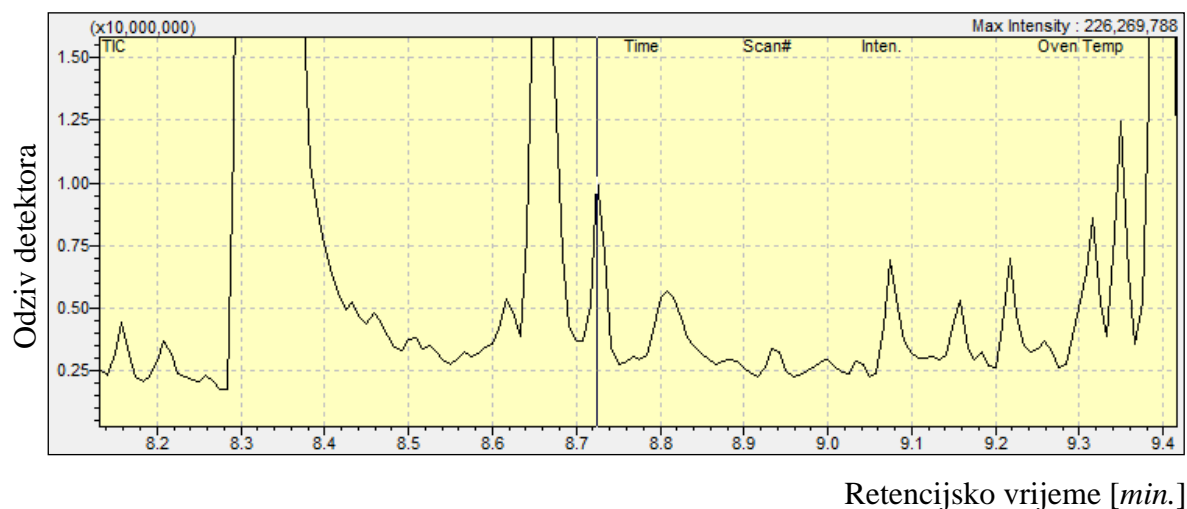




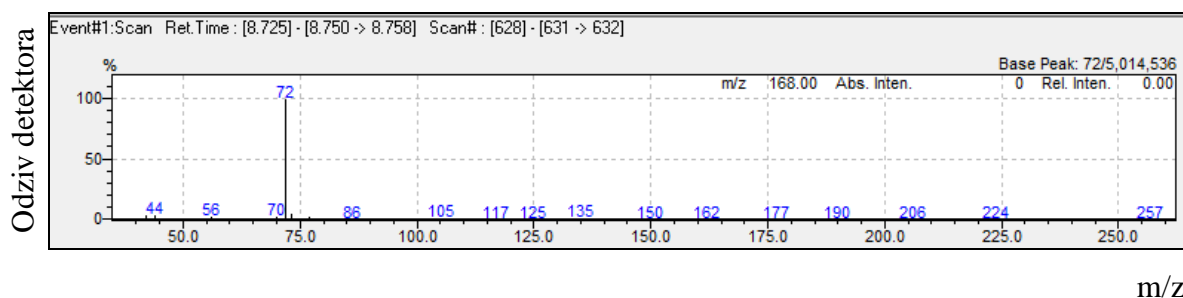
**Slika 27.** Prikaz rezultata usporedbe kromatograma (Ispitanik br. 43, uzorak urina,  $t_R=9,742$ ) i kromatograma iz baze podataka za  $\alpha$ -PVP (SWGDRUG4 baza kromatograma).



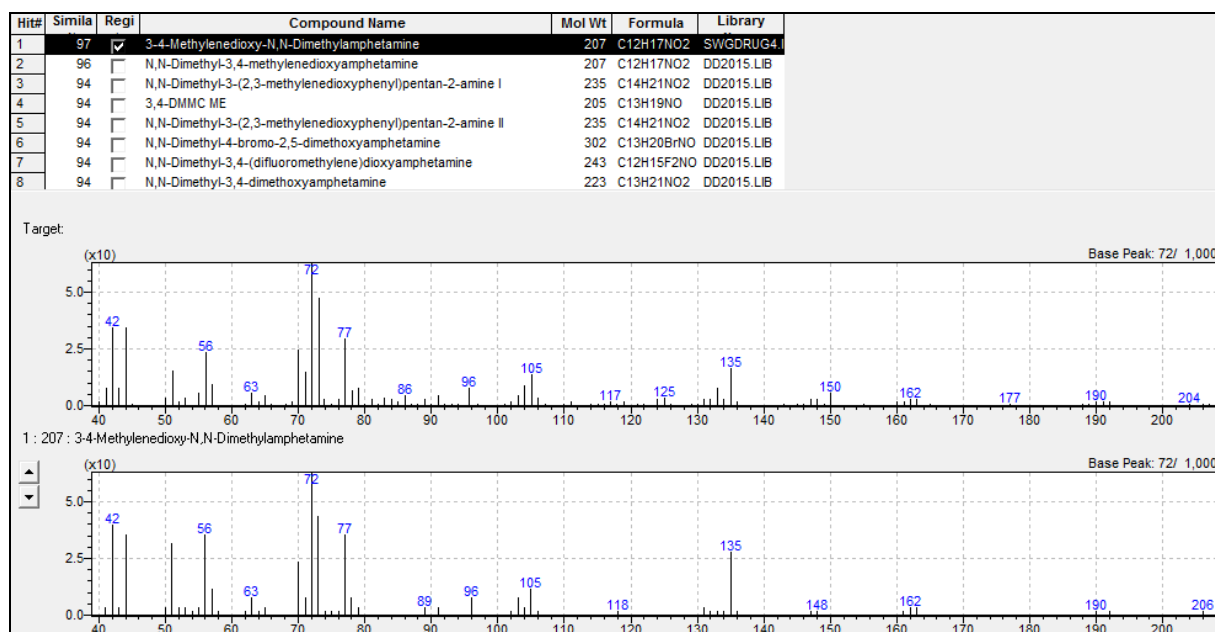
**Slika 28.** Kromatogram (TIC) ekstrahiranog biološkog uzorka urina (Ispitanik br. 30), analiziranog GC-MS metodom.



**Slika 29.** Uvećani prikaz dijela kromatograma sa Slike 28, s karakterističnim signalom (vrijeme zadržavanja MDDMA,  $t_R=8,725$ ).



**Slika 29.** Karakterističan spektar masa za MDDMA (Ispitanik br. 30, uzorak urina,  $t_R=8,725$ ), omjera mase i naboja (m/z).



**Slika 30.** Prikaz rezultata usporedbe kromatograma (Ispitanika br. 30, uzorak urina,  $t_R=8,725$ ) i kromatograma iz baze podataka za MDDMA (SWGDRUG4 baza kromatograma).

## **5. RASPRAVA**

## ***Određivanje novih psihoaktivnih droga u biološkim uzorcima GC-MS metodom***

Stalni priljev raznolikih NPD na tržište droga predstavlja veliki izazov za toksikološke laboratorije. Potrebno je vrijeme da se spektri masa prethodno neprijavljenih supstancija koje se zloupotrebljavaju kao droge uvrste u baze spektara. Razvijanje validiranih metoda analize zahtijev ogroman utrošak vremena, novca i kemikalija. Jednom kad je struktura NPD poznata, potrebno je čekati da se na tržištu pojavi referentni standard kojeg toksikološki laboratorij može kupiti i podesiti metode za određivanje u biološkim uzorcima. Metabolizam takve nove psihoaktivne droge nije poznat, što dodatno otežava i poskupljuje njeno određivanje (potreba za korištenjem enzima koji razgrađuju metabolite koji se izlučuju urinom). Ishodna tvar ne mora biti prisutna u urinu niti u metaboliziranom obliku pa je potrebno koristiti referentne standarde metabolita konzumiranih tvari što opet zahtijeva farmakološka istraživanja i komercijalnu proizvodnju referentnih standarda metabolita, a konačno pojavnost pojedine supstancije na ilegalnom tržištu NPD može biti kratkog vijeka. Male razlike u strukturi značajno otežavaju pouzdano određivanje tvari iste kemijske jezgre, zbog neznatnih razlika u omjerima masa i naboja nakon fragmentacije analita do koje dolazi u spektrometru masa. Mnoge NPD u vrlo niskim dozama iskazuju farmakološke učinke zbog kojih se konzumiraju, ali i toksične učinke, pa je zbog toga moguće da negativni analitički rezultat ne isključuje prisutnost rekreativnih koncentracija ovih tvari (8). Pregledavanjem kromatograma pronalazi se veliki broj signala koji bi mogli biti NPD, ali zbog prethodno neobjavljenih podataka to se ne može sa sigurnošću tvrditi.

### ***Određivanje metedrona***

Analizom kupljenog referentnog standarda metedrona GC-MS tehnikom, proizašao je rezultat  $t_R=9,100$  min. i omjera  $m/z$  58, 56, 77, 135 i 92.

U uzorku urina Ispitanika br. 43 pripremljenog i analiziranog na isti način kao i referentni standard, pri  $t_R=8,692$  min. pojavio se karakterističan signal, s omjerima  $m/z$  58, 135, 163, 92 i 65. Usporedbom dobivenog spektra masa s bazama spektara prikazala se 80% podudarnost s metedronom iz baze spektara DD2015.

Nacionalni forenzični laboratorij Republike Slovenije objavio je svoj referentni spektar za metedron s  $t_R=4,551$  i omjerima  $m/z$  58, 135, 77, 92 i 30 (35).

Wikström i suradnici objavili su rad u kojem su dokazali prisutnost metedrona u postmortem uzorku urina s karakterističnim signalom s retencijskim vremenom približno na 7,85 min. i m/z vrijednostima 58, 77, 135, 92 i 107 (36).

Da bi se NPD pouzdano dokazala GC-MS metodom, potrebno je da se retencijsko vrijeme referentnog standarda i analita približno slaže, a omjeri masa i naboja i njihovi intenziteti u potpunosti podudaraju. Retencijsko vrijeme je slično, ispod 10 minuta, a kod oba se signala pojavljuju m/z vrijednosti 58, 135 i 92. Podudarnost m/z vrijednosti s radom Wikströma i suradnika je još veća i može se zaključiti da je u uzorku urina Ispitanika br. 43 bio prisutan metedron.

### ***Određivanje $\alpha$ -PVP***

U uzorku urina Ispitanika br. 43  $t_R=9,742$  min. pojavio se karakterističan signal, s omjerima m/z 126, 84, 77, 42 i 55. Usporedbom dobivenog spektra masa s bazama spektara se prikazala 84% podudarnost s  $\alpha$ -PVP iz baze spektara SWGDRUG4.

Za  $\alpha$ -PVP nije kupljen referentni standard, ali je dostupan spektar Nacionalnog forenzičnog laboratorija Republike Slovenije s rezultatima  $t_R=5,605$  min. i omjeri m/z 126, 77 i 55 (37). Visoka podudarnost s omjerima m/z prisutna je i u odnosu na rezultate analiza španjolskih, talijanskih i francuskih forenzičnih laboratorija, kod kojih se pojavljuju iste vrijednosti m/z, sličnog intenziteta kao u analiziranom uzorku urina Ispitanika br. 43 (12). Ipak zbog nedostatka standarda, može se samo pretpostaviti, ali ne i dokazati da je Ispitanik br. 43 konzumirao  $\alpha$ -PVP.

### ***Određivanje MDDMA***

Pri pretraživanju baza spektara za kromatogram uzorka urina Ispitanika br. 30 pronađeno je vrlo visoko podudaranje vrijednosti m/z (97%) i retencijskog vremena s fenetilaminom 3,4-metilendioksi-N,N-dimetilamfetamin (MDDMA) (38). Vrijednosti m/z za  $t_R=8,725$  min. iznose 72, 42, 77, 56 i 135.

Thigpen i suradnici ispitivali su određivanje tri regioizomera 3,4-metilendioksiamfetamina GC-MS metodom, među kojima je i MDDMA, i zaključili da vrijednost  $m/z$  72 odgovara iminskom, a 135/136 benzilnom fragmentu, koji su dijelovi jezgre supstituiranih fenetilamina te da sličnost u fragmentima otežava razlikovanje ovih stereoizomera (39). Određeni lijekovi i njihovi metaboliti mogu dati lažno pozitivne nalaze na amfetamine (4). Bez predložene derivatizacije uzorka iz istraživanja Thigpen i suradnika i bez referentnog standarda može se pretpostaviti da je Ispitanik br. 30 vjerojatno konzumirao neki derivat 3,4-metilendioksiamfetamina.

## **6. ZAKLJUČCI**



1. Dokazana je prisutnost metedrona u jednom uzorku urina, usporedbom signala s referentnim standardom metedrona i literaturom.
2. Usporedbom retencijskog vremena i omjera masa i naboja za  $\alpha$ -PVP s bazom spektara SWGDRUG4 i literaturom može se pretpostaviti (nedostaje referentni standard) da je jedan ispitanik konzumirao  $\alpha$ -PVP.
3. U malom postotku slučajeva može se dokazati prisutnost NPD s obzirom na uvijek prisutan nesrazmjer dostupnih referentnih standarda i novih supstancija koje se mogu koristiti kao psihoaktivne droge na ilegalnom tržištu droga.
4. Pretraživanje baza spektara kromatograma korisna je pomoć u pretpostavci konzumirane NPD i može pomoći u odabiru kupnje novih referentnih standarda NPD.
5. Minimalne razlike NPD iste kemijske jezgre otežavaju određivanje GC-MS metodom, čak i kad je referentni standard na raspolaganju.
6. Kvalitativno dokazivanje NPD u biološkim uzorcima GC-MS metodom vrlo je kompleksna procedura koja zahtjeva velik utrošak ljudskih resursa, vremena, novca i kemikalija.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Brlas S. Terminološki opisni rječnik ovisnosti. Virovitica: Zavod za javno zdravstvo "Sveti Rok" Virovitičko-podravske županije (Virovitica: Grafiti Becker); 2011. 226 str.
2. Lüscher C. Opojne droge. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 553-9.
3. Sutlović D. Sredstva ovisnosti. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 59-102.
4. Veršić-Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu; 2015.
5. EU Drug Markets Report: In-Depth Analysis. Luxembourg: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Office of the European Union – Europol Joint publications; 2016.
6. Vlada Republike Hrvatske, Ured za suzbijanje zlouporabe opojnih droga; Nacionalna informacijska jedinica za opojne droge. Protokol o nacionalnom informacijskom sustavu za droge u Republici Hrvatskoj. 2007. 54 str.
7. Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga. Narodne novine, br. 10/2016. Dostupno na: [http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016\\_01\\_10\\_258.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016_01_10_258.html)
8. Dargan PI, Wood DM. Novel psychoactive substances: classification, pharmacology and toxicology. London: Academic Press/Elsevier; 2013.
9. Baumeister D, Tojo LM, Tracy DK. Legal highs: staying on top of the flood of novel psychoactive substances. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2015; 5: 97-132.
10. United Nations Office on Drugs and Crime. The Challenge of New Psychoactive Substances: A Report from the Global SMART Programme. Vienna: UNODC Laboratory and Scientific Section; 2013. Dostupno na: [http://www.unodc.org/documents/scientific/NPS\\_Report.pdf#sthash.qXB1h0Ha.dpuf](http://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_Report.pdf#sthash.qXB1h0Ha.dpuf).
11. Winn P. Dictionary of Biological Psychology. London; New York: Routledge; 2001. 857 str.
12. European database on new drugs: Substances [Internet]. Lisbon: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; [citirano 2016 Aug 3]. Dostupno na: <https://ednd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index7246EN.html>.
13. UN: Convention On Psychotropic Substances [Internet]. Vienna: United Nations; 1971 [citirano 2016 Jul 26]. Dostupno na: [https://www.unodc.org/pdf/convention\\_1971\\_en.pdf](https://www.unodc.org/pdf/convention_1971_en.pdf).

14. Karila L, Megarbane B, Cottencin O, Lejoyeux M. Synthetic cathinones: a new public health problem. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(1):12-20.
15. Liechti M. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Med Wkly*. 2015;145:w14043.
16. Miliano C, Serpelloni G, Rimondo C, Mereu M, Marti M, De Luca MA. Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): Focus on the Rewarding and Reinforcing Properties of Cannabimimetics and Amphetamine-Like Stimulants. *Front Neurosci*. 2016;10:153.
17. Auerbach SB, Kamalakannan N, Rutter JJ. TFMPP and RU24969 enhance serotonin release from rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 1990;190(1-2):51-7.
18. Hill SL, Thomas SH. Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clin Toxicol (Phila)*. 2011;49(8):705-19.
19. Sainsbury PD, Kicman AT, Archer RP, King LA, Braithwaite RA. Aminoindanes -the next wave of 'legal highs'? *Drug Test Anal*. 2011;3(7-8):479-82.
20. Gallagher CT, Assi S, Stair JL, Fergus S, Corazza O, Corkery JM, i sur. 5,6-Methylenedioxy-2-aminoindane: from laboratory curiosity to 'legal high'. *Hum Psychopharmacol*. 2012;27(2):106-12.
21. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neuro-Chirurgie*. 2015;61(2-3):77-84.
22. Tittarelli R, Mannocchi G, Pantano F, Romolo FS. Recreational use, analysis and toxicity of tryptamines. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(1):26-46.
23. ACMD: Methoxetamine report [Internet]. London: Advisory Council on the Misuse of Drugs; 2012 [citirano 2016 Aug 12]. Dostupno na: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/119087/methoxetamine2012.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/119087/methoxetamine2012.pdf).
24. 36<sup>th</sup> ECDD meeting: Ketamine Update Review Report [Internet]. Geneva: Expert Committee on Drug Dependence; 2014 [citirano 2016 Aug 27]. Dostupno na: [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/6\\_2\\_Update.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/6_2_Update.pdf?ua=1).
25. Expert Committee on Drug Dependence: Methoxetamine (MXE), Critical Review Report [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citirano 2016 Aug 12]; Dostupno na: [http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/5.9\\_Methoxetamine\\_CRev.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/5.9_Methoxetamine_CRev.pdf?ua=1).

26. EMCDDA: Europsko izvješće o drogama 2015: Trendovi i razvoj. [Internet]: Luxembourg: Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama; 2015. Dostupno na: <http://emcdda.europa.eu/system/files/publications/974/TDAT15001HRN.pdf>.
27. van Riel AJ, Meulenbelt J, de Vries I. New Drugs of Abuse. EAPCCT abstracts. Clin Toxicol. 2007;45(4): str. 373.
28. Ayres TC, Bond JW. A chemical analysis examining the pharmacology of novel psychoactive substances freely available over the internet and their impact on public (ill)health. Legal highs or illegal highs? BMJ open. 2012;2(4).
29. Riha B. Uzimanje uzoraka za toksikološke analize živih osoba. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 303-10.
30. Tomašek Lj, Bakulić L. Kriminalističko istraživanje, zapljena i analiza sredstva ovisnosti. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 103-18.
31. Flanagan RJ i sur. Basic analytical toxicology. Geneva: World Health Organization; International Program on Chemical Safety; 1995. Dostupno na: [http://www.who.int/ipcs/publications/training\\_poisons/basic\\_analytical\\_tox/en/index6.html](http://www.who.int/ipcs/publications/training_poisons/basic_analytical_tox/en/index6.html).
32. Skoog DA. Fundamentals of analytical chemistry. 8. izd. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole; 2004.
33. Kaluzna-Czaplinska J. Current medical research with the application of coupled techniques with mass spectrometry. Med Sci Monit. 2011;17(5):RA117-23.
34. Forensic Science: Product Search and Drug ID [Internet]. Ann Arbor: Cayman Chemical [citirano 2016 Aug 27]; Dostupno na: <https://www.caymanchem.com/forensics/search>.
35. RESPONSE: NPS and related compounds – analytical reports: methedrone [Internet]. Ljubljana: Ministrstvo za notranje zadeve, Nacionalni forenzični laboratorij; 2016 Mar 11 [citirano 2016 30 Aug]; Dostupno na: [http://www.policija.si/apps/nfl\\_response\\_web/0\\_Analytical\\_Reports\\_final/Methedrone-ID-1326-16-report\\_final.pdf](http://www.policija.si/apps/nfl_response_web/0_Analytical_Reports_final/Methedrone-ID-1326-16-report_final.pdf).
36. Wikstrom M, Thelander G, Nystrom I, Kronstrand R. Two fatal intoxications with the new designer drug methedrone (4-methoxymethcathinone). J Anal Toxicol. 2010;34(9):594-8.
37. RESPONSE: NPS and related compounds - analytical reports: alpha-PVP [Internet]. Ljubljana: Ministrstvo za notranje zadeve, Nacionalni forenzični laboratorij; 2015 Jan 16 [citirano 2016 Aug 26]; Dostupno na:

[http://www.policija.si/apps/nfl\\_response\\_web/0\\_Analytical\\_Reports\\_final/alpha-PVP-ID-%201151-15A-report\\_final.pdf](http://www.policija.si/apps/nfl_response_web/0_Analytical_Reports_final/alpha-PVP-ID-%201151-15A-report_final.pdf).

38. SWGDRUG Monographs: MDDMA [Internet]. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs; 2014 Feb 6 [citirano 2016 Aug 28]; Dostupno na: <http://www.swgdrug.org/Monographs/mddma.pdf>.
39. Awad T, Belal T, Maher HM, DeRuiter J, Clark CR. GC-MS studies on side chain regioisomers related to substituted methylenedioxyphenethylamines: MDEA, MDMMA, and MBDB. *J Chromatogr Sci.* 2010;48(9):726-32.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog eksperimentalnog istraživanja bio je kvalitativno dokazati prisutnost novih psihoaktivnih droga (NPD) u biološkim uzorcima osoba suspektnih na konzumaciju NPD GC-MS metodom, te identificirati NPD u istim uzorcima.

**Materijali i metode:** Biološki uzorci urina i/ili krvi 52 ispitanika suspektnih na konzumaciju NPD i 46 kupljenih referentnih standarda NPD ekstrahirani su na različitim nosačima i analizirani GC-MS metodom istovremenim snimanjem ukupnog ionskog kromatograma u području m/z vrijednosti od 40 do 600, s optimiranim temperaturnim programom za određivanje NPD u biološkim uzorcima, u kemijsko-toksikološkom laboratoriju Kliničkog odjela za sudsku medicinu, Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu. Pikovi kromatograma bioloških uzoraka uspoređivani su s retencijskim vremenom i omjerom masa i naboja analiziranih referentnih standarda NPD. Analizirana je podudarnost karakterističnih signala kromatograma bioloških uzoraka s bazama spektara DD2015, PMW\_tox3, SWGDRUG3, SWGDRUG4 i SWGDRUG5 i raspoloživom literaturom.

**Rezultati:** Dokazana je prisutnost metedrona u uzorku urina Ispitanika br. 43, a vjerojatno je isti konzumirao i  $\alpha$ -PVP, što se ne može sa sigurnošću tvrditi s obzirom na nedostatak referentnog standarda. Ispitanici su vjerojatno konzumirali i druge NPD, ali njihovu prisutnost teško je dokazati zbog nedostatka raspoloživih referentnih standarda NPD.

**Zaključak:** Zbog sve većeg priljeva velikog broja NPD na tržište droga, trud uložen u otkrivanje NPD u biološkim uzorcima nesrazmjeran je rezultatima. Potrebno je razvijanje specifičnijih, bržih i jeftinijih metoda za otkrivanje NPD u biološkim uzorcima.



## **9. SUMMARY**

**Diploma Thesis Title:** Evidence of new psychoactive substances by GC-MS method in urine biological samples

**Objectives:** Aim of this experimental study was qualitative determination of new psychoactive substances (NPS) in biological samples by GC-MS method collected from subjects suspected of NPS consumption, as well as identification of NPS in those samples.

**Materials and methods:** Biological samples of urine and/or blood collected from 52 subjects suspected of NPS consumption as well as 46 bought NPS reference standards were extracted on different carriers and analyzed by GC-MS, at toxicology laboratory of Department of Pathology and Forensic Medicine, University Hospital Centre Split. Analysis was performed by a method that simultaneously records total ion chromatogram in the area of 40-600 m/z, with optimized temperature program for NPS determination in biological samples. Chromatogram peaks of biological samples were compared to the retention times and mass and charge ratios of NPD reference standards. Characteristic signals of chromatograms of biological samples were compared to DD2015, PMW\_tox3, SWGDRUG3, SWGDRUG4 and SWGDRUG5 spectral databases as well as the available literature.

**Results:** Methedrone was detected in a urine sample collected from Subject No. 43 raising suspicion that the subject has also consumed  $\alpha$ -PVP. However, as there is no reference standard for  $\alpha$ -PVP, the consumption could not be confirmed. Subjects probably consumed other NPS, but it is difficult to detect them due to the lack of available NPS reference standards.

**Conclusion:** Due to the increasing influx of numerous NPS on illicit market, efforts invested in NPS detection in biological samples are disproportionate to the results. There is a need for development of more specific, inexpensive and faster methods for NPS detection in biological samples.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Antonia Smoljanović, rođena 20. siječnja 1980. godine u Splitu. Osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju završila u Splitu. Integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije Sveučilišta u Splitu upisala akademske godine 2011./12. Tijekom studija prisutna na stručnim skupovima i kongresima održanim na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu: „11<sup>th</sup> Life Long Learning In Pharmacy Conference“, stručni kongres s međunarodnim sudjelovanjem u lipnju 2016., te „Ljetna škola kliničke farmacije“ stručni skup za magistre farmacije u kolovozu 2016. Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije. Engleskim jezikom služi se kao iskusni korisnik.