

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Martina Bošnjak

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE SINTETSKIH KATINONA

Diplomski rad

Akadska godina: 2017./2018.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Martina Bošnjak

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE SINTETSKIH KATINONA

Diplomski rad

Akadska godina: 2017./2018.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018.

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 53. 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

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE SINTETSKIH KATINONA

Martina Bošnjak, broj indeksa: 98

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za simultano određivanje koncentracija pet sintetskih katinona (bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a) u mokraći, koja podrazumijeva izradu umjernih krivulja te njihovu primjenu na uzorcima u kojima su koncentracije nepoznate.

Materijal i metode: Otopine sintetskih katinona za izradu umjerne krivulje dobivene su serijskim razrjeđivanjem referentnih standarda u mokraći te su zajedno ekstrahirane i pripremljene za analizu. Koncentracije bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a određivale su se u dvama uzorcima mokraće u koje su dodani različiti nepoznati volumeni pripremljenih standardnih otopina. Ekstrahirani su metodom tekuće-tekuće (LLE), razrijeđeni kloroformom i analizirani tehnikom GC-MS snimanjem ukupne ionske struje (TIC).

Rezultati: Kvantitativnom analizom sintetskih katinona pri 4000 ng/mL dobiveni su podaci o njihovim karakterističnim retencijskim vremenima (RT) i spektrima masa. Umjerne krivulje za simultano dokazivanje spomenutih sintetskih katinona uspješno su konstruirane pomoću dobivenih signala ciljanim mjerenjem otopina standarda u mokraći pri koncentracijama 200-4000 ng/mL. U oba biološka uzorka detektirani su svi sintetski katinoni te su očitane njihove nepoznate koncentracije. Prisutnost bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a u oba uzorka mokraće potvrđena je i nakon derivatizacije.

Zaključci: Razvijena je i provjerena GC-MS metoda primjenjiva za simultanu kvalitativnu i kvantitativnu analizu bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a u biološkim uzorcima mokraće. To ima veliku važnost jer se sintetski katinoni brzo šire na globalnom tržištu. Daljnja istraživanja trebala bi uključiti veći broj sintetskih katinona i više vrsta bioloških uzoraka za dokazivanje njihovog prisutstva.

Ključne riječi: sintetski katinoni, nove psihoaktivne supstance, GC-MS, kvantitativno određivanje

Rad sadrži: 56 stranica, 24 slike, 5 tablica, 42 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. prof. dr. sc. Marija Definis-Gojanović | predsjednica Povjerenstva |
| 2. doc. dr. sc. Branka Polić | član |
| 3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović | član-mentor |

Datum obrane: 26. rujna 2018.

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 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.
Technical assistance: Maja Veršić Bratinčević, PhD

QUANTITATIVE DETERMINATION OF SYNTHETIC CATHINONES

Martina Bošnjak, index number: 98

Summary:

Objectives: The objective was to develop a method for simultaneous concentration determination of five synthetic cathinones in urine (buphedrone, mephedrone, DMMC, pentylone and MDPV), which implies plotting calibration curves and applying them to determine unknown concentrations in urine samples.

Material and methods: In order to make the solutions of chosen synthetic cathinones used for creating calibration curves, serial dilution of reference standard solutions was made in a blank urine sample. Synthetic cathinones were extracted jointly and prepared for analysis. After adding different unknown volumes of standard solutions to two urine samples, unknown concentrations were determined. Liquid-liquid technique was used for the extraction of samples, followed by dilution in chloroform to prepare for a GC-MS analysis. The chosen working mode was total ion current (TIC).

Results: Information about retention times (RT) and mass spectra of synthetic cathinones was obtained by qualitative analysis of concentration 4000 ng/mL. Calibration curves were successfully constructed using peak signals obtained by analysing concentrations 200-4000 ng/mL. In both urine samples all synthetic cathinones were detected and their unknown concentrations were determined. Their presence in both urine samples was additionally confirmed after derivatization.

Conclusion: A GC-MS method applicable to simultaneous qualitative and quantitative analysis of buphedrone, mephedrone, DMMC, pentylone and MDPV in urine samples has been developed and tested. Such method development is valuable because synthetic cathinones are spreading rapidly across the global market. Further investigations ought to include more synthetic cathinones, as well as different types of biological samples.

Key words: synthetic cathinones, new psychoactive substances, GC-MS, quantitative determination

Thesis contains: 56 pages, 24 figures, 5 tables, 42 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Marija Definis-Gojanović, PhD, full professor | Chair person |
| 2. Branka Polić, PhD, assistant professor | Member |
| 3. Davorka Sutlović, PhD, full professor | Supervisor |

Defence date: 26th September 2018.

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.

Zahvaljujem dragoj mentorici, profesorici Davorki Sutlović na vodstvu tijekom izrade ovog rada, vrijednim i stručnim savjetima te na omogućenom iskustvu rada u toksikološkom laboratoriju. Veliko hvala i dragoj komentorici Maji Veršić Bratinčević na neizmjernoj strpljivosti, podršci i pomoći pri izradi i pisanju rada.

Hvala mojoj obitelji na ljubavi, podršci i razumijevanju koje su mi pružili tijekom čitavog mog školovanja.

Zahvaljujem Ivi, Antoniji, Ani, Nataši i Jeronimu na svesrdnoj potpori i lijepim trenucima tijekom ovih godina studiranja.

Hvala magistri Gordani Kordić na srdačnosti, strpljivosti, brizi i znanju koje mi je nesebično prenosila kao mentorica tijekom mog početka u ljekarništvu.

Zahvaljujem i dragoj kolegici Loreni Kostrić na nezaboravnim trenucima koje smo zajedno provele tijekom izrade diplomskog rada i pripreme za završne ispite našeg studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Nove psihoaktivne supstance – NPS	3
1.2. Sintetski katinoni	5
1.2.1. Farmakodinamika sintetskih katinona	9
1.2.2. Farmakokinetika sintetskih katinona	9
1.3. Uzorci za analizu	12
1.4. Metode ekstrakcije.....	12
1.4.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće	13
1.5. Plinska kromatografija.....	14
1.6. Spektrometrija masa	15
1.7. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJAL I METODE.....	19
3.1. Kemikalije	20
3.2. Otopine standarda	20
3.3. Biološki uzorci mokraće za toksikološku analizu	21
3.4. Instrumenti.....	22
3.4.1. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa, GC-MS	22
3.4.2. Radni uvjeti GC-MS kromatografske metode	23
4. REZULTATI.....	24
4.1. Kvalitativna analiza sintetskih katinona	25
4.2. Umjerne krivulje sintetskih katinona.....	28
4.3. Simultano određivanje sintetskih katinona u biološkim uzorcima	31
5. RASPRAVA.....	34
6. ZAKLJUČCI.....	37
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	39
8. SAŽETAK.....	45
9. SUMMARY	47
10. ŽIVOTOPIS	49

1. UVOD

Svjetska zdravstvena organizacija definira ovisnost kao psihičko, a ponekad i fizičko stanje, koje je rezultat interakcije živog organizma i sredstva ovisnosti, a karakterizirano je snažnom potrebom za kontinuiranim ili periodičnim uzimanjem supstance kako bi se postigli željeni psihički učinci, odnosno otklonila neugoda nastala apstinencijom. Na dijagnozu poremećaja ovisnosti o drogama upućuje gubitak kontrole nad uzimanjem droge, nesposobnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti, pojava tolerancije te psihička ovisnost. (1)

Prema novom konceptu, pojam *ovisnost* opisuje stanje karakterizirano pojavom tolerancije i simptomima ustezanja. *Tolerancija* nastaje djelovanjem mehanizama prilagodbe, pri dužoj upotrebi droge, kada je potrebna sve veća doza za postizanje istog željenog učinka. (2) Simptomi ustezanja su skup karakterističnih fizičkih znakova koji nastaju kad organizam ostane bez sredstva ovisnosti. (1,3)

Stariji pojam „psihička ovisnost“ zamijenio je pojam „navika“, a odnosi se na kompulzivnu potrebu za uzimanjem droge, iako je osoba svjesna njenog štetnog učinka na zdravlje i društveni život. (1,2)

Europsko izvješće o drogama iz 2017. godine kao trenutno najveće probleme izdvaja raširenu upotrebu kanabisa među mladima i porast dostupnosti kokaina, *ecstasyja* i amfetamina. (4) Međutim, rastući javnozdravstveni problem predstavljaju i nove psihoaktivne supstance, o kojima se sve češće govori u medijima jer su saznanja o opasnosti koju predstavljaju zabrinula javnost, ali i zdravstvene stručnjake. (5)

Izraz „nove“ ne znači nužno da su nedavno otkrivene i sintetizirane, nego da su se u novije vrijeme počele zlorabiti na tržištu droga. (6) Ove supstance uglavnom se percipiraju kao sigurne te se mogu kupiti preko interneta, u specijaliziranim trgovinama za duhanske proizvode, kioscima, benzinskim crpkama, ili preko dobavljača. (7) Često se konzumiraju uz druga sredstva ovisnosti i alkoholna pića, što izaziva teške štetne učinke koji rezultiraju brojim hospitalizacijama i smrtnim slučajevima. (8)

Usprkos zakonima koji zabranjuju njihovu prodaju i distribuciju, zloupotreba se novih psihoaktivnih supstanci nastavlja, naročito među maloljetnim tinejdžerima. (7) U tako osjetljivoj dobi, kada se finalizira razvoj, mlade su osobe posebno podložne učincima novih psihoaktivnih droga te čak mogu izazvati psihijatrijske poremećaje i druge mentalne nedostatke. (8)

1.1. Nove psihoaktivne supstance – NPS

Nove psihoaktivne supstance heterogena su skupina molekula, odnosno spojeva, novosintetiziranih ili dobivenih promjenom kemijske strukture već poznatih ilegalnih droga kao što su kanabis, kokain, MDMA (*ecstasy*) i dietilamid lizerginske kiseline (LSD). (8,9) Većinom se proizvode u Istočnoj Europi, Središnjoj Aziji i Kini pa šalju u Europu i SAD, gdje se prodaju. (8) Poznate su pod nazivom „dizajnerske droge“, koji potječe iz 1980-ih godina i označava tvari sintetizirane u malim kućnim laboratorijima iz dostupnih bezreceptnih (*engl.* Over the counter – OTC) lijekova i kemijskih prekursora. (10) „Spice“, „sol za kupanje“, „Special K“, „biljni tamjan“, „legalna droga“ samo su neka od uličnih imena za široki repertoar novih psihoaktivnih droga. (9)

Definirane su kao nove psihotropne droge, u čistoj formi ili mješavinama, koje nisu kontrolirane konvencijama o drogama Ujedinjenih naroda, ali predstavljaju prijetnju javnom zdravlju, kao i drugi opijati. (6)

Države potpisnice konvencija Ujedinjenih naroda o kontroliranim supstancama obvezne su progoniti i kažnjavati nezakonito posjedovanje, upotrebu i razmjenu supstanci popisanih u tim dokumentima. Da bi određena supstanca bila podložna takvoj kontroli, potrebno ju je precizno evidentirati prema kemijskoj strukturi i dokazanom riziku koji predstavlja za ljudsko zdravlje. (11) Međutim, neprestano se sintetiziraju novi, zamjenski analozi tih molekula koji zaobilaze spomenutu regulatornu mjeru. (12) Za to je dovoljna i najmanja promjena kemijske strukture, poput dodatka bočnog lanca ili supstitucije. (13) Statistički podaci pokazuju kako se u prosjeku svaki tjedan na europskom tržištu pojave nove dvije molekule NPS-a, što znači da ih je nemoguće istim tempom zakonski regulirati. (14) Isto tako, kada neka nova psihoaktivna supstanca stupi na tržište, njeni su željeni učinci i nuspojave uglavnom nepoznati. (8) Državne su vlasti pokušale stati na kraj tom rapidnom pojavljivanju novih droga tako što su donijele na snagu novi akt koji zabranjuje bilo kakve supstance za konzumaciju kod ljudi koje imaju sličnu kemijsku strukturu i farmakološko djelovanje kao kontrolirane supstance. Kako bi zadržali status „legalnih droga“, proizvođači novih psihoaktivnih supstanci imaju novu taktiku za izbjegavanje kaznenog progona, a to je razvoj spojeva s minimalnom strukturalnom analogijom i pakiranje uz natpise „nije za konzumaciju kod ljudi“, „opasnost i toksičnost nisu ispitane“ i „kemikalije za istraživanje“. (10,15,16)

Nove psihoaktivne supstance najčešće se klasificiraju na dva načina.

Prvi je podjela prema kemijskim strukturama i obuhvaća:

- fenetilamine,
- piperazine,
- triptamine,
- sintetske katinone,
- alkilindole (sintetske kanabinoide),
- benzodiazepine,
- arilcikloheksilamine.

Drugom se klasifikacijom nove psihoaktivne supstance dijele prema njihovom farmakološkom učinku, te podrazumijeva:

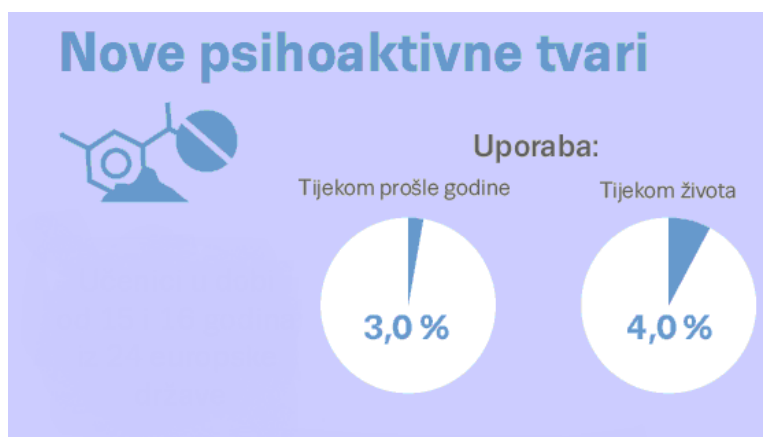
- stimulanse,
- entaktogene,
- depresore,
- opioide,
- halucinogene te
- spojeve nalik kanabisu. (8,17)

Zloupotreba novih psihoaktivnih supstanci većinom dovodi do blagih ili umjerenih otrovanja, ali ni ozbiljnije komplikacije nisu rijetkost. (18) Prema Europskom izvješću o drogama iz 2015. godine, oko 10% svih intervencija hitne pomoći vezanih za droge uključivalo je izlaganje NPS-ovima. (6) Osim sposobnosti da izazovu brojne periferne toksikološke učinke, mnoge nove psihoaktivne supstance iskazuju potencijal za pojavu ovisnosti. (8)

Internet je postao ključno mjesto prodaje te je sve manje uobičajena kupnja u tzv. „pametnim dućanima,, i preko uličnih preprodavača. (8) Nove psihoaktivne supstance prodaju se na tržištu „mračne mreže“ (*engl.* darknet) i otvoreno na „površinskom internetu“ (*engl.* surface web), označene kao legalne droge (*engl.* legal high). (4)

Poznato je više od 700 različitih NPS-a prijavljenih nadzornim centrima za drogu diljem svijeta, a 5% Europske populacije konzumiralo je NPS u 2017. godini. (6)

O popularnosti NPS-a među mladima najbolje svjedoči istraživanje Europske organizacije za anketiranje o alkoholu i drogama (*engl.* European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs, ESPAD) o prevalenciji rekreativne uporabe novih psihoaktivnih supstanci kod učenika iz 24 europske države, u dobi od 15 i 16 godina, prikazano na slici 1. (4)



Slika 1. Prevalencija uporabe novih psihoaktivnih tvari među učenicima u dobi od 15 i 16 godina iz 24 europske države u 2015. god. (4)

Rapidno pojavljivanje NPS-a na tržištu predstavlja izazov i za analitičke metode u forenzici. Velika je potreba za osjetljivim, pouzdanim i ponovljivim metodama koje bi detektirale i identificirale ove supstance u biološkim uzorcima. Teško ih je identificirati i kvantificirati jer su referentni standardi, prikladne analitičke metodologije i znanstvena literatura o ovom specifičnom području često nedostupni mnogim laboratorijima. (19,8) Brzi komercijalni testovi za otkrivanje novih psihoaktivnih supstanci u urinu zasad ne postoje. (8)

1.2. Sintetski katinoni

Sintetski katinoni podgrupa su novih psihoaktivnih supstanci, derivati alkaloida katinona, glavnog aktivnog sastojka biljke kat (lat. *Catha edulis*), za koju postoje zapisi da su lišće te biljke stanovnici Arapskog poluotoka i Istočne Afrike žvakali ili pripremali čajevu radi postizanja stimulirajućeg učinka. (19,15)

Sintetski katinoni po strukturi spadaju u β -ketoamfetamine slične dopaminu, metamfetaminu, *ecstasyju* i pirovaleronu. Premda takva strukturalna analogija znači da imaju i sličan učinak,

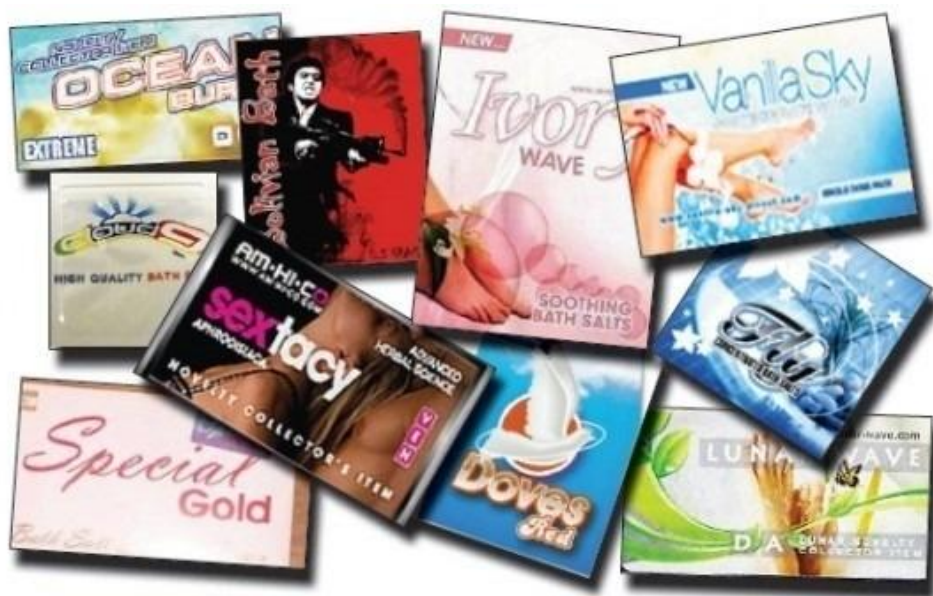
katinoni pokazuju brojne različitosti i specifičnosti te se smatraju jedinstvenom skupinom psihoaktivnih tvari. (10)

Zabilježeni učinci sintetskih katinona su euforija, porast raspoloženja, hiperaktivnost, pojačan libido, agitacija, veća pažnja i učinkovitost u radu, smanjen apetit te pojačana pričljivost. (16,19)

Najčešće dolaze u formi bijelog praha, kristaliničnih mješavina (soli za kupanje) i tableta. (15)

Neka od uličnih imena pod kojima se prodaju su „Ocean Burst“, „Cloud Nine“, „Energy-1“, „Blue Silk“, „Meow-Meow“, „Red Dove“, „Ivory Wave“ „Vanilla Sky“ (7) (slika 2).

Popularni su među mladim ljudima koji pohađaju tehno-alternativne zabave. (15) Topljivi su u vodi i time pogodni za ubacivanje u pića. (20)



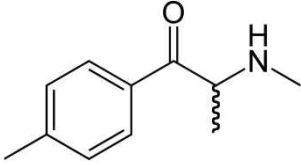
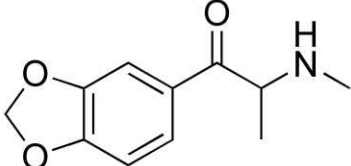
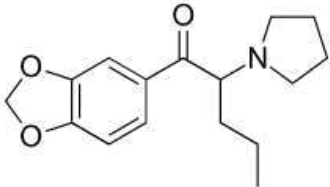
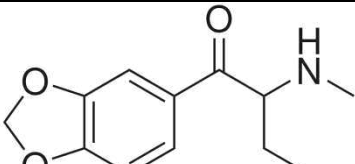
Slika 2. Komercijalna pakiranja sintetskih katinona (21)

Neki od najpoznatijih sintetskih katinona su mefedron, metilon, butilon i MDPV (metilendioksipirovaleron), a njihove strukture prikazane su u tablici 1. (22)

Mefedron i MDPV dominantni su na tržištu i svugdje su u svijetu uzroci brojnih intervencija hitne pomoći. (20) Mefedron se najviše zloupotrebljava u Europi, a MDPV i metilon u SAD-u. (10)

Pet najčešće zaplijenjenih katinona u 2015. bili su alfa-PVP, 3-MMC, etilon, 4-CMC i pentedron. (4)

Tablica 1. Kemijsko ime i struktura predstavnika sintetskih katinona (22,23,24,25,26)

Sintetski katinon	Kemijsko ime	Struktura
mefedron	(R,S)-2-metilamino-1-(4-metilfenil)propan-1-on	
metilon	(±)-2-metilamino-1-(3,4-metilenedioksifenil)propan-1-on	
MDPV (metilendioksiprovaleron)	(R,S)-1-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-2-(pirolidin-1-il)pentan-1-on	
butilon	1-(1,3-benzodioksol-5-il)-2-(metilamino)butan-1-on	

Način konzumiranja dodatno je dočaran kolokvijalnim izrazima poput „keying“, ušmrkavanje praha s ključa i „bombing“, gutanje praha zamotanog u papirić za cigarete. Manje uobičajeni su rektalni put primjene, gingivalno, inhalacijom, injektiranjem intramuskularno te umetanjem u oko, tzv. „eyeballing“. Intravenska administracija katinona, popularno zvana „slamming“, najviše je zabilježena među postojećim i bivšim konzumentima opijata te promiskuitetnim homoseksualcima. Takva primjena predstavlja veliki rizik i povezuje se s povećanim tjelesnim i mentalnim zdravstvenim problemima. (15,4)

Intoksikacija katinonima dovodi do agitacije, tremora, teške hipertenzije i akutnog zatajenja jetre i bubrega. (19) Javljaju se i auditorne i taktilne halucinacije praćene psihozama koje mogu biti teške i dugotrajne. Takvi su ovisnici skloni samoozljeđivanju, ponašaju se rizično i bizarno, a prethodno nisu imali psihijatrijsku dijagnozu. (10) S obzirom da za liječenje

trovanja sintetskim katinonima ne postoji specifični antidot, terapija je suportivna i simptomatska. (7)

Detekcija sintetskih katinona u toksikologiji nije jednostavna. Studije o farmakokinetici kod ljudi su ograničene pa nema komercijalno dostupnih referentnih materijala za metabolite. Laboratoriji se zato moraju oslanjati na pronalaženje izvorne molekule katinona u biološkim uzorcima. Često se i to nameće kao problem kod analize plinskom kromatografijom, najvjerojatnije zbog njihove kemijske nestabilnosti i sklonosti razgradnji. (27)

1.2.1. Farmakodinamika sintetskih katinona

Poznata su dva osnovna mehanizma preko kojih sintetski katinoni ostvaruju učinak. Jedan je inhibicija presinaptičkih transportera odgovornih za ponovni unos monoamina (noradrenalina, dopamina i serotonina), a drugi povećano otpuštanje monoamina. Također, oba mehanizma djeluju i u kombinaciji. (15)

Povećane razine noradrenalina utječu na kardiovaskularni sustav i dovode do tahikardije, hipertenzije i hipertermije. Porast koncentracije dopamina u sinapsi stimulira centar u mozgu za procesiranje nagrađivanja, što stvara visoki potencijal za razvijanje navike. Osim toga, zaslužan je i za izraženu psihomotornu hiperaktivnost. (8,28) Povišenje izvanstaničnog serotonina može rezultirati entaktogenim učincima, ali i opasnim životno ugrožavajućim serotoninским sindromom. (6)

Svi katinoni potentni su inhibitori transportera za ponovni unos noradrenalina. Razlikuju se u mjeri inhibicije dopaminskih i serotonininskih transportera ponovne pohrane i sposobnosti oslobađanja monoamina, što je objašnjenje njihovih različitih kliničkih profila. (15) Primjer je MDPV koji, zbog veće selektivnosti za dopaminski transporter, uzrokuje veću podložnost stvaranju ovisnosti, za razliku od mefedrona, selektivnijeg za serotonininski transporter. (28)

1.2.2. Farmakokinetika sintetskih katinona

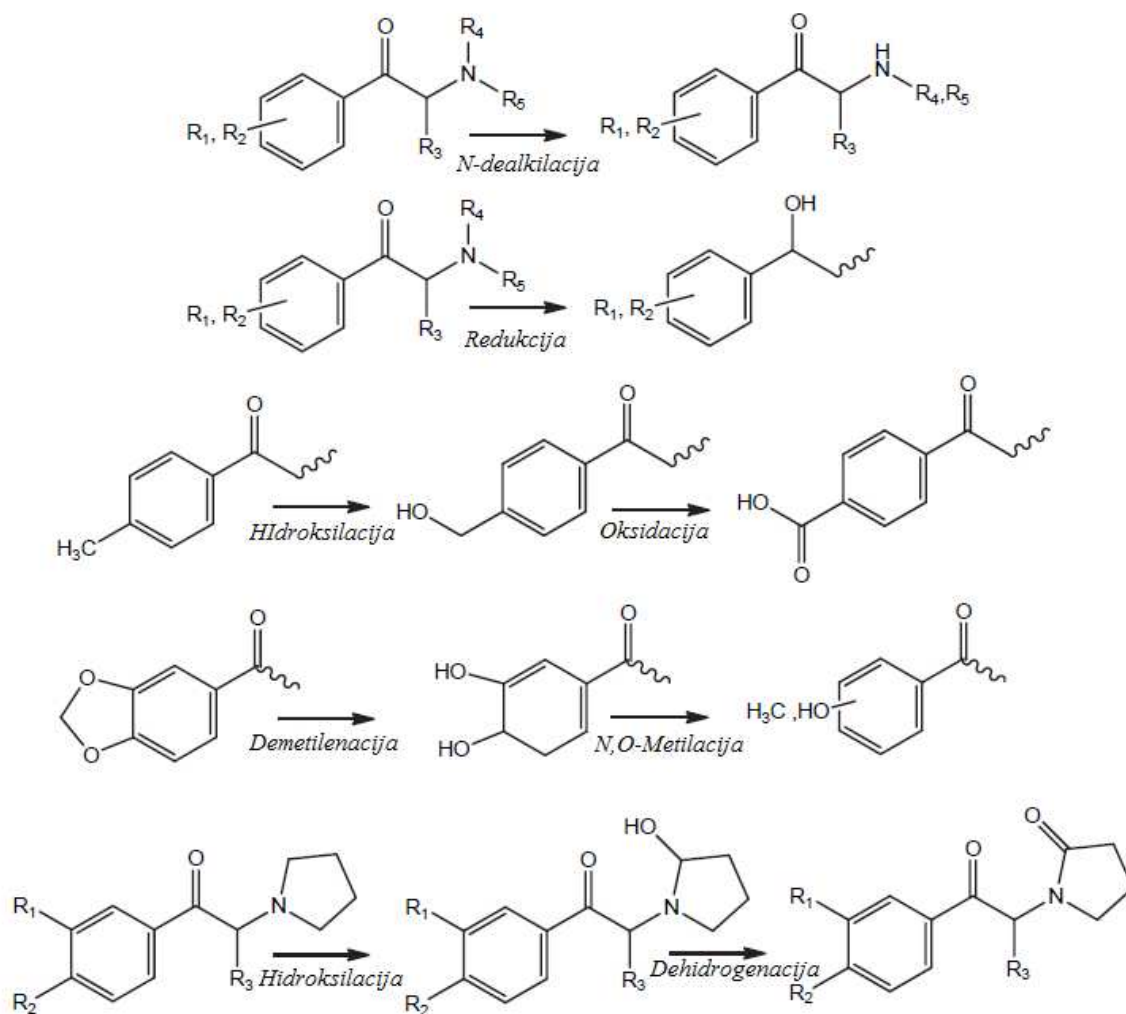
Koncentracija sintetskih katinona u krvi varira ovisno o načinu konzumacije. Nema podataka o kontinuiranom motrenju koncentracija tih droga u krvi, već su provedena samo nasumična mjerenja u nekoliko vremenskih točaka. Koncentracija sintetskih katinona u krvi od oko 400 ng/ml zabilježena je kao smrtonosna. (13)

U tablici 2 prikazane su uobičajene doze kod rekreativnog uzimanja, nastup djelovanja i trajanje željenog učinka odabranih sintetskih katinona. (27)

Tablica 2. Sistematizirani pregled uobičajenih doza koje se zloupotrebljavaju, vremena potrebnih za nastup djelovanja i duljina trajanja učinka odabranih katinona (27)

Sintetski katinon	Uobičajena doza i put primjene	Nastup djelovanja	Trajanje učinka
Mefedron	150 - 250 mg (oralno)	45 - 120 min	2 - 4 h
	5 - 75 mg (nazalno)	-	30 min - 1 h
	50 - 75 (intravenski)	-	15 - 30 min
MDPV	3 - 20 mg (oralno)	15 - 30 min	2,5 – 3 h
	3 - 20 mg (nazalno)	< 30 min	6 – 8 h
Metilon	100 - 250 mg (oralno)	15 – 30 min	2 – 5 h
Butilon	100 - 250 mg (oralno)	15 – 30 min	4 – 6 h

Prva faza biotransformacije većine sintetskih katinona je N-dealkilacija i redukcija karbonilne skupine u odgovarajući amino alkohol. Katinoni s pirolidinskim prstenom podliježu hidroksilaciji, nakon koje slijedi dehidrogenacija i formiranje laktamskog prstena. Oni koji imaju metilendioksi skupinu prolaze demetilenaciju, a zatim N- ili O- metilaciju. Derivati supstituirani metilnom skupinom na četvrtom ugljiku mogu se hidroksilacijom i daljnjom oksidacijom metabolizirati do karboksilnih kiselina. Na slici 3 sažeto je prikazana prva faza biotransformacije. Urinarnoj ekskreciji prethodi druga faza biotransformacije, točnije konjugacija glukuronidima i sulfatnom kiselinom. (27,29)



Slika 3. Reakcije I. faze biotransformacije sintetskih katinona (27)

U mokraći se redovito detektira osnovna molekula katinona jer se dio konzumirane droge brzo izlučuje nepromijenjen. Katinoni se u tijelu ioniziraju, zbog čega je reapsorpcija u bubrezima niska, kao posljedica slabe hidrofobnosti. Vrijeme polueliminacije alfa-PVP-a u mokraći nakon intravenske primjene je otprilike 12h. Izlučena količina u mokraći ovisi o urinarnom pH. (13)

1.3. Uzorci za analizu

Najčešće analizirani uzorci u kliničko-toksikološkoj obradi slučajeva povezanih sa slučajnim ili namjernim trovanjem drogama i sredstvima ovisnosti su biološke tekućine, i to krv i mokraća. (30)

Biološki uzorak krvi je uzorak od velikog značaja za kvantitativno određivanje lijekova i droga te interpretaciju koncentracije. (3) Jednako je važna u kliničkoj toksikologiji živih osoba i poslijesmrtnoj analizi. Ukoliko je moguće, poželjno je za sve toksikološke analize uzorkovati uzorke krvi, koja se najčešće koristi kao referentni uzorak.

Uzorak mokraće je još jedan vrijedni uzorak, važan za opći toksikološki probir. Tu se lijekovi i droge, kao i njihovi metaboliti, akumuliraju te daju veći odziv koncentracije na instrumentima za analizu. Najveći nedostatak je da se ovim uzorkom može na različite načine manipulirati. (30)

1.4. Metode ekstrakcije

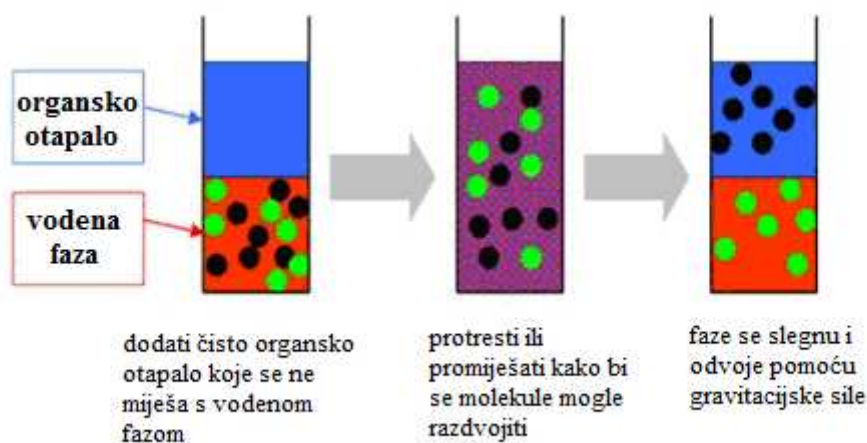
Ekstrakcija je tehnika izdvajanja analita ili prisutnih interferencija iz matice uzorka. Obzirom da se zasniva na kemijskim i fizikalnim svojstvima otopljenih tvari, izbor metode ekstrakcije ovisi o analitu koji se dokazuje, vrsti uzorka i korištenoj analitičkoj metodi. (30,31)

Cilj pripreme uzoraka ekstrakcijskim metodama je identifikacija i kvantifikacija analita pomoću instrumentalnih analitičkih metoda, među kojima valja istaknuti plinsku kromatografiju (*engl.* Gas chromatography, GC), tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (*engl.* High performance liquid chromatography, HPLC) te vezane tehnike, plinsku kromatografiju–spektrometriju masa (*engl.* Gas chromatography–mass spectrometry, GC–MS) i tekućinsku kromatografiju–spektrometriju masa (*engl.* Liquid chromatography–mass spectrometry, LC–MS).

U toksikološkim se laboratorijima za pripremu uzorka najčešće prakticiraju ekstrakcija tekuće–tekuće (*engl.* Liquid–liquid extraction, LLE) i ekstrakcija čvrstom fazom (*engl.* Solid phase extraction, SPE). (30)

1.4.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

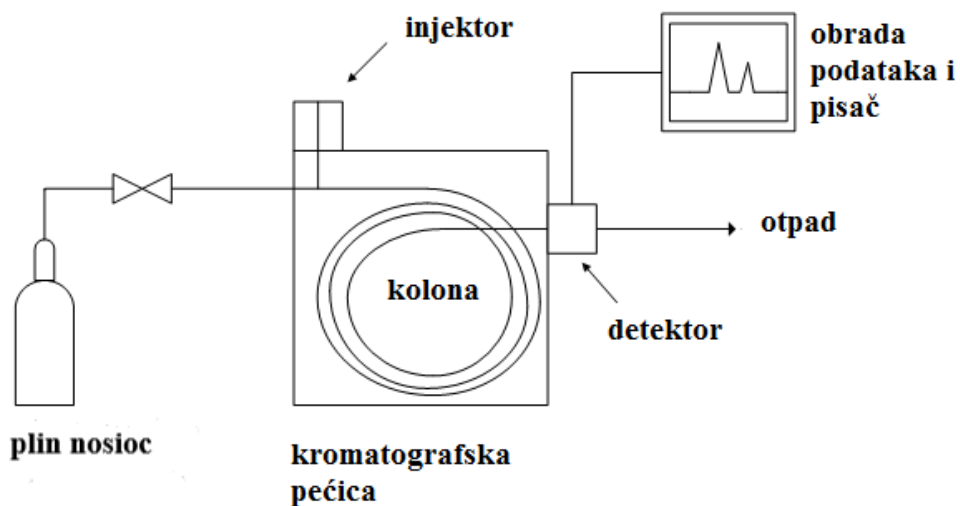
Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE) je postupak kojim se otopljeni tvar raspodjeljuje između dviju tekućina koje se ne miješaju. U većini slučajeva to su vodena faza, kao što je primjerice biološki uzorak, i organsko otapalo poput dietil-etera i kloroforma. (31,30) Razdvajanje se temelji na različitoj topljivosti analita u matrici i organskom otapalu pri određenom pH. Reguliranjem kiselosti uzorka neionizirane komponente iz vodene faze prelaze u organsko otapalo, dok ionizirani spojevi ostaju u vodenom mediju. (3) Princip je prikazan na slici 4. (32) Učinkovitost ekstrakcije tekuće-tekuće ovisi o kemijskoj ravnoteži raspodjele analita između te dvije faze. (31) Preduvjet za uspješnu ekstrakciju je pravilan izbor otapala, a za to je potrebno poznavati kemijska svojstva ispitivane tvari. (30) LLE jedna je od najčešće korištenih metoda pripreme uzorka za kromatografsko određivanje zbog relativno jednostavne i brze izvedbe. Također je metoda izbora za hitne analize uzoraka koji sadrže nepoznate analite različitih fizikalno-kemijskih svojstava. (3) Nedostatak ekstrakcije tekuće-tekuće je potreba za većim količinama organskih otapala i njihovo zbrinjavanje te neizbježni gubitci pri odvajanju slojeva pipetom. (33)



Slika 4. Prikaz raspodjele otopljene tvari između dvije faze koje se ne miješaju (organskog otapala i vodene faze), ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE) (32)

1.5. Plinska kromatografija

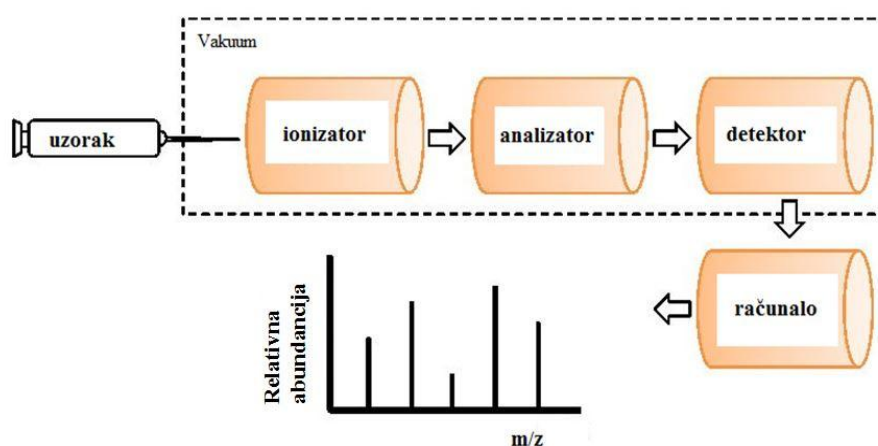
Plinska kromatografija (*engl.* Gas chromatography, GC) je instrumentalna analitička metoda određivanja gdje se uzorak u plinovitom ili tekućem stanju injektira u struju plinovite mobilne faze (inertni plin nosač) i prolazi kroz kolonu. Komponente iz uzorka razdvajaju se na osnovi različitog afiniteta prema stacionarnoj i mobilnoj fazi i u različitom vremenu dolaze do detektora. (31,3) Dijelovi plinskog kromatografa shematski su prikazani na slici 5. (30) Uzorci koji nisu plinoviti trebaju se upariti pri injektiranju, a uvjet za spojeve koji se analiziraju GC metodom je da su stabilni na temperaturama do 400 °C. (3) Parametri koji utječu na vrijeme zadržavanja (*engl.* Retention time, RT) su brzina protoka plina, duljina kolone i temperatura. (34)



Slika 5. Osnovni dijelovi plinskog kromatografa (30)

1.6. Spektrometrija masa

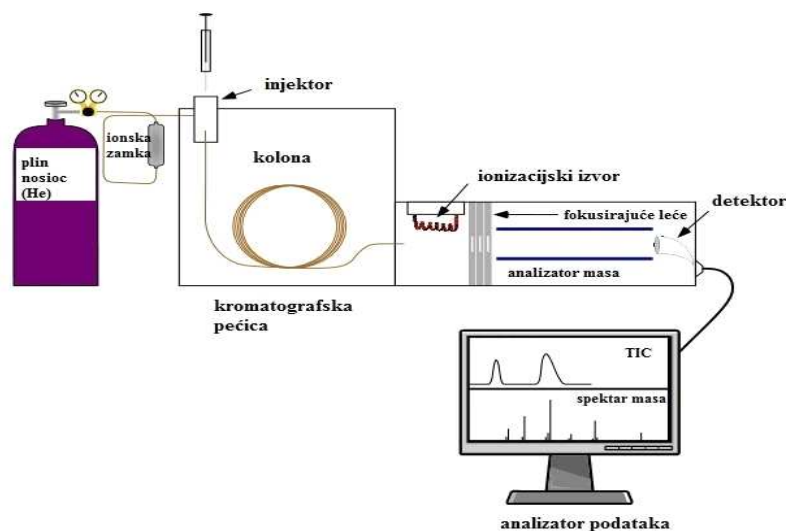
Spektrometar masa je instrument koji ionizira plinovite molekule, ubrzava ih i razdvaja prema omjeru mase i naboja (m/z). (35) Sastoji se od dijela za unošenje uzorka, ionizatora, analizatora, detektora, te računala (36) (slika 6). Za pravilno provođenje uzoraka sustav treba biti pod visokim vakuumom, kako bi se izbjeglo međusobno sudaranje iona zbog utjecaja zraka. Razdvojeni ioni detektiraju se kao električni signal koji se pohranjuje u bazi podataka kao m/z omjer i odgovarajuća relativna abundancija. (3) Maseni spektar karakterističan za pojedini spoj dobiva se mijenjanjem jakosti magnetskog polja u magnetskom analizatoru što omogućuje registriranje iona različitih masa. (35) Često se koristi za kvalitativne i kvantitativne analize te u određivanju strukture kemijskih spojeva prema karakterističnim fragmentima molekula. (30)



Slika 6. Shematski prikaz glavnih dijelova spektrometra masa (30)

1.7. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa

Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (*engl.* Gas chromatography–mass spectrometry, GC–MS) je združena analitička tehnika koja se često koristi u forenzičnoj toksikologiji za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka lijekova i sredstava ovisnosti. Riječ je o izrazito osjetljivom sustavu koji daje vjerodostojne rezultate, zbog čega se smatra zlatnim standardom instrumentalnih tehnika. Povezivanjem ovih dviju metoda postignuto je međusobno nadopunjavanje uspješnog odjeljivanja komponenti smjese, koje pruža plinska kromatografija, i podataka o masenom spektru pojedinih komponenti, ključnim za kvalitativnu analizu. (30) Glavna prednost GC–MS-a su bogate baze podataka EI spektara (*engl.* Electron Ionisation, EI) koje se redovito nadopunjuju i omogućuju identifikaciju nepoznatog analita. (3) Identifikacija se vrši uspoređivanjem vremena zadržavanja (*engl.* Retention time, RT) i masenog spektra analita s referentnim standardom. (19) Na slici 7 shematski je prikazana GC-MS tehnika. (30)



Slika 7. Shematski prikaz osnovnih dijelova GC-MS tehnike (30)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi rada:

1. Izraditi umjerne krivulje za pet sintetskih katinona (bufedron, mefedron, DMMC, pentilon i MDPV) pomoću referentnih standarda poznatih koncentracija.
2. Primijeniti krivulju za određivanje nepoznatih koncentracija bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a u biološkom uzorku (mokraći).
3. Razviti metodu za simultano određivanje koncentracija sintetskih katinona u mokraći.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom istraživanju korištene su sljedeće kemikalije:

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

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

Natrijev volframat, Merck, Darmstadt, Njemačka

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

Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Pentafluoro propionični anhidrid, Supelco, Sjedinjene Američke Države

Referentni standardi sintetskih katinona: Bufedron, Mefedron, DMMC, Pentilon i MDPV;

Lipomed, Švicarska

3.2. Otopine standarda

Otopine sintetskih katinona za izradu umjerne krivulje dobivene su serijskim razrjeđivanjem referentnih standarda (otopina u metanolu koncentracije 1 mg/mL). Za svaki pojedini sintetski katinon najprije su pripravljene koncentracije c_1 i c_2 razrjeđivanjem u metanolu, radi preciznijeg daljnjeg razrjeđivanja. Koncentracije c_3 do c_9 dobivene su razrjeđivanjem i ekstrahiranjem dobivenih otopina c_1 i c_2 u biološkom uzorku mokraće, koji je dokazano negativan na prisutnost sredstava ovisnosti i droga, kako bi umjerna krivulja bila pripravljena u mediju uzoraka kojima će se određivati nepoznata koncentracija. Svih pet sintetskih katinona dodano je i zajedno ekstrahirano za analizu GC-MS-om (tablica 3).

Tablica 3. Priprema standardnih otopina sintetskih katinona za izradu umjerne krivulje

	Volumen standardne otopine (μL)	Volumen metanola (μL)	Ukupni volumen otopine (μL)	Koncentracija dobivene otopine (ng/mL)
c₀			1000 x 5	1 000 000 (1 mg/ml)
c₁	10 c ₀	90	100	100 000
c₂	10 c ₁	90	100	10 000
		Volumen mokraće (μL)		
c₃	40 c ₁ x 5	800	1000	4000
c₄	20 c ₁ x 5	900	1000	2000
c₅	10 c ₁ x 5	950	1000	1000
c₆	80 c ₂ x 5	600	1000	800
c₇	60 c ₂ x 5	700	1000	600
c₈	40 c ₂ x 5	800	1000	400
c₉	20 c ₂ x 5	900	1000	200

3.3. Biološki uzorci mokraće za toksikološku analizu

Analizirani su klinički uzorci mokraće negativni na prisustvo ikakvih sredstava ovisnosti. U svaki uzorak stavljen je različiti nepoznati volumen pripremljenih standardnih otopina sintetskih katinona kako bi, za potrebe ovog istraživanja, koncentracije droga u mokraći bile nepoznate.

Uzorci mokraće pripremljeni su za kromatografsku analizu ekstrakcijom tekuće-tekuće. U svaku tubicu za LLE ekstrakciju odvagano je 1,8 g natrijevog volframata i dodano 3 ml smjese diklormetan:etil-acetat (v/v 3:1) te 1 ml uzorka. Uzorci su potom ekstrahirani 10 minuta na rotoru brzinom od 50 rpm-a, a nakon toga centrifugirani brzinom 2600 rpm-a 15 minuta. U Petrijeve zdjelice izdvojeno je po 2,5 mL gornje organske faze iz svake tubice, te su zatim uzorci evaporirani do suha u struji dušika. Uzorci su za analizu razrijeđeni s 30 μL kloroforma i potom prebačeni u staklene kivete za GC-MS analizu. Također, uzorci su za dodatnu potvrdu derivatizirani koristeći 50 μL derivatizacijskog sredstva, pentafluoro propionični anhidrid.

3.4. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- Plinski kromatograf s masenim spektrometrom; Shimadzu GCMS-QP2010 (slika 8)
- Centrifuga Centric; Tehnica
- Digitalna tehnička vaga; Kern; mjerenje na 3 decimale
- Rotor za ekstrakciju, Vorteks; IKA

3.4.1. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa, GC-MS

Za analizu je korišten plinski kromatograf sa spektrometrom masa i ugrađenim automatskim dodavačem uzoraka, Shimadzu GCMS-QP2010, prikazan na slici 8. Cjelokupan 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 μm . (30)



Slika 8. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa Shimadzu GCMS-QP2010 (37)

3.4.2. 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 – 700 m/z. Optimiran je temperaturni program. (30)

Optimalni radni uvjeti:

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

Ukupno trajanje temperaturnog programa: 26,33 minute:

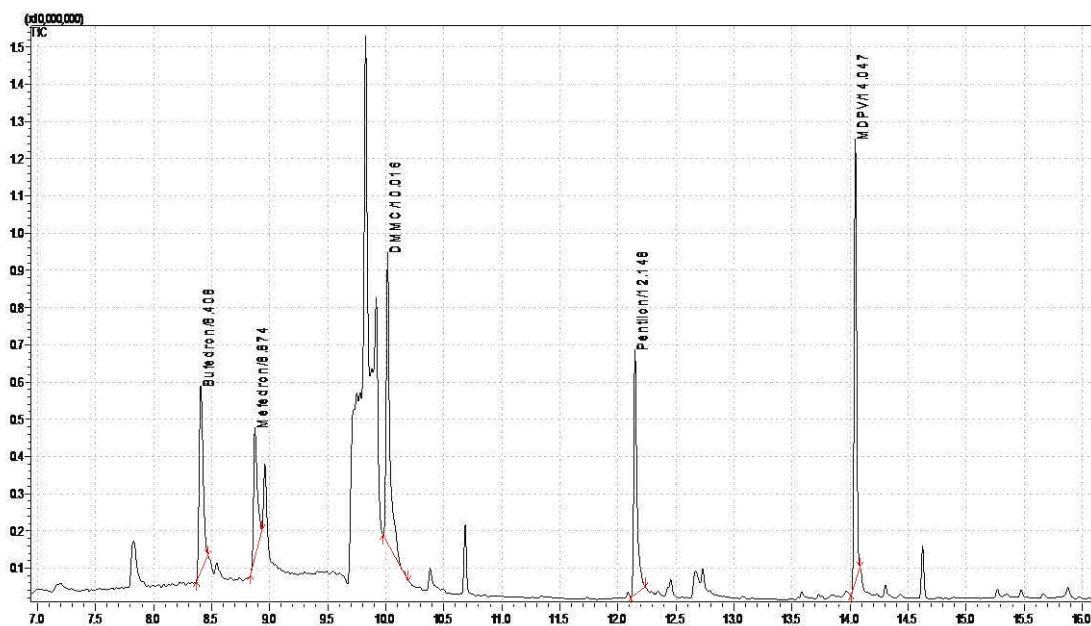
1. 90 °C izotermno 3 min
2. 15 °C /min do 270 °C 5 min
3. 15 °C /min do 320 °C 3 min

4. REZULTATI

4.1. Kvalitativna analiza sintetskih katinona

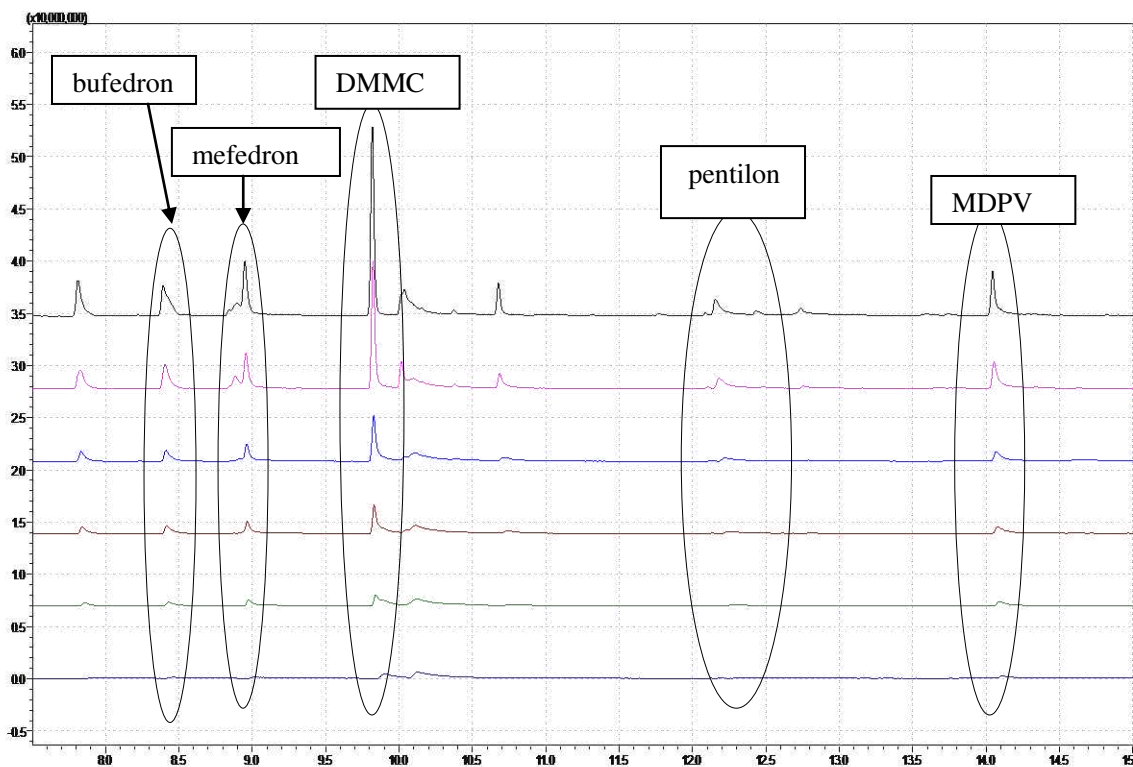
Ukupni ionski kromatogram sintetskih katinona

Na slici 9 prikazan je ukupni ionski kromatogram dobiven GC-MS analizom standarda pet sintetskih katinona: bufedrona, mefedrona, 3,4-dimetilmetkatinona (DMMC), pentilona i 3,4-metilendioksipirovalerona (MDPV) koncentracije 4000 ng/mL. Retencijsko vrijeme (RT), odnosno vrijeme u kojem je signal stigao na detektor, nalazi se na apscisi kromatograma, a intenzitet signala, proporcionalan koncentraciji tvari, prikazan je na ordinati. Dobiveni podaci o karakterističnim retencijskim vremenima (RT) sintetskih katinona potrebni su za daljnju kvantifikaciju i identifikaciju u biološkom uzorku.



Slika 9. Uvećani prikaz dijela ukupnog ionskog kromatograma sintetskih katinona analiziranih GC-MS tehnikom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima za bufedron (RT=8,408), mefedron (RT=8,874), DMMC (RT=10,016), pentilon (RT=12,148) i MDPV (RT=14,047).

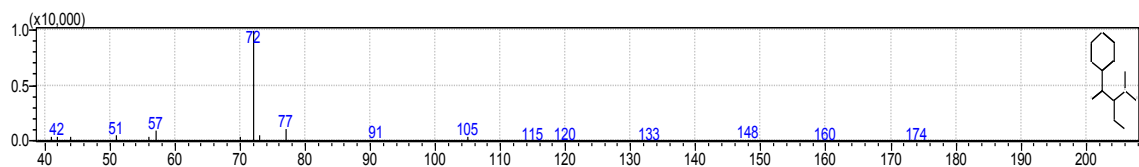
Na slici 10 prikazan je kromatogram ukupne ionske struje s karakterističnim signalima bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona, MDPV-a dobivene analizom na koncentracijama 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL, 1000 ng/mL i 2000 ng/mL.



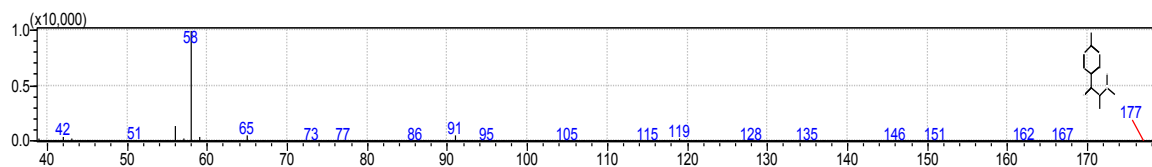
Slika 10. Uvećani prikaz dijela ukupnog ionskog kromatograma bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a pri koncentracijama 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL, 1000 ng/mL i 2000 ng/mL.

Spektri masa sintetskih katinona

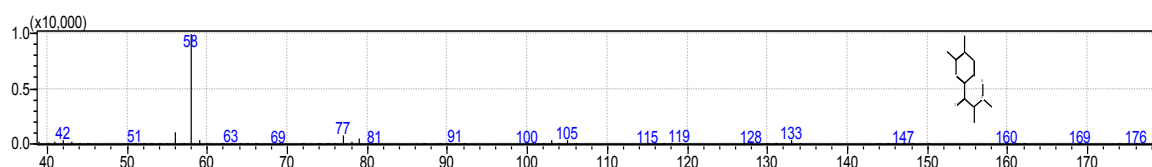
Na slikama 11–15 prikazani su spektri masa dobiveni analizom otopina standarda na masenom spektrometru, usporedbom sa spektrima pohranjenim u EI bazama podataka. Na osi x prikazana je vrijednost omjera mase i naboja (m/z), a na osi y relativna abundancija (intenzitet signala).



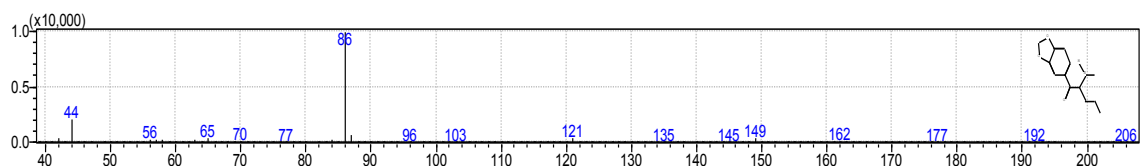
Slika 11. Karakterističan spektar masa za bufedron (m/z 72, 77, 57, 105)



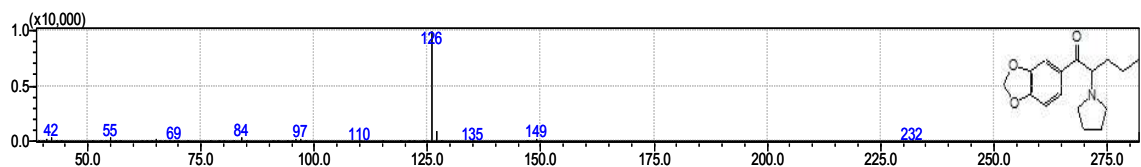
Slika 12. Karakterističan spektar masa za mefedron (m/z 58, 91, 65, 42)



Slika 13. Karakterističan spektar masa za DMMC (m/z 58, 77, 42, 105)



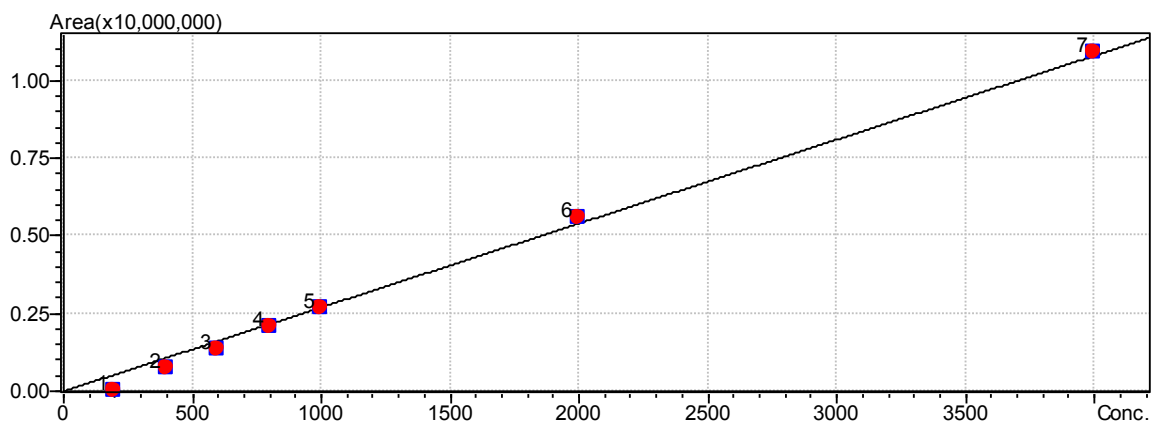
Slika 14. Karakterističan spektar masa za pentilon (m/z 86, 44, 121, 149)



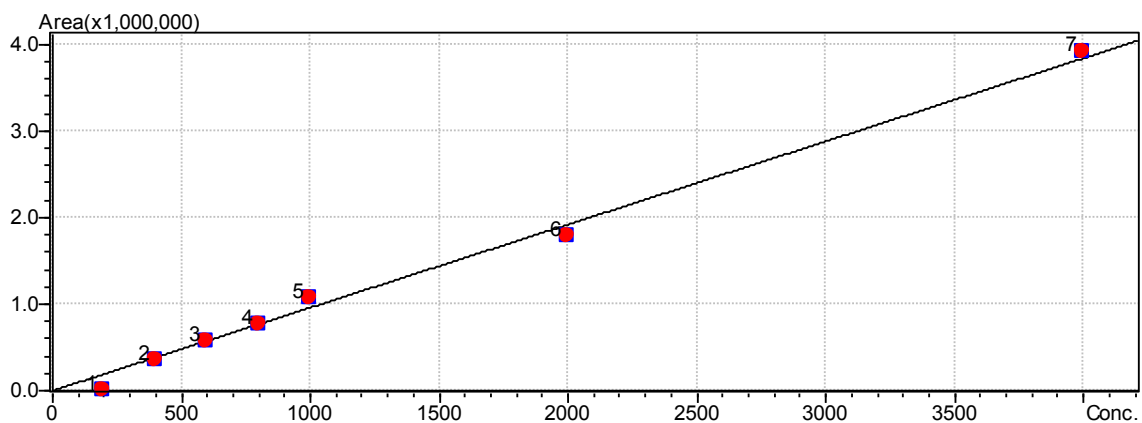
Slika 15. Karakterističan spektar masa za MDPV (m/z 126, 42, 84, 149)

4.2. Umjerne krivulje sintetskih katinona

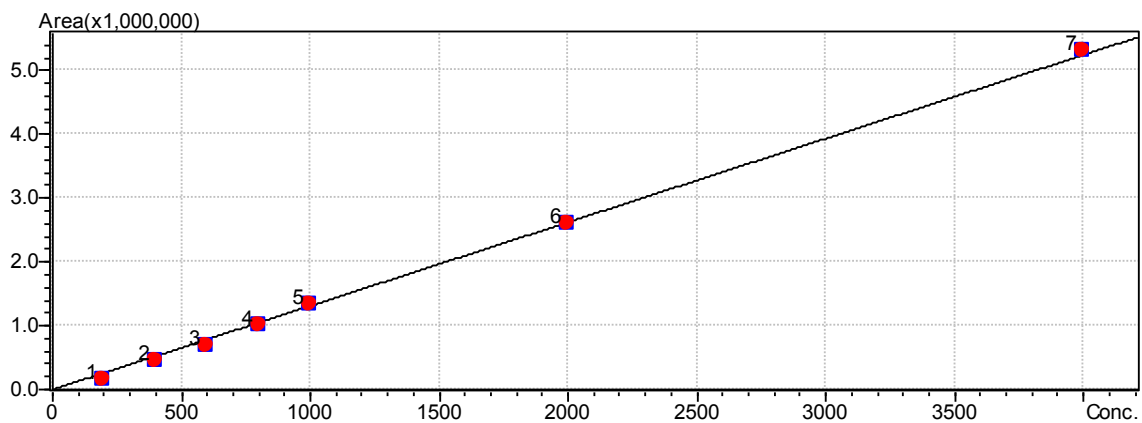
Na slikama 16-20 prikazane su umjerne krivulje bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a dobivene kromatografskom analizom pri zadanim koncentracijama (200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL, 1000 ng/mL, 2000 ng/mL i 4000 ng/mL).



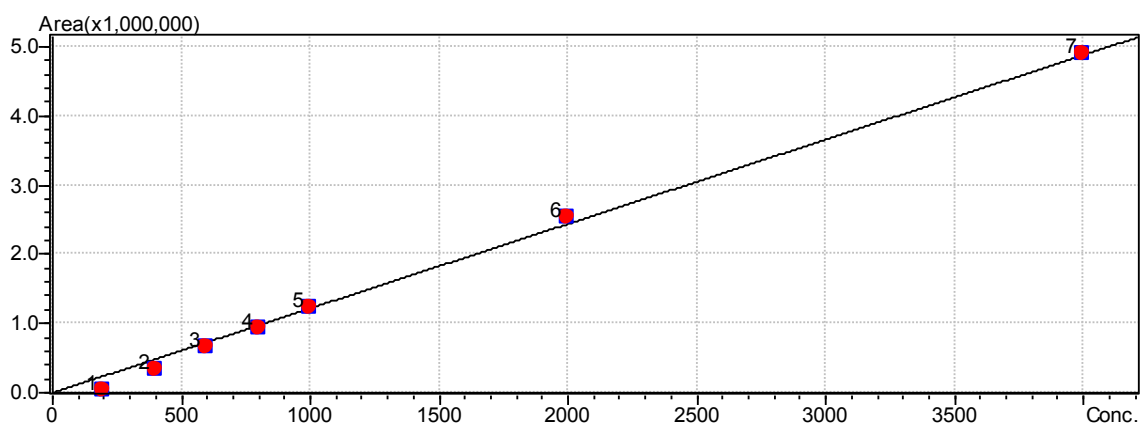
Slika 16. Umjerna krivulja za bufedron



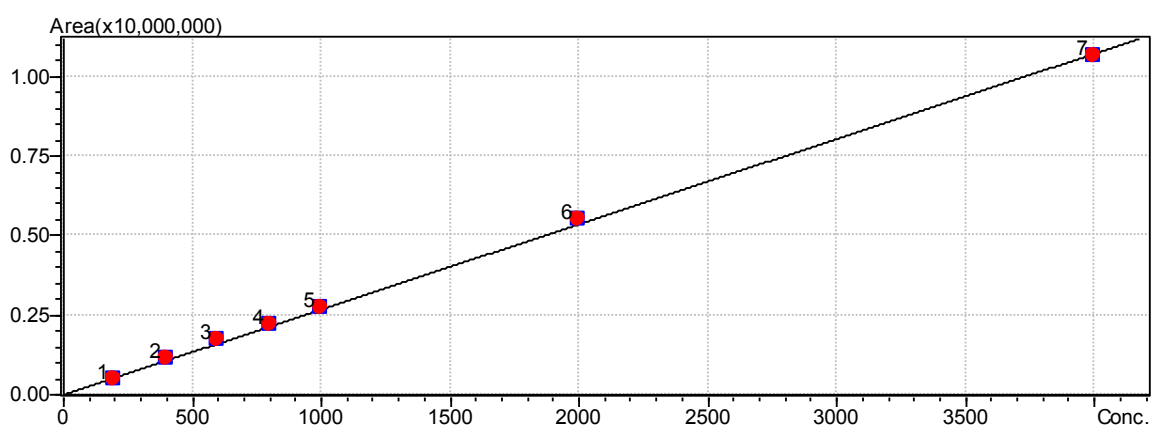
Slika 17. Umjerna krivulja za mefedron



Slika 18. Umjerna krivulja za DMMC

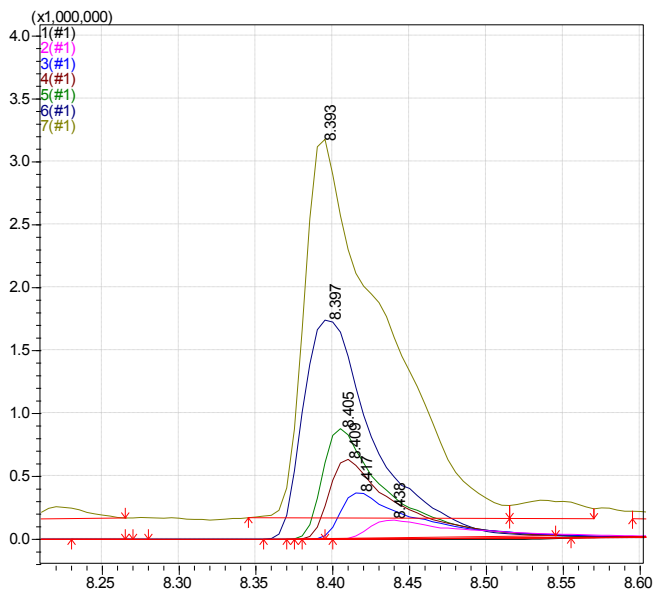


Slika 19. Umjerna krivulja za pentilon

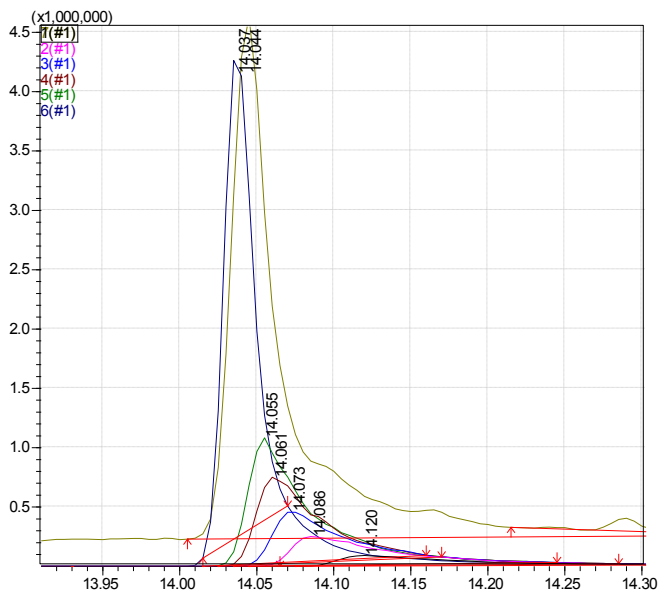


Slika 20. Umjerna krivulja za MDPV

Slike 21 i 22 prikazuju usporedbe kromatograma bufedrona i MDPV-a pri zadanim koncentracijama za dobivanje umjernih krivulja.



Slika 21. Usporedba kromatograma bufedrona pri koncentracijama 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL, 1000 ng/mL, 2000 ng /mL, 4000 ng/mL, pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.

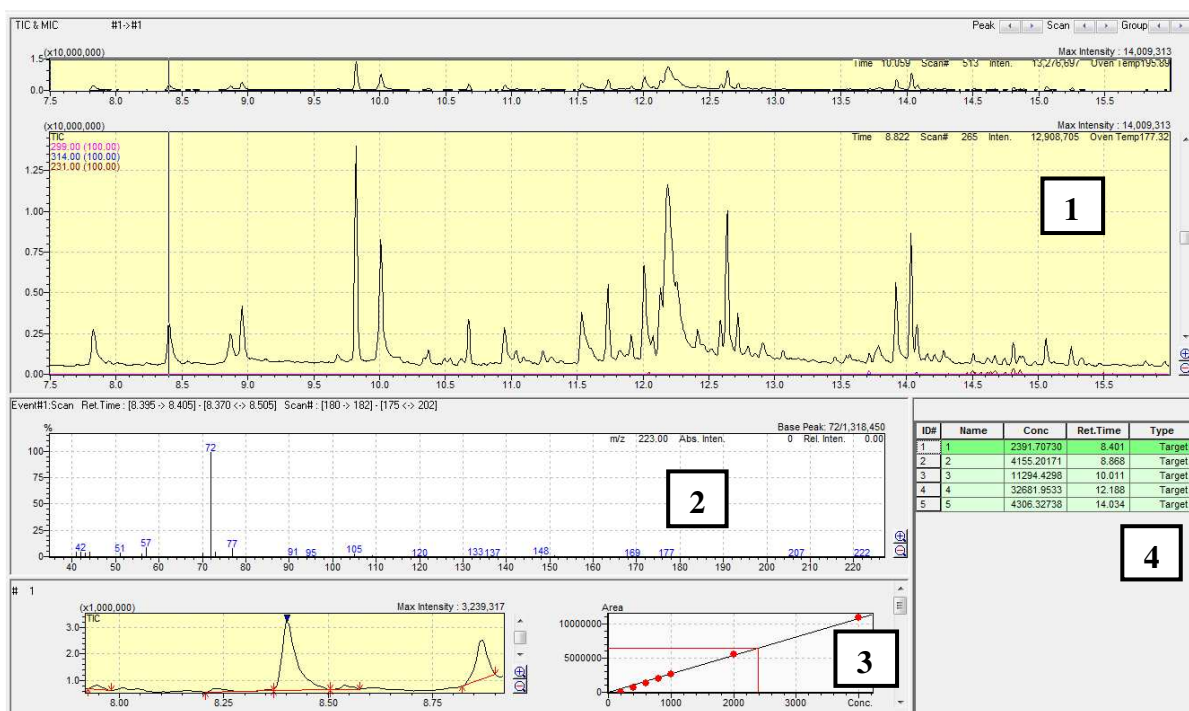


Slika 22. Usporedba kromatograma MDPV-a pri koncentracijama 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL, 1000 ng/mL, 2000 ng /mL, 4000 ng/mL, pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.

4.3. Simultano određivanje sintetskih katinona u biološkim uzorcima

Pomoću umjernih krivulja određene su koncentracije sintetskih katinona u biološkim uzorcima mokraće. Kromatogram dobiven analizom biološkog uzorka 1 prikazan je na slici 23, a očitane koncentracije u tablici 4, dok slika 24 i tablica 5 prikazuju rezultate analize biološkog uzorka 2.

Prisutnost svih pet sintetskih katinona u oba biološka uzorka potvrđena je i analizom uz dodatak derivatizacijskog sredstva.

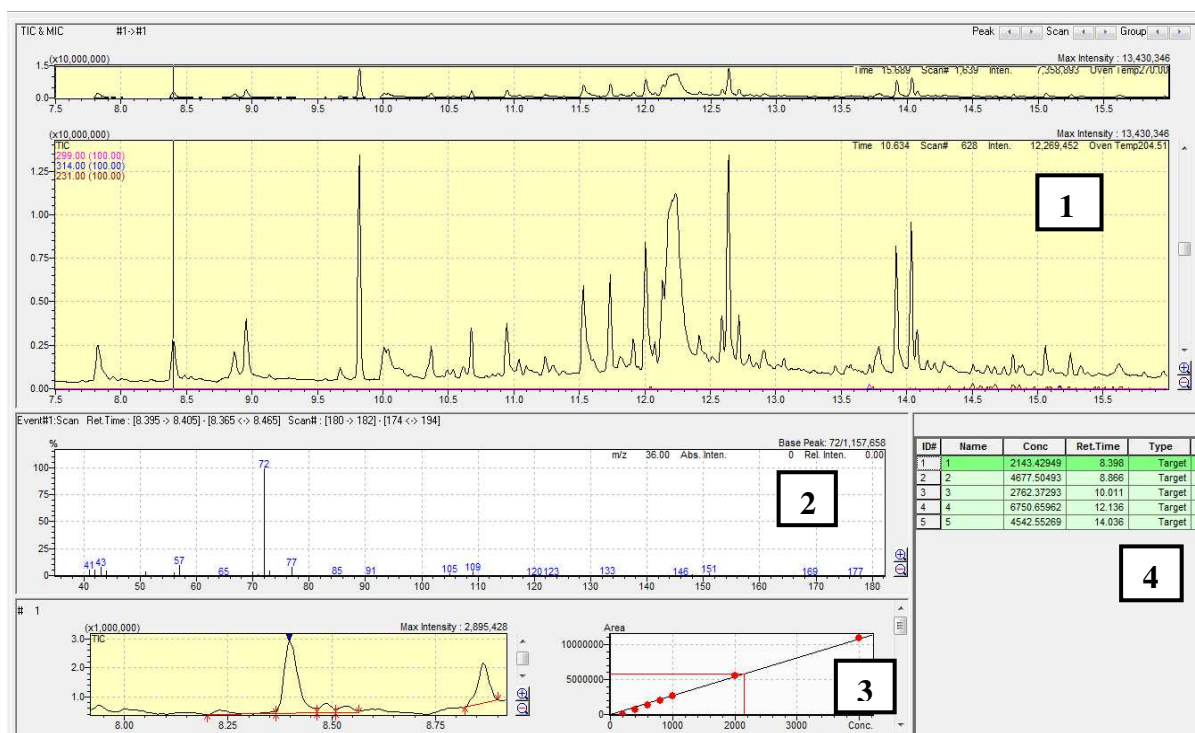


Slika 23. Prikaz dobivenih rezultata analize biološkog uzorka 1 koristeći GC-MS:

- 1- Kromatogram ukupne ionske struje
- 2- Karakterističan spektar masa za bufedron
- 3- Umjerna krivulja za bufedron
- 4- Tablica dobivenih koncentracija svih pet detektiranih sintetskih katinona (bufedron, mefedron, DMMC, pentilon i MDPV)

Tablica 4. Očitane koncentracije sintetskih katinona u biološkom uzorku 1.

Sintetski katinon	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)
BUFEDRON	2,39
MEFEDRON	4,16
DMMC	11,29
PENTILON	32,68
MDPV	4,31



Slika 24. Prikaz dobivenih rezultata analize biološkog uzorka 2 koristeći GC-MS:

- 1- Kromatogram ukupne ionske struje
- 2- Karakterističan spektar masa za bufedron
- 3- Umjerna krivulja za bufedron
- 4- Tablica dobivenih koncentracija svih pet detektiranih sintetskih katinona (bufedron, mefedron, DMMC, pentilon i MDPV)

Tablica 5. Očitane koncentracije sintetskih katinona u biološkom uzorku 2.

Sintetski katinon	Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)
BUFEDRON	2,14
MEFEDRON	4,68
DMMC	2,76
PENTILON	6,75
MDPV	4,54

U ovom istraživanju pet sintetskih katinona analizirano je unutar 15 minuta koristeći GC-MS. Kvalitativna analiza standardnih otopina bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a pri 4000 ng/mL provedena je za radi dobivanja informacije o karakterističnim retencijskim vremenima ispitivanih sintetskih katinona (slika 9). Kromatogrami dobiveni pri masenim koncentracijama 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, 800 ng/mL, 1000 ng/mL i 2000 ng/mL bili su potrebni kako bi se procijenio intenzitet signala koji daje detektor na pojedinim koncentracijama (slika 10). Ti su podaci poslužili za odabir točaka umjerne krivulje i za identifikaciju sintetskih katinona u mokraći. Detektirani sintetski katinoni uspješno su identificirani spektrometrom masa, uspoređivanjem dobivenih spektara masa (slike 11–15) s onima iz baza podataka.

Dobiveni signali, koji su rezultat kvalitativne analize sintetskih katinona (slika 9), nisu pravilnog oblika. Uz svaki označeni signal mogu se uočiti tzv. „artefakti“, odnosno dodatni signali koji su vjerojatno rezultat *in situ* toplinskog razlaganja sintetskih katinona. Taj fenomen opisali su DeRuijter (41) i Noggle (42), a potvrdili Kerrigan i suradnici (27). Kao uzrok pojave degradacijskih produkata navode visoku temperaturu pri injektiranju i dugo zadržavanje uzorka unutar injektora. Kod analize plinskom kromatografijom temperatura je ključan parametar kod injektiranja jer mora biti dovoljno visoka da učinkovito prevede uzorak u plinovito stanje, a da pritom ne prouzrokuje toplinsko razlaganje. U literaturi se artefakti dijele u tri kategorije: nerazlučeni ili mješoviti, djelomično razlučeni i potpuno razlučeni. (27) Signali sa slike 9 iz ovog istraživanja u skladu su s literaturnim opisom. Signal bufedrona ima nerazlučeni artefakt, djelomično razlučeni je uz signal mefedrona, artefakt MDPV-a je u potpunosti razlučen, a uz signal DMMC-a mogu se primjetiti i djelomično razlučeni i potpuno razlučeni artefakt. Signal koji pripada pentilonu također nosi dvije vrste artefakata, nerazlučeni i razlučeni.

Umjerne krivulje za simultano dokazivanje pet sintetskih katinona uspješno su konstruirane pomoću dobivenih signala ciljanim mjerenjem referentnih standarda u mokraći pri koncentracijama 200 ng/mL–4000 ng/mL (slike 16–20).

Derivatizacija uzoraka provodi se za poboljšanje hlapljivosti, temperaturne stabilnosti, selektivnosti i mogućnosti detekcije. (3) Derivatizacija poboljšava kromatografske karakteristike polarnih tvari na način da smanjuje nespecifičnu adsorpciju na koloni, doprinosi nastanku signala pravilnijih oblika te smanjuje pojavu artefakata. (27) U biološkim je

uzorcima mokraće u ovom istraživanju uspješno detektirano svih pet analiziranih sintetskih katinona te su u oba uzorka očitane njihove nepoznate koncentracije (tablice 4 i 5), što pokazuje da je razvijena metoda pogodna za određivanje sintetskih katinona. Međutim, unatoč tome što je uzorcima naknadno dodano i derivatizacijsko sredstvo, nije došlo do značajnijeg poboljšanja oblika signala ni smanjenja pojave artefakata, odnosno produkata toplinskog razlaganja. Moguće objašnjenje također se nalazi u studiji znanstvenice S. Kerrigan (27), gdje je istaknuto da su kemijske karakteristike sintetskih katinona određene keto- i amino-funkcionalnim skupinama. To je uzrok njihove podložnosti keto-enolnoj tautomeriji, što uvelike komplicira postupak derivatizacije jer dolazi do nepotpunih reakcija i stvaranja višestrukih produkata. Enolna je forma termodinamički nestabilnija od karbonilne skupine, zbog čega podliježe konjugaciji, aromatizaciji i vezanju vodika da bi postigla stabilnost. (27) Sredstva ovisnosti koja na krajnjem dušiku imaju supstituirani pirolidinski prsten (tercijarni amini) zbog nedostatka aktivnog vodika ne mogu se derivatizirati uobičajenim reagensima. Kod sekundarnih amina može izostati derivatizacija hidrosilne skupine zbog prostorne smetnje velikom aktivnom skupinom derivatizacijskog reagensa, poput pentafluoro propioničnog anhidrida korištenog u ovom radu. (27)

Pojava *in situ* toplinske degradacije nedostatak je analize sintetskih katinona GC-MS-om. Tom fenomenu nije posvećeno puno pažnje u istraživanjima, iako je prvi put opisan prije više od dva desetljeća. Kako bi se degradacija umanjila, potrebno je razviti nove metode koje uključuju niže temperature injektiranja i kraće zadržavanje tvari u ulaznom dijelu plinskog kromatografa. Podložnost sintetskih katinona toplinskoj degradaciji uvijek treba uzeti u obzir, posebno pri kvantitativnim analizama. (27) U budućim studijama trebalo bi istražiti daje li analiza LC-MS-om ili LC-MS-MS-om bolje rezultate te primijeniti metodu na stvarnim uzorcima mokraće ili krvi osoba koje su konzumirale sintetske katinone.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Analizom provedenom koristeći GC-MS, uspješno je simultano dokazano prisustvo pet sintetskih katinona: bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a te je određena optimalna metoda i potrebni parametri za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu.
- 2) Razvijena i provjerena GC-MS metoda primjenjiva je za simultanu kvalitativnu i kvantitativnu analizu pet sintetskih katinona (bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a) i u biološkim uzorcima mokraće.
- 3) Razvijanje metoda za simultano određivanje sintetskih katinona od velike je važnosti zbog njihovog sve većeg širenja i pojave na globalnom tržištu.
- 4) Za daljnja istraživanja trebalo bi povećati broj ispitivanih sintetskih katinona kao i broj i vrstu bioloških uzoraka za dokazivanje njihovog prisustva.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Ritter JM, Lewis LD, Mant TGK, Ferro A. A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics. Hodder Arnold; 2008. str. 433-434
2. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ: Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
3. Sutlović D i sur. Osnove Forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011.
4. Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama (2017.), Europsko izvješće o drogama 2017.: trendovi i razvoj, Ured za publikacije Europske unije, Luksemburg. (pristup: 18.2.2018.)
5. Baumeister D, Tojo LM, Tracy DK. Legal highs: staying on top of the flood of novel psychoactive substances. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2015;5(2):97-132.
6. Hondebrink L, Zwartsen A, Westerink RHS. Effect fingerprinting of new psychoactive substances (NPS): What can we learn from in vitro data? *Pharmacol Ther.* 2018;182:193-224.
7. Khullar V, Jain A, Sattari M. Emergence of New Classes of Recreational Drugs—Synthetic Cannabinoids and Cathinones. *J Gen Intern Med.* 2014;29(8):1200-1204.
8. 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.
9. Khaled SM, Hughes E, Bressington D, et al. The prevalence of novel psychoactive substances (NPS) use in non-clinical populations: a systematic review protocol. *Syst Rev.* 2016;5:195.
10. German CL, Fleckenstein AE, Hanson GR. Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. *Life sci.* 2014;97(1):2-8.

11. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Eurojust (2016), *New psychoactive substances in Europe: Legislation and prosecution — current challenges and solutions*, EMCDDA–Eurojust joint publication, Publications Office of the European Union, Luxembourg. (pristup: 12.5.2018.)
12. Baumann MH, Solis E, Watterson LR, Marusich JA, Fantegrossi WE, Wiley JL. Baths Salts, Spice, and Related Designer Drugs: The Science Behind the Headlines. *J Neurosci.* 2014;34(46):15150-15158.
13. Namera A, Kawamura M, Nakamoto A, Saito T, Nagao M. Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicol.* 2015;33(2):175-194.
14. Gilani F. Novel psychoactive substances: the rising wave of “legal highs.” *Br J Gen Pract.* 2016;66(642):8-9.
15. Karila L, Megarbane B, Cottencin O, Lejoyeux M. Synthetic Cathinones: A New Public Health Problem. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(1):12-20.
16. Weinstein AM, Rosca P, Fattore L, London ED. Synthetic Cathinone and Cannabinoid Designer Drugs Pose a Major Risk for Public Health. *Front Psychiatry.* 2017;8:156.
17. Schifano F, Orsolini L, Duccio Papanti G, Corkery JM. Novel psychoactive substances of interest for psychiatry. *World Psychiatry.* 2015;14:15–26.
18. Liechti M. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Med Wkly.* 2015;145:w14043.
19. United Nations Office on Drugs Crime (UNDOC), *Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials.* 2015: UNDOC, Vienna. (pristup 10.2.2018.)

20. Krabseth HM, Tuv SS, Strand MC, Karinen RA, Wiik E, Vevelstad MS i sur. Novel psychoactive substances. Tidsskr Nor Legeforen. 2016;136:714-7.
21. <http://321-pcwebvarnish.newscyclecloud.com/storyimage/PC/20121024/NEWS01/121029973/AR/0/AR-121029973.jpg?q=100> (pristup: 27.5.2018.)
22. Prosser JM, Nelson LS. The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. J Med Toxicol. 2012;8(1):33-42.
23. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/74/Mephedrone-2D-skeletal.png> (pristup 27.5.2018)
24. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b7/MDMC.PNG> (pristup: 27.5.2018.)
25. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7c/MDPV.svg> (pristup: 27.5.2018.)
26. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/30/Bk-MBDB.svg> (pristup: 27.5.2018.)
27. U.S. Department of Justice, National Institute of Justice. (2015). Improved detection of synthetic cathinones in forensic toxicology samples: Thermal degradation and analytical considerations (Award No. 2012-R2-CXK003). Washington, DC: Kerrigan, S. (pristup: 25.5.2018.)
28. Banks ML, Worst TJ, Sprague JE. Synthetic Cathinones and amphetamine analogues: What's the rave about? J Emerg Med. 2014;46(5):632-642.
29. Anizan S, Concheiro M, Lehner KR, Bukhari MO, Suzuki M, Rice KC i sur. Linear pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and its metabolites in the rat: relationship to pharmacodynamic effects. Addict Biol. 2016;21(2):339-47.

30. Veršić-Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. 2015.
31. Harvey, David. Modern Analytical Chemistry. Boston: McGraw-Hill, 2000.
32. <http://slideplayer.com/slide/6246629/> (pristup: 21.7.2018.)
33. Juhascik MP, Jenkins AJ. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs. *J Chromatogr Sci.* 2009;47(7):553-7.
34. Pravallika S. Gas Chromatography: A Mini Review. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2016;5(2):2347-2340.
35. Harris, Daniel C. Quantitative Chemical Analysis. New York, NY: W.H. Freeman and Co, 2007.
36. Masena spektrometrija. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža [Internet] 2018 [cited 2018 May 20] Available from: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39268>
37. <https://www.shimadzu.com/an/sites/default/files/ckeditor/an/gcms/qn50420000005ykm-img/qn50420000005yll.jpg> (pristup 21.7.2018.)
38. Olesti E, Pujadas M, Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pozo ÓJ, Farré M i sur. GC-MS Quantification Method for Mephedrone in Plasma and Urine: Application to Human Pharmacokinetics. *J Anal Toxicol.* 2017;41(2):100-106.
39. Hong WY, Ko YC, Lin MC, Wang PY, Chen YP, Chiueh LC i sur. Determination of Synthetic Cathinones in Urine Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Techniques. *J Anal Toxicol.* 2016;40(1):12-6.

40. Majchrzak M, Celiński R, Kuś P, Kowalska T, Sajewicz M. The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol.* 2018;36:33-50.
41. DeRuiter J, Hayes L, Valaer A, Clark CR, Noggle FT. Methcathinone and designer analogues: Synthesis, stereochemical analysis, and analytical properties. *J Chromatogr Sci.* 1994;32(12):552-564.
42. Noggle FT, DeRuiter J, Valaer A, Clark CR. GC-MS analysis of methcathinone and its major decomposition product. *Microgram.* 1994;27(4):106-118.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za simultano određivanje koncentracija pet sintetskih katinona (bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a) u mokraći, koja podrazumijeva izradu umjernih krivulja pomoću otopina referentnih standarda poznatih koncentracija te njihovu primjenu na uzorcima u kojima su koncentracije tih sintetskih katinona nepoznate.

Materijal i metode: Otopine sintetskih katinona (bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a) za izradu umjerne krivulje dobivene su serijskim razrjeđivanjem referentnih standarda u uzorku mokraće koji je negativan na prisutnost sredstava ovisnosti te su zajedno ekstrahirane i pripremljene za analizu GC-MS-om. Koncentracije bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a određivale su se u dvama biološkim uzorcima mokraće u koje su dodani različiti nepoznati volumeni pripremljenih standardnih otopina. Ekstrahirani su metodom tekuće-tekuće (LLE), razrijeđeni kloroformom i analizirani plinskom kromatografijom s masenim spektrometrom snimanjem ukupne ionske struje (TIC).

Rezultati: Kvantitativnom analizom pri 4000 ng/mL detektirano je svih pet sintetskih katinona i dobiveni su podaci o njihovim karakterističnim retencijskim vremenima (RT) i spektrima masa. Nedostatak je što signali nisu pravilnog oblika. Umjerne krivulje za simultano dokazivanje bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a uspješno su konstruirane pomoću dobivenih signala ciljanim mjerenjem otopina standarda u mokraći pri koncentracijama 200-4000 ng/mL. U oba biološka uzorka detektirano je svih pet sintetskih katinona te su očitane njihove nepoznate koncentracije. Prisutnost bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a u oba uzorka mokraće je potvrđena i nakon derivatizacije.

Zaključci: Razvijena je i provjerena GC-MS metoda primjenjiva za simultanu kvalitativnu i kvantitativnu analizu pet sintetskih katinona (bufedrona, mefedrona, DMMC-a, pentilona i MDPV-a) u biološkim uzorcima mokraće. To ima veliku važnost jer se sintetski katinoni sve više šire na globalnom tržištu. Daljnja istraživanja trebala bi uključiti veći broj sintetskih katinona i više vrsta bioloških uzoraka za dokazivanje njihovog prisutstva.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Quantitative determination of synthetic cathinones

Objectives: The objective of this study was to develop a method for simultaneous concentration determination of five synthetic cathinones in urine (buphedrone, mephedrone, DMCC, pentylone and MDPV), which implies plotting calibration curves using reference standard solutions of known concentrations and applying them to determine unknown concentrations of those synthetic cathinones in urine samples.

Material and Methods: In order to make the solutions of synthetic cathinones (buphedrone, mephedrone, DMCC, pentylone and MDPV) that would be used for creating the calibration curve, serial dilution of reference standard solutions was made in an urine sample, which had previously been confirmed to give a negative result for substances of abuse. The five synthetic cathinones were extracted jointly and prepared for a GC-MS analysis. After adding different unknown volumes of standard solutions to two urine samples, concentrations of buphedrone, mephedrone, DMCC, pentylone and MDPV were determined. Liquid-liquid technique was used for the extraction of samples, followed by dilution in chloroform to prepare for a GC-MS analysis. The chosen working mode was total ion current (TIC).

Results: All five synthetic cathinones were detected after qualitative analysis of concentration 4000 ng/mL. Also, information about their retention times (RT) and mass spectra was obtained. Slightly irregular signal shapes could be seen as a disadvantage. Calibration curves for simultaneous determination of buphedrone, mephedrone, DMCC, pentylone and MDPV were successfully constructed using peak signals obtained by analysing concentrations 200-4000 ng/mL. In both urine samples all five synthetic cathinones were detected and their unknown concentrations were determined. The presence of buphedrone, mephedrone, DMCC, pentylone and MDPV in both urine samples was additionally confirmed after derivatization.

Conclusion: A GC-MS method applicable to simultaneous qualitative and quantitative analysis of five synthetic cathinones (buphedrone, mephedrone, DMCC, pentylone and MDPV) in urine samples has been developed and tested. Such method development is valuable because synthetic cathinones are spreading rapidly across the global market. Further investigations ought to include more synthetic cathinones, as well as different types of biological samples.

OSOBNI PODATCI:

IME I PREZIME: Martina Bošnjak

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 6. prosinca 1994. u Splitu

DRŽAVLJANSTVO: hrvatsko

ADRESA STANOVANJA: Perivoj Ane Roje 2, 21000 Split, Hrvatska

ELEKTRONSKA POŠTA: martina.bosnjak777@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2001. – 2009. Osnovna škola „Sućidar“, Split

2009. – 2013. I. gimnazija Split, jezični smjer

2013. – 2018. Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

AKTIVNOSTI NA FAKULTETU:

2018. Članica organizacijskog odbora međunarodnog natjecanja u znanju studenata farmacije i medicine „Pharmaceutical and Medical Knowledge Showdown“

RADNO ISKUSTVO:

ožujak 2018. – rujan 2018. Stručno osposobljavanje u zdravstvenoj ustanovi Ljekarna Splitsko-dalmatinske županije, ljekarnička jedinica „Sućidar“

STRANI JEZICI:

Engleski – C2

Njemački – B2

Španjolski – A2

OSTALO:

Rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000

Vozačka dozvola: B kategorija