PROBIR SREDSTAVA OVISNOSTI U BIOLOŠKIM UZORCIMA: ODABIR METODA

Primorac, Anđa

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:995442

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Anđa Primorac

PROBIR SREDSTAVA OVISNOSTI U BIOLOŠKIM UZORCIMA, ODABIR METODA

Završni rad

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Anđa Primorac

PROBIR SREDSTAVA OVISNOSTI U BIOLOŠKIM UZORCIMA, ODABIR METODA

Završni rad

Mentor:

Prof.dr.sc Davorka Sutlović

Split, 2014.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
   1.1. SREDSTVA OVISNOSTI 1
   1.2. PODIJELA SREDSTAVA OVISNOSTI 1
      1.2.1.Stimulansi 1
   1.3. LABORATORIJSKE MOGUĆNOSTI 7
   1.4. METODE PRETRAŽIVANJA 8
      1.4.1. Imunokemijske metode za testiranjesredstava ovisnosti u biološkim uzorcima 10
      1.4.2. Radioimunokemijske metode 11
      1.4.3. Enzimo-imunokemijske metode 12
      1.4.4. Fluoroimunokemijske metode 13
      1.4.5.Tankoslojna kromatografija 13
   1.5. METODE POTVRĐIVANJA 13
2. CILJ RADA 16
3. MATERIJALI I METODE 17
   3.1. MATERIJALI 17
   3.2. INSTRUMENTI 18
4. RASPRAVA 21
5. ZAKLJUČAK 24
6. SAŽETCI 25
   6.1. SAŽETAK 25
   6.2. SUMMARY 26
7. LITERATURA 27
8. ŽIVOTOPIS 29

1. UVOD

1.1. SREDSTVA OVISNOSTI

Ovisnost prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije je duševno, a ponekad i tjelesno stanje koje nastaje međudjelovanjem živog organizma i sredstva ovisnosti (1).Obilježavaju ga ponašanje i drugi duševni procesi koji uvijek uključuju prisilu za povremenim ili redovitim uzimanjem sredstva ovisnosti u namjeri da se doživi njegov učinak na duševne procese ili da se izbjegne nelagoda zbog odsutnosti takvog sredstva (2). Ovisnost o drogama je psihičko, ali može biti i fizičko, stanje koje nastaje interakcijom između živog organizma i tvari, i kojemu je svojstveno ponašanje i odgovori koji uvijek podrazumijevaju prisilu da se posegne za tom tvari, bilo trajno bilo povremeno, s ciljem da se dožive psihički učinci, a ponekad da se olakša patnja kada droga nedostaje. Tolerancija može i ne mora biti prisutna. Pojedinac može biti ovisan o većem broju droga (3).S vremenom se pojam droge ograničio na **opojne droge(narkotici)**i neke druge sintetski izrađene tvari koje djeluju na središnji živčani sustav, tj. **psihoaktivne tvari**.

1.2. PODIJELA SREDSTAVA OVISNOSTI

Prema farmakološkom djelovanju droge dijelimo ih u šest osnovnih kategorija (4):

1. Stimulansi
2. Depresanti
3. Narkotici (opijati)
4. Halucinogeni
5. Kanabis
6. Inhalanti

1.2.1.Stimulansi

Stimulansi su tvari koje aktiviraju središnji živčani sustav (SŽS). Ova grupa uključuje amfetamine, metamfetamine, kokain i efedrin (5).

Amfetamini su sintetički stimulansi središnjeg živčanog sustava i uzrokuju znatne promjene mentalnih funkcija i ponašanja (6). Najčešći oblik amfetamina je amfetamin sulfat, bijeli prah čija čistoća varira (obično između 6 i 10%). Male doze smanjuju apetit, povećavaju znojenje i krvni tlak, ubrzava se kucanje srca i šire se zjenice. Osoba pod djelovanjem amfetamina osjeća se nemirno, uznemireno i začuđeno, ponekad i zlovoljno.Veće doze pojačavaju učinke, a osoba postaje sve više uzbuđena, govorljiva i proživljava lažni osjećaj samopouzdanja ili nadmoćnost. Može se ponašati i na bizaran način; neki postaju agresivni i neprijateljski raspoloženi. Veće doze mogu izazvati suhoću usta, povišenu tjelesnu temperaturu, znojenje, glavobolju, zamagljen vid, vrtoglavicu, proljev ili zatvor i gubitak apetita.Mogu se uzimati oralno, intravenski i pušenjem. Metaboliziraju se deaminacijom, oksidacijom i hidroksilacijom i izlučuje mokraćom (8 do 24 sata nakon uporabe) (5).

Metamfetamini se pojavljuju u dva oblika: D i L izomerni oblici. D oblik je snažan stimulans SŽS-a i izaziva ovisnost. L oblik se može koristiti kao sredstvo za inhaliranje i ne izaziva ovisnosti. Test na amfetamin u urinu će detektirati i konzumente metamfetamina, ne zato jer je specifičan prema metamfetaminu, već iz razloga što se metamfetamin djelomično iz organizma izlučuje nepromijenjen, a dio metamfetamina se metabolizira i izlučuje u obliku amfetamina (7).



Slika 1. Amfetamin

Kokain je prirodni alkaloid dobiven ekstrakcijom iz lišća koka. Najjači je prirodni psihostimulans i izaziva vrlo snažnu psihičku ovisnost. Unosi se pušenjem i ušmrkavanjem. Kokain se brzo apsorbira putem nazalne i bukalne sluznice ili inhalacijom i apsorpcijom preko plućnih alveola.Testovi za kokain mogu otkriti tragove konzumacije u urinu 24-72 sata nakon posljednjeg uzimanja (5).



Slika 2. Kokain

Efedrinje psihostimulans po djelovanju sličan amfetaminu, a nekontrolirano uzimanje može uzrokovati moždani udar. Uzima se u kapima za nos i oralnim putem u obliku sirupa ili tablete.Zloupotreba efedrina ima brojne neželjene kratkotrajne i dugotrajne posljedice. Može nastupiti drhtanje ruku,tremor, znojenje, ubrzano kucanje srca i povišeni krvni tlak, vrtoglavica, mučnina, povraćanje, razdražljivost i osjećaj unutarnjeg nemira (8).

1.2.2. Depresanti

Depresantisu grupa droga koja izaziva stanje duboke relaksacije, apatije, letargije i depresije inhibirajući odgovore na akcije središnjeg živčanog sustava. Najpoznatiji su barbiturati (9).

Barbiturati se kao sedativi uzimaju oralno, intramuskularno, rektalno i intravenozno. Metaboliziraju se u jetri oksidacijom i konjugacijom, a izlučuju se putem bubrega. Test na barbiturate otkriva skupinu barbiturata među kojima su sekobarbital, pentobarbital i fenobarbital, odnosno barbiturati pod tvorničkim nazivima poput Phenobarbitona, Luminala i Phemitona. Test pritom ne može razlučiti koja vrsta barbiturata je konzumirana od 10 do 11 koliko ih se nalazi obično deklariranih u uputi za rukovanje testa (6).



Slika 3. Barbiturati

1.2.3. Narkotici

Narkotici ili opijati su blokatori provođenja impulsa boli od periferije k mozgu. Među najznačajnije ubrajaju se kodein, morfin, opijum, metadon i heroin.

Kodein je prirodni alkaloid koji se koristi ako antitusik i antidijaroik (5). Približno 5-10% kodeina će se metabolizirati u morfin, a ostatak će se konjugirat u kodein-6-glukuronid ili će se pretvorit u norkodein. Metabolizam se odvija u jetri. Nakon oralnog uzimanja izlučuje se urinom.

Morfin je glavni alkaloid opijuma čiji su značajni učinci analgezija i sedacija. Primjenjuje se parenteralno, oralno, supkutano, intramuskularno i intravenski. Heroin se proizvodi jednostavnim kemijskim postupkom iz morfina (morfija), a nakon konzumacije u organizmu vrlo brzo se razgrađuje na drogu iz koje je i proizveden morfin.



Slika 4. Morfin

Heroin je prirodna droga proizvedena iz morfina. To je najčešće upotrebljavana droga koja razvija ovisnost za 10-20 dana ako se uzima svaki dan. Konzumira se ušmrkavanjem, pušenjem, potkožno i intravenski. Zbog dobre topljivosti u mastima, brzo prolazi krvno-moždanu barijeru. Procesom hidrolize metabolizira se u 6-monoacetilmorfin i morfin. Poluvrijeme heroina u krvi nakon intravenskog uzimanja je između 2-8 min, nakon pušenja 3-5 min te nakon ušmrkavanja 5-6 min. Heroin u urinu se može otkriti i nakon nekoliko sati.



Slika 5. Heroin

Metadon je sintetički opijat s jako izraženim analgetskim učinkom, analgetik iz grupe difenilpropilamina. Po sastavu je hidrohlorid i djeluje na morfinske receptore u mozgu, gdje 1 mg metadona zamjenjuje i postiže efekt 4 mg morfina. Metabolizira se u jetri, te se može pronaći u urinu.



Slika 6. Metadon

1.2.4. Halucinogeni

Halucinogeni su tvari koje iskrivljuju percepciju, tj. uzrokuju vidne, slušne i dodirne psihološke poremećaje. Mogu se jesti, sisati, uzimati oralno u obliku tableta, intravenski ili pušiti. U halucinogene ubrajamo LSD, kanabinoidi, fenciklidin i dr. (5).

Kanabinoidisu psihoaktivne tvari koje se pojavljuju u obliku marihuane i hašiša, a konzumiraju se pušenjem. Za imunološke testove na fenciklidin (PCP) je karakteristično da mogu unakrsno reagirati sa kemijski sličnim tvarima pa je tako poznata *cross*-reaktivnost sa analgeticima meperidinom (Demerol) i propoksifenom (Darvon).Kod pozitivnih rezultata preliminarnih potrebno je napraviti analizu potvrdne metode (6).

Kanabissu tvari različitog djelovanja (ponekad potiču, snižavaju aktivaciju, iskrivljuju percepciju). Oblici u kojima se pojavljuje su marihuana i hašiš. Detekciji metabolita marihuane ili hašiša pogoduje činjenica da se marihuana (THC) dugo izlučuje iz organizma pa se i uz rjeđe testiranje otkriva relativno veliki broj konzumenata. Test je

također mnogo lakše interpretirati jer ne postoje tetrahidrokanabinolu slične tvari u lijekovima ili hrani.



Slika 7. Kanabis

1.2.5.Inhalanti

Inhalatima se nazivaju tvari čijim udisanjem u obliku kemijskih para stvaraju psihoaktivne učinke, što znači da njihova zloporaba dovodi do promjene stanja svijesti. Primjer su im ljepilo, benzin, nitroksid, aromatski ugljikovodici (5).

Ovisnost može biti psihička i fizička. **Psihička ovisnost**je kada osoba povremeno ili trajno uzima drogu da bi dostigla osjećaj zadovoljstva i ugode i/ili izbjegla neugodu. **Fizička ovisnost**je stanje koje nastaje obično nakon duljeg uzimanja droge, a kada se droga prekine uzimati, nastupa niz simptoma koji čine apstinencijski ili sindrom ustezanja**.**Ovisnost stvara i toleranciju koja je definirana kao pojava smanjene osjetljivosti organizma na određenu tvar, zbog čega su za postizanje istih ili sličnih učinaka potrebne sve veće i veće količine sredstava (10).

Pravne vlasti zahtijevaju znanstvenu identifikaciju mnogih lijekova i droga u svrhu provođenja zakona o uzimanju i zlouporabi.

1.3. LABORATORIJSKE MOGUĆNOSTI

Tvari i predmeti oduzeti sa sumnjom da predstavljaju drogu dostavljaju se stručnim ustanovama kako bi se izvršila njihova identifikacija. U toksikološkim laboratorijima za te potrebe koriste se dvije skupine analiza, pretražne i potvrdne. Toksikološka analiza sredstava ovisnosti oslanja se na raznim metodama istraživanja uključujući tankoslojnukromatografiju(engl. *Thin Layer Chromatography* iliTLC),tekućinskukromatografijuvisoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*,HPLC), imunoanalizu i mnoge druge.Neposredno testiranje sredstava ovisnosti dijelimo na testiranje na mjestu (engl. *on-site*), i testiranje uz bolesnika (engl. *Point-Of-Care,*POC). Kvaliteta rezultata toksikološke analize sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima ovisi o stručnosti osoblja, iskustvu, odgovarajućim reagensima i ispravnom radu instrumenata (11).Tržište testova za identifikaciju i kvantifikaciju droga bori se s opasnošću izdavanja lažno negativnih nalaza. Na razvijenom tržištu dijagnostičkih testova postoje i sigurniji testovi, mnogo osjetljiviji i specifičniji, a ujedno relativno otporni na brojne pokušaje zavaravanja konzumenta različitih sredstava ovisnosti. Takvi testovi izvode se u laboratorijima bolničkih ustanova, na potpuno automatiziranim aparatima i na kojima rade educirane osobe koja. Laboratorijskaidentifikacija i kvantifikacija najsigurnija je metoda izdavanja takvih rezultata, pa je to ujedno potvrdna metoda svih drugih testova koji su danas lako dostupni širokoj populaciji**.** Primjer lako dostupnih testova su *test-trakice*. Na tržištu postoje brojni proizvođači test-trakica koji otkrivaju prisutnost desetak najčešće korištenih droga. Ta faza identifikacije, često nazivana *screening metodom*, daje samo najosnovniju informaciju o tome konzumira li netko drogu ili ne (12).

Primjer *on-site* testiranja sudionika u prometu je **Cozart RapiScan** -test za 5 vrsta droga**.** Predstavlja sustav koji se sastoji od sakupljača sline, seta za testiranje na droge i instrumenta za očitavanje.Cozart RapiScan sustav daje samo preliminarne analitičke rezultate testiranja. Za potvrđivanje preliminarnih analitičkih rezultata treba koristiti neku od kemijskih metoda. Preporuča se plinska kromatografija ili spektrometrom masa (GC-MS). Bilo koje testiranjena droge treba potvrditi kliničkim dokazima i profesionalnom prosudbom (13).

1.4. METODE PRETRAŽIVANJA

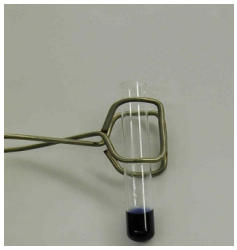
Svrha metoda pretraživanja je utvrditi nalazi li se u ispitivanom uzorku droga i kojoj skupini droga pripada. Pretražne metode, osim točnih, mogu dati lažno pozitivno ili lažno negativne rezultate. Primjer kod osobe koja konzumira drogu ne možemo pronaći dovoljnu koncentraciju droge u uzorku zbog prisutnosti neke druge tvari koja otežava analizu (npr. sol, aspirin, sredstva za čišćenje, različiti čajevi, pretjerana hidracija ovisnika, soda bikarbona i brojne druge) (12).Probir sredstava ovisnosti započinje određivanjem fizikalnih svojstava. Iskusan analitičar već vizualnim pregledom tvari te na osnovu fizičkih obilježja uzorka može pretpostaviti o kojoj se skupini droge radi. Pri tome uzima u obzir oblik izgleda tvari, veličinu čestica, boju, miris i slično.

Prve kemijske analize koje se provode su reakcije obojenja. Za ovu vrstu analize potrebna je mala količina uzorka koja reagira s reagensom i daje karakterističnо obojenje. Primjeri takvih testova su Duquenois za produkte konoplja (primjer 1), Marquise za alkaloide opijuma, amfetamine i drugo (primjer 2) (5).

Primjer 1. Testiranje marihuane sa Duquenois-Levine testom. (slike 8, 9,10).Marihuana postaje ljubičasta nakon dodavanja Duquenois reagensa i klorovodične kiseline (14).



Slika 8. Duquenois-Levine test, korak 1., dodavanje Duquenois reagensa za sušenje petroletera (izvor: Wikipedia)



Slika 9. Duquenois-Levine test, korak 2., dodavanje klorovodične kiseline (izvor: Wikipedia)

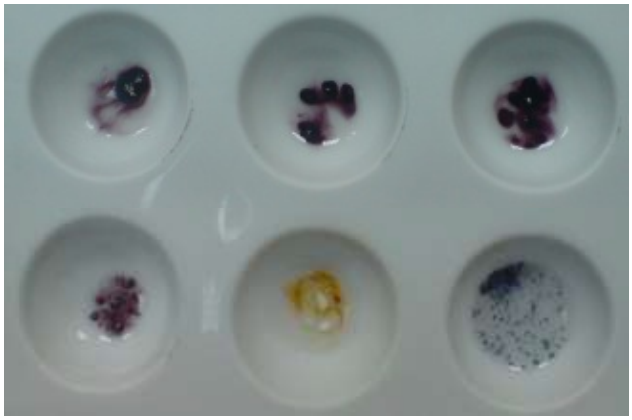


Slika 10. Duquenois-Levine test, korak 3., dodavanje kloroforma (izvor: Wikipedia)

Primjer 2. Pripremljeni sirovi uzorak tj. njegov dio mase 0,0001 grama je podvrgnut spot-test metodi, tj. reakcijama, kojima se u osnovi uglavnom testiraju praškasti materijali ili njihovi ekstrakti. Najčešćireagens koji se koriste u tu svrhu i na osnovu čije bojene reakcije se možete opredijeliti za dalji tok analize i izbor metoda je Marquis reagens (2,5 ml konc. H_2SO_4 i par kapi formaldehida). Rezultat reakcije heroinskog miksa, amfetamina i MDMA sa Marquis reagens- om je prikazan u tablici 1 i na slici 11 (15).

Tablica 1. Rezultat reakcije

REAGENS	**Marquis-reagens**
PREPARAT	
Heroin mix	**ljubičasta -> crna**
Amfetamin	**narančasta -> smeđa**
Metaamfetamin	**narančasta -> smeđa**



Slika 11. Rezultat reakcije heroinskog mix-a, amfetamina i MDMA sa Marquis reagens- om.

1.4.1. Imunokemijske metode za testiranjesredstava ovisnosti u biološkim uzorcima

Imunološko ispitivanje je postupak koji se u toksikološkoj analizi koristi za probiranje (screening) opojnih droga i lijekova u biološkim uzorcima. Najčešći imunološki princip modernih imunoloških testova bazira se na fenomenu kompeticije. U testu se nepoznata količina droge (ili njenog metabolita) natječu (kompetiraju) sa točno poznatom koncentracijom droge obilježenom obojenim česticama, enzimima, radioaktivnim ili fluorescentnim materijalom za antitijelo specifično na tu drogu ili njen metabolit.

Ovisno o vrsti materijala koji se koristi u testu, metode imaju različite nazive: imunokromatografska metoda, enzimska (ELISA), radioaktivna (RIA) ili fluorescentna. Ovisno o količini droge u testiranom uzorku i njezinom natjecanju sa obilježenom drogom iz samog testa proizaći će rezultat koji se može očitati vizualno kao u imunokromatografskim testovima promjenom boje na za to određenom mjestu ili će promjenu enzimske, radioaktivne ili fluorescentne aktivnosti očitati sofisticirani laboratorijski aparat. Iz prethodno navedenog jasno je da za imunokromatografske testove nije potreban aparat za očitavanje testa pa ga je moguće koristiti kao kućni test, dok su ostala imunološka testiranja bazirana na očitavanju u aparatima pogodna samo za laboratorijski rad.Imunološki testovi za uvodna (screening) testiranja bez obzira da li su to "On-Site" imunokromatografski testovi ili ELISA laboratorijski testovi imaju ugrađene granične vrijednosti u nanogramima droge na mililitar mokraće pri kojima test pokazuje pozitivan rezultat (6).S obzirom na način otkrivanja reakcije između antigena i protutijela, imunokemijske tehnike moguće je podijeliti u dvije skupine:

1. **neobilježene ili izravne tehnike**, u kojima se mjerenja izvode uzoniekvivalencije reaktanata kada dolazi do stvaranja netopivih imunoprecipitata (taloga). Njih možemo dalje podijeliti na:kvalitativne (imunoelektroforeza, protusmjerna imunoelektroforeza) i kvantitativne (radijalna imunodifuzija, eletroimunoprecipitacija, imunoturbidimetrija, imunonefelometrija).
2. **obilježene tehnike,** kod kojih se mjeri primarna reakcija između Ag i At uzkorištenje obilježenihreaktanata.Ovim tehnikama omogućeno je mjerenje tvari koje se u organizmu nalaze u vrlo malim količinama (do 10^{-14} mol/L). One se

mogu podijeliti na: kvalitativne (imunoblot) i kvantitativne (RIA, ELISA, LIA, FIA).

U toksikološkim laboratorijima treba se pridržavati osnovnih smjernica kod identifikacije i interpretacije nalaza sredstva ovisnosti. Smjernice sadrže naputke za početno probiranje na sredstva ovisnosti koji se provodi imunokemijskim metodama (EIA, FPIA, CEDIA, EMIT, ELISA...). Imunokemijske metode probiranja imaju zadovoljavajuću osjetljivost, ali često nedovoljnu specifičnost. Kvalitativne pretrage za ispitivanje zloupotrebe sredstava ovisnosti u mokraći zahtijevaju definiranu graničnu vrijednost (engl. *cut-off*) koja će razlikovati pozitivne od negativnih rezultata. Rezultati ispod granične vrijednosti interpretiraju se kao negativni, a iznad granične vrijednosti kao pozitivni. Za većinu imunokemijskih metoda, granične vrijednosti postavlja proizvođač na temelju analitičkih svojstava metode. Veća granična vrijednost povećava dijagnostičku specifičnost, ali smanjuje osjetljivost. Suprotno, manja granična vrijednost, povećava osjetljivost, ali smanjuje specifičnost.Rutinsko kvalitativno probiranje na sredstva ovisnosti u kliničkoj praksi uključuje amfetamine, kokain (i metabolite), kanabinoide, metadon, opijate, benzodiazepine i barbiturate.

Laboratorij koji nema u cijelosti razvijene analitičke potvrdne tehnike mora deklarirati stupanj identifikacije i pouzdanost svojih nalaza te naznačiti jasno da nalaz probiranja nije puno vrijedan ako se ne provede potvrda. Analitička toksikologija strogo propisuje obvezu potvrđivanja pozitivnog nalaza. Metode potvrde trebaju imati bolju specifičnost i barem istu osjetljivost. Npr., ako se probiranje provodi imunokemijskom metodom, onda se potvrdna pretraga za isti uzorak treba provesti kromatografskom tehnikom (tankoslojna, tekućinska, plinska kromatografija). Pozitivan nalaz amfetamina i opijata dobiven probiranjem, potrebno je potvrditi drugom analitičkom metodom, a ako nije potvrđen potrebno je to jasno naznačiti na nalazu. Testovi potvrde za benzodiazepine, kanabinoide, kokain i metadon nisu potrebni u rutinskom kliničkom radu, budući da imunokemijski testovi imaju zadovoljavajuću specifičnost i iznimno rijetko daju lažno pozitivan rezultat (16).

1.4.2. Radioimunokemijske metode

Radioimunokemijske metode su metode kod kojih se antigen obilježava određenim radioizotopom (npr. tricij i jod).Odnosno, pretraga se zasniva na mjerenju omjera vezanog i slobodnog, radioaktivnom tvari obilježenog antigena (najčešće hormona),

nakon davanja nepoznate količine neobilježenog antigena u smjesu obilježenog antigena i vezne bjelančevine. Najčešće se kao radioizotop koristi jod, a razlozi tome sujednostavnost, jeftina oprema, brzina i veća energija zračenja. Radioimunokemijske metode upotrebljavamo za određivanje lijekova u različitim fluidima i forenzičnim materijalima (urin, plazma, krv, serum, slina, kosa i mekonij). Ove metode se razvijaju od 1959. godine kad su ih prvi put opisali dr. Yalow i Berson. Prednost radioimunokemijskih metoda pri određivanju koncentracije lijekova u različitim biološkim uzorcima je niska granica detekcije. Metoda je osjetljiva i specifična. Osjetljivost je velika jer proizlazi iz prirodne interakcije Ag-At i osjetljivosti mjerenja završne točke. Specifičnost metode je stupanj interferencije drugih tvari prisutnih u uzorku s onom koju mjerimo. Nedostaci ovih metoda su zbrinjavanje i rukovanje radioaktivnim materijalima. Čitav proces zahtjeva posebne mjere opreza i licenciranje.

1.4.3. Enzimo-imunokemijske metode

Prvi enzimski imunotest predstavljen je 1972. i otada su razvijeni različiti oblici enzimskih imunotestova, koji su bili jednostavne, visoko produktivne analize, koje su se nadalje mogle automatizirati i standardizirati. Tradicionalne metode, temeljene na hemaglutinacijskim reakcijama, imunodifuziji i do određenog stupnja imunofluorescenciji, sve se više zamjenjuju manje zahtjevnim testovima temeljenim na tehnikama imunoblota ili enzimskom imunotestu (engl. *Enzyme Immunoassay*, EIA), koji je u širokoj primjeni za otkrivanje prisutnosti ili koncentracije pojedinačnih antitijela u biološkim tekućinama (17). Kod ovih metoda antigen je obilježen enzimom, a kolorimetrijski se mjeri djelovanje enzima na supstrat. Dodavanjem supstrata enzimu na kraju reakcije omogućuje se točna i osjetljiva detekcija aktivnosti enzima. Metoda može biti kvalitativna i kvantitativna, a obavlja se u pločama za mikrotitraciju.

Enzimsko-imunokemijske metode se mogu podijeli na homogene i heterogene (je li potrebno na kraju reakcije odvojiti kompleks At-Ag od slobodnog antigena), EIA (koji je reaktant obilježen), IEMA (protutijelo), kompetitivne i nekompetitivne metode. Enzimi koji se služe kao obilježivači su glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, peroksidaza. Osjetljivost ove metode je manja nego kod radioimunokemijskih metoda.

1.4.4. Fluoroimunokemijske metode

Fluoroimunokemijska metoda je homogeno kompetitivno imunoodređivanje. FPIA je metoda kojom se mjeri fluorescencija nekog fluorofora, odnosno apsorpcija zračenja jedne valne duljine i emitiranje druge valne duljine. Polarizirano svjetlo pobuđuje fluorofor i podiže ga u ekscitirano stanje. Ukoliko je fluorofor vezan za veliku molekulu antitijela, ne rotira se slobodno i polarizacija je održana. Ako fluorofor slobodno rotira pošto mala molekula nije vezana, polarizacija je izgubljena. Zbog rotirajućih svojstava molekula u otopini, stupanj polarizacije je direktno proporcionalan veličini molekule. Velika molekula se sporo rotira i emitira polarizirano svjetlo. Mjeri se svjetlost veće valne duljine koju je molekula emitirala. Prednosti fluoroimunokemijskih metoda su relativno dobra stabilnost reagensa, stabilna kalibracija i dobra preciznost.

1.4.5.Tankoslojna kromatografija

Kromatografija je jedna od najunčikovitijih separacijskih tehnika koje se koriste u forenzičnoj kemiji, toksikologiji, medicini, ekologiji i biokemiji.Tankoslojna kromatografija je kromatografska tehnika koja se koristi za razdvajanje kemijskih komponenti u smjesi. Izvodi se na način da se ispitivani uzorak prethodno otopljen u pogodnom otapalu nanese na kromatografsku pločicu i stavi u komoru za razvijanje. Uključuje stacionarnu fazu sastavljenu iz tankog sloja materijala za adsorpciju, obično silikagela, aluminijevog oksida ili celuloze, koji je pričvršćen na ravnu, inertnu ploču. Pokretna faza se sastoji iz ispitivanog uzorka koji je otopljen u odgovarajućem otapalu. Pokretna faza se kreće po stacionarnoj ploči, potiskivana kapilarnim silama, te se tako ispitivani uzorak razdvaja u pojedine komponente.Različite komponente prijeći će različitu udaljenost. Tako razdvojene komponente mogu se vizualizirati UV lampom pri određenim valnim duljinama. Tankoslojna kromatografija se koristi za provjeru prisutnosti droge u urinu. Metoda je brza, jednostavna i jeftina za kvalitativno ispitivanje različitih uzoraka.

1.5. METODE POTVRĐIVANJA

Kako je već rečeno, analiza uzorka se provodi u dva koraka. Uvodno testiranje je imunološki test, a uvijek je praćeno dodatnim potvrdnim testiranjem koji je kromatografski (tankoslojna, tekućinska, a najčešće plinska kromatografija sa masenom

spektrometrijom).Potvrdni test se provodi samo na uzorcima koji su u uvodnom testiranju pokazali pozitivne rezultate. Potvrdnom testu se podvrgava isključivo uzorak koji je u uvodnom testu bio pozitivan, a nikako ne neki novi uzorak od istog ispitanika. Metode potvrđivanja su plinska kromatografija, visokotlačna tekućinska kromatografija, infracrvena spektrometrija, plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (5).

Plinska kromatografija(engl. Gas Chromatography, **GC**), metoda kojom se mogu ispitivati spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturama od 400°C, a da se pri tome ne raspadnu. Plinska kromatografija s „headspace" je tehnika u kojoj se injektira plinovita faza koja je u ravnoteži sa tekućinom ili krutinom. Ova metoda se rutinski primjenjuje u analizi alkohola, ali i u analizi lakohlapljivih organskih spojeva. Smatra se „zlatnim standardom" u toksikologiji.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography, HPLC)je poznata po separaciji različitih vrsta uzoraka, brzini i vrlo niskom pragu detekcije. Separacija u tekućinskoj kromatografiji se opisuje u nekoliko teoretskih modela (adsorpcijska, razdjelna, kromatografija s izmjenom iona…). Omogućuje korištenje male količine uzoraka, visoku preciznost, a kao detektore koristi spektrofotometar, elektrokemijski detektor i spektrometar masa.

Spektrometrijske tehnike mjere apsorpciju, rasipanje ili emisiju elektromagnetskog zračenja. Spektrometrija je važno sredstvo u analizi složenih smjesa tvari te se intenzivno primjenjuje u forenzičnoj kemiji. **Infracrvena spektrometrija** je tehnika koja se temelji na apsorpciji IR zračenja kemijskih veza. IRspektrometrija u organskoj analizi ima najveći značaj jer omogućava detekciju funkcionalnih grupa i identifikaciju organskog spoja u području "otiska prsta".

Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) je analitička tehnika koja kombinira sposobnost plinske kromatografije sa analitičkom specifičnošću i osjetljivošću masenog spektrometra. Za pravno dokazivanje provodi se dodatna tzv. potvrdna GC/MS metoda vjerojatno pozitivnog uzorka. Samo GC/MS metoda može sa sigurnošću odrediti koja se tvar zaista nalazi u testiranom uzorku mokraće i u kojoj koncentraciji. Nedostatak tehnike je to što je priprema uzoraka složena, te što se javljaju ograničenja kod ispitivanja nehlapljivih i termo labilnih spojeva. Analizom uzorka na GC-MS instrumentu dobiva se kromatogram koji se najčešće snima na dva načina,

kaokromatogram ukupne ionske struje (engl. *Total Ion Current*, TIC) ili kao selektivno praćenje iona (engl. Selected *Ion Monitoring*, SIM).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je opisati metode za određivanje sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima, usporediti ih i odrediti prednosti između njih.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U otkrivanju ovisnosti kreće se od identifikacije i kvantifikacije droga u uzorku.Biološki uzorci koji se koriste kao materijali za analizu sredstava ovisnosti su urin, serum, slina, znoj, kosa, želučani ispirak i dr.

Urin ili mokraća je danas zlatni standard za testiranje droga jer se o metabolizmu droga i izlučivanju u mokraću najviše zna. Podaci su dobiveni na temelju milijuna testiranja kojima se testira uglavnom radna populacija u zapadnim zemljama. Prednost mokraće je i u činjenici da jedino za taj medij postoje legalne granične vrijednosti pri kojima ili iznad kojih se uzorak proglašava pozitivnim, kako za uvodna testiranja tako i za potvrdna testiranja. Za prikupljanje mokraće postoji zakonska procedura na koji se način uzorak prikuplja, koja točno dokumentacija se formira vezano uz svaki postupak uzorkovanja i tko će i na koji način vjerojatno pozitivne uzorke dodatno testirati i kojom potvrdnom metodom.Mokraća se daje u posudu dovoljne zapremine da se prikupi 30 - 45 ml što ovisi o postupku, u posudu sa ugrađenim termometrom da se smanji mogućnost krivotvorenja uzorka (dolijevanjem vode na primjer).Budući da mu je nedostatak mogućnost krivotvorenja, uzorak treba obavezno uzimati pod nadzorom.Uzorak se provjerava organoleptičkom provjerom (boja, mutnoća, talog, miris), provjerom topline uzorka, svježi uzorak mokraće je topao (temperatura oko 36,5ºC), mjerenjem kreatinina u mokraći. Uzorak koji ima koncentraciju kreatinina < 2,00 mmol/L ne treba uzimati u postupak jer je vjerojatno razrijeđen.

Slina je relativno nov medij koji se nastoji koristiti za testiranje na ilegalne droge i također ima svoje prednosti i mane. Zadržavanje droge u slini je kraće, ali se može naći ubrzo poslije konzumiranja te može dati objektivniju sliku o trenutnom stanju osobe koja se testira. To bi moglo pomoći u testiranju na prometnicama jer je u tom segmentu od značaja je li osoba pod trenutnim utjecajem droge ili ne. Slina kao uzorak je problematična iz razloga jer je potrebno prikupiti dovoljno sline (minimalno 2 mililitra) kako bi bilo dovoljno uzorka za uvodno i potvrdno testiranje.

Kosa se također može koristi kao uzorak za dokazivanje droge i karakterističan je po tome što daje mogućnost uvida u konzumaciju droge u prošlosti kroz više mjeseci. Pramen kose uz vlasište može sadržavati drogu koja je konzumirana prije 3 tjedna,

apramen kose 4 - 5 cm od vlasišta informaciju o konzumiranju droge prije 3 - 4 mjeseca. Postoji imunološki test za otkrivanje droge u kosi i radi se o laboratorijskom testu koji koristi radioimunološku metodu (RIAH) na uobičajene droge. Test je skuplji od klasičnih testova na mokraću, ali daje pregled unazad 3 mjeseca pa iz tog razloga ima svoje prednosti. Droga se u kosi također može dokazati GC/MS metodom ili još sofisticiranijom GC/MS/MS metodom (6).

Ostali uzorci biološkog podrijetla:

Uzorak krvi je dobar izbor za kvalifikaciju i kvantifikaciju droga i njihovih metabolita. Nedostatak krvi je niska koncentracija otrova pa zahtijeva specifične analitičke tehnike. Uzimanje krvi uz pomoć antikoagulansa daje prednost zbog brzog i pojednostavljenog odvajanja plazme, ali antikoagulansi mogu dovesti do promjena određenih konstituenata (5).

Želučani sadržaj analizom upućuje na pravi uzrok otrovanja. U ovom uzorku se obično nalazi samo osnovni otrov ili njegov produkt hidrolize.

Uzorak znoja se prikuplja tijekom 7 do 14 dana. Za prikupljanje uzorka znoja su izrađeni posebni flasteri koji se lijepe na nadlakticu, rame ili leđa ispitanika. Znoj se prikuplja u tim flasterima i daje pregled konzumacije droge (6).

Uzorak nokta omogućuje procjenu izloženosti u tjednima ili mjesecima nekom otrovu. Međutim, rijetko se koristi u toksikološkoj analizi iz razloga što je količina uzorka izuzetno mala zbog čega se teško provodi i osnovna analiza, a kamoli ponavljana analiza (5).

3.2. INSTRUMENTI

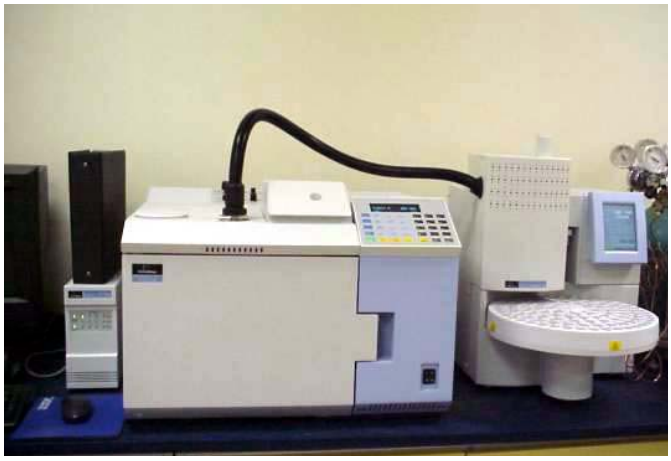
Instrumentalne tehnike za određivanje sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima su:

1. **Plinska kromatografija s masenim detektorom**(engl. *Gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS)(slika 12), točna i precizna metoda analize, automatizirana (autosampler kod injektiranja), analiza samo termostabilnih i hlapljivih tvari. Nezaobilazna je instrumentalna metoda u laboratorijima koji se bave identifikacijom sredstava ovisnosti.



Slika 12. Plinska kromatografija sa masenim detektorom (GC-MS)

2. Plinska kromatografija sa statičkim „head-space“ injektiranjem (slika 13), uzorak se drži dovoljno dugo na određenoj temperaturi dok se ne uspostavi ravnoteža između plinovite i krute/tekuće faze.



Slika 13. Plinska kromatografija s „head-space“

3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)(slika 14),predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanjekomponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Prednost u odnosu na ostale sustave je mogućnost istovremenog praćenja analize korištenjem dvaju detektora: DAD (Diode Array Detector, s mogućnošću izbora do 8 valnih duljina) i spektrometra mase (do 1650 Da).



Slika 14. Tekućinska kromatografija s visokom djelotvornosti

4. Infracrvena spektrofotometrija (slika 15)jedna je od najspecifičnijih instrumentalnih metodaidentifikacije.U praksi se ova metoda gotovo nikad ne koristi sama za identifikaciju, nego se dopunjuje sa drugim tehnikama (npr. masenom spektrofotometrijom).Riječ je o analizi spektara koji nastaju od molekulskih vibracija pri apsorpciji zračenja u infracrvenom dijelu spektra, vrši se uspoređivanje dobivenog infracrvenog spektra sa ranije snimljenim uzorkom određene droge, čime se ispitivani uzorak identificira (18).



Slika 15. Infracrvena spektrofotometrija (IR)

4. RASPRAVA

Sredstva ovisnosti, u prošlim vremenima, su bila sredstva namijenjena primarno u medicinske svrhe. Međutim, proteklo je već pola stoljeća otkako smo se suočili s raširenom ovisnošću o drogama i zlouporabom droga kao društvenim problemom. Zagonetka droge otvara brojne nedoumice o životnoj stvarnosti ovisnika o drogama, razlozima koji tjeraju ljude da posegnu za drogom i postanu ovisnici, te o vrlo teškom prevladavanju pogubne potrebe za njom (19). Početak uporabe duhana, alkohola i psihoaktivnih droga obično se zbiva u tijeku adolescencije, a mladi su, zbog specifičnosti razdoblja odrastanja, relativnog neiskustva te određene mladenačke sklonosti rizicima, najugroženija populacijska skupina za usvajanje i razvoj ovisničkoga ponašanja. Pri uzimanju droge doživljeni intenzitet ugode izazvan njezinim djelovanjem (podraživanje centara ugode u mozgu) ovisi o genetičkim čimbenicima, vrsti droge, dozi te o prethodnom psihičkom stanju osobe.Dijagnostikaovisnosti obuhvaća pregled i promatranje ovisnika, analizu tjelesnih tekućina (urin, krv, slina) na prisutnost metabolita droge, pretrage kojima se ustanovljuje stupanj oštećenja pojedinih organa (jetra, bubrezi, pluća) te virusne (hepatitis, HIV-bolest) i druge bolesti (sifilis, tuberkuloza). Analiza sredstava ovisnosti je moguća u različitim biološkim uzorcima (tjelesne tekućine, dlaka, brisovi, krv, urin…).Potražnja za brzim i širokim kliničkim metodama toksikološkog testiranja za identifikaciju sredstava ovisnosti i zlouporabe medicinskih lijekova u stalnom je porastu. Screening ili analiza uzoraka se izvodi pomoću imunoanalize, plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS), tekuće kromatografije-masene spektrometrije (LC-MS).Postupak testiranja počinje uvodnim testiranjem gdje se na brz i jednostavan način izdvajaju negativni od pozitivnih rezultata (brzi screening testovi).Imunotestovi za probir sredstava ovisnosti su brzi, međutim ove metode su kalibrirane na *„cut-off“* razine koje su veće od granice detekcije.

Dakle, nedostatak imunotestova sulažno negativni rezultati i lažno pozitivni rezultati. Prisutnost droga u organizmu moguće je utvrditi nakon 5 minuta bez obzira na to testira li se 5 ili više skupina droga. U običajnim metodama negativni rezultati smatraju se negativnim. Pozitivni rezultati (prvo testiranje) zahtijevaju potvrdu dodatnim skupljim sofisticiranim metodama. Potvrdni test se može provesti kromatografskom metodom, a najboljom metodom se smatra plinska kromatografija/masena spektrometrija.U istraživanju provedenomu Brazilu (20) napravljeno je testiranje uzoraka od žrtava

prometne nesreće provedenomplinskom kromatografijom sa masenim spektrometrom (u daljnjem tekstu GC-MS).

Plinska kromatografija-masena spektrometrijaje metoda razvijena i validirana za detekciju i kvantifikaciju kokaina, amfetamina i kanabisa u uzorcima krvi. Analiti su ekstrahirani pomoću ekstrakcije krute faze uz pomoć Bond Elut Certify, odnosno komercijalne, jednokratne kolone s krutim nosačem, koncentriranje eluata i derivatizaciju te analizu na GC-MS (Varian, Saturn 4D) s kapilarnom kolonom uz elektronsku ionizaciju i odabir karakterističnih kvantitacijskih iona. Metoda je provedena na uzorcima prikupljenih od žrtava prometne nesreće i uzorci su odabrani na temelju rezultata imunološkog testiranja prikupljenih urina. Pet uzoraka je bilo pozitivno na prisutnost kokaina i metabolita, četiri uzorka pozitivna na kanabinoide , šest uzoraka pozitivnih na amfetamin i dva uzorka su bila negativna. Neki uzorci bili pozitivni na više od jedne skupine lijekova. Rezultati dobiveni iz uzorka pune krvi su pokazali dobru sukladnost sa probirom urina. Razvijenom metodom GC-MS pokazala se sposobnost kvantificiranja, osjetljivosti, preciznosti i točnosti za sve tri klase sredstava ovisnosti u ovom istraživanju, putem procesa ekstrakcije. Točnost određivanja provjerena je i analizom standardnih referentnih uzoraka poznate koncentracije analita.Prema istraživanju provedenom u Hrvatskoj (21), u kojem su metodu GC-MS proveli na uzorcima urina, prednosti GC-MS su specifičnost, osjetljivost, preciznost i točnost, a nedostaci su dugo trajanje analize zbog neophodnosti pročišćavanja i koncentriranja urina, visoka cijena zbog potrebne opreme te mogućnost ograničenog broja analiza (20-30 tjedno). Dakle, GC-MS može otkriti različite analite, ali ova metoda uključuje dugotrajnu i mukotrpnu derivatizaciju analita.

U studiju koje je provedeno u Koreji (22) ispitivana je djelotvornost ultra-visoko-učinkovite tekućinske kromatografije(engl. *UltraHigh Performance Liquid*Chromatography, UHLPC).UHPLC metoda se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovu kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u koloni.Princip rada HPLC/UHPLC-a je forsiranje prolaska analizirane smjese kroz kolonu pumpanjem mobilne faze kroz istu. Unosi se mali volumen uzorka u tok mobilne faze i na osnovu specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarne faze i sastava mobilne faze. Kao otapala se koriste voda, metanol, acetonitril i razna druga organska otapala.Kromatografija na normalnim fazama koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu, a koristi se kada je tvar koja se

analizira polarna. Polarna tvar se adsorbira i zadržava na česticama stacionarne faze. U Bolničkom centru, gradu Bucheon, između srpnja 2011. i lipnja 2013. prikupljeno je 473 uzorka urina (pohranjenih na 4 ℃ do testiranja) od bolesnika radi određivanja djelotvornosti UHPLC metode.Rezultati istraživanja govore da je UHPLC metoda brza, djelotvorna, vrlo specifična i pouzdana, te da je poželjan način brzog probira sredstava ovisnosti u hitnim slučajevima.Prednost plinske kromatografije s masenim spektrometrom u odnosu na tekućinsku kromatografiju su bibiloteke spektra *Electrion Ionisation* (EI) koje se godinama nadopunjuju i olakšavaju identifikaciju nepoznatog analita, što je osobito važno upravo u području forenzične toksikologije (5). Analiza sredstava ovisnosti metodom GC-MS zahtijeva njegovu ekstrakciju iz mokraće koja se može provesti SPE(ekstrakcijom na čvrstoj fazi, *Solid Phase Extraction*) ili SPME metodama (mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi,*Solid Phase Microextraction*). Obje metode ekstrakcije su kvantitativne.

Spektometar masa može analizirati uzorak na dva načina: **cjelokupna analiza** (TIC) ili **selektivna analiza** (SIM). TIC metoda se koristi kada se želi utvrditi prisutnost neke tvari i odrediti njezino retencijsko vrijeme prije nego se pristupi SIM metodi. Veoma je koristan prilikom određivanja sadržaja nepoznatih uzoraka pa je daleko informativniji od SIM metode. SIM metoda se koristi ukoliko je poznato koja se tvar traži. Prednosti ove metode u odnosu na TIC su veći broj skeniranja po sekundi, niža granica detekcije i smanjenje utjecaja tvari prisutnih u uzorku koje djeluju interferirajuće. Preciznija je u odnosu na TIC kod kvantitativnog određivanja analita jer u TIC-u pik traženog analita može zahvatiti i dio nekog drugog analita slične mase.

5. ZAKLJUČAK

1. Uzorak mokraće je najčešći odabir u toksikološkim analizama, a jedan od najkorisnijih primjeraka za analizu je uzorak kose zbog duljeg perioda detekcije droge.
2. Probir sredstava ovisnosti započinje pretražnim metodama, čiji se rezultati moraju potvrditi. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa se smatra „zlatnim standardom“ potvrdnih metoda u toksikološkoj identifikaciji tvari. Metoda je veoma pouzdana i primjenjiva za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima.
3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je brza, vrlo specifična i pouzdana metoda pa je poželjan način brzog probira sredstava ovisnosti u hitnim slučajevima.

6. SAŽETCI

6.1. SAŽETAK

Uvod: Tema rada je probir sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima i usporedba metoda. Sredstva ovisnosti su sredstva koja razvijaju ovisnost posebno u tjelesnom (fizičkom), ali i u psihičkom smislu. Često se termini sredstva ovisnosti koristite kao sinonimi za droge, ali droge i sredstva ovisnosti nisu istoznačni pojmovi; droge se odnose i na sredstva koja dovode do ovisnosti, ali i na sredstva koja ne razvijaju ovisnost (barem ne u tjelesnom smislu).

Cilj: Cilj ovog rada je opisati metode za određivanje sredstava ovisnosti u biološkim uzorcima, usporediti ih i odrediti prednosti između njih.

Materijali i metode: Kao biološki uzorak koji se pretražuje najdostupniji je urin. Analiza sredstava ovisnosti se provodi i iz drugih bioloških uzoraka kao što su kosa, krv, slina i dr. Laboratorijska identifikacija i kvantifikacija se odnosi na potvrdne testove i automatizirane aparate. Primjeri potvrdnih metoda su plinska kromatografija sa spektrometrom masa, tekućinska kromatografija s visokom djelotvornosti i infracrvena spektrometrija. U kliničkim se laboratorijima tankoslojna i plinska kromatografija provode uspješno kao potvrdne metode.

Zaključak: U kliničkim se laboratorijima tankoslojna i plinska kromatografija provode uspješno kao potvrdne metode.„Zlatni standard" u toksikologiji je metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije koja je iz niza istraživanja pokazala visoku specifičnost, osjetljivost, preciznost i točnost.

Ključne riječi: tekućinska kromatografija s visokom djelotvornosti, plinska kromatografija sa spektrometrom masa, *screening* metoda.

6.2. SUMMARY

Introduction: The subject oh this paper was the screen of addictive substances in biological causes as well as the comparison of methods. Addictive substances are substances which cause addiction especially physical, as well as psyhological. Often the term addictive substances is used as a synonym for drugs, but drugs and addictive substances are not identical terms; drugs can be products that do notlead to addiction (at least not physical addiction.

Objective: The aim of this final project is to describe methods for the determination of drugs of abuse in biological samples, compare them and determine benefits between them.

Materials and methods: The most accessible (common) biological sample is urine. Other biological samples which can be used to analyze addictive substances are hair, blood, salvia, etc. Laboratory identification and quantification refers to confirmation tests and automated machines. Examples of confirmatory methods include gas chromatography with mass spectrometry, fluid chromatography with a high effectiveness and infrared spectrometry.

Conclusion: In clinical laboratories (thin layered) and gas chromatography are used as chromatography/mass spectrometry method which, in a series of tests, has shown high specificity, sensitivity, precision and accuracy.

Key words: fluid chromatography with a high effectiveness, gas chromatography with mass spectrometry, screening methods.

7. LITERATURA

1. Zečević D. i suradnici, Sudska medicina i deontologija. Zagreb,2004.
2. Ovisnost [Internet]
   Dostupno sa: http://www.unizd.hr/portals/27/pdf/letak_ovisnost.pdf
3. WHO, Expert Committee on Drug Dependece, Sixteenth Report, WHO Techn. Rep. Ser., N. 407, Geneva, 1969.
4. Schwebel R., Reći ne nije dovoljno: kako odgajati djecu da razborito odlučuju o drogama i alkoholu, prevoditelj: Edita Braje, Zagreb, 1995.
5. Sutlović D. Osnove forenzične toksikologije, Split, 2011.
6. Marchiotti I., Što bi liječnici školske medicine trebali znati o testiranju na ilegalne droge, Hrvatski časopis za javno zdravstvo, br. 28, 2011. Dostupno sa: http://www.izlog.info/tmp/hcjz/pr.php?id=13411
7. Udruga roditelja Zajednoca Susret, Ne-droga.org, Zagreb, 2014. Dostupno sa:http://www.ne-droga.org/o-drogama/amfetamin
8. Anoreksici [Internet]
   Dostupno sa: http://hr.wikipedia.org/wiki/Anoreksici#Efedrin
9. Depresanti [Internet]
   Dostupno sa: http://bs.wikipedia.org/wiki/Depresanti
10. Ovisnost o drogama [Internet]
    Dostupno sa: http://www.ssc.uniri.hr/psiholosko-savjetovaliste/savjeti/ovisnost-o-drogama
11. Frederick P. Smith, Ph.D., Handbook of forensic drug analysis
12. Lucija Božić, dr. med., časopis „*Vaše zdravlje*“.
    Dostupno sa: http://www.vasezdravlje.com/printable/izdanje/clanak/1021/
13. http://www.meditronik.hr/RapiScan.htm
14. Cannabis drug testing [Internet].
    Dostupno sa: http://en.wikipedia.org/wiki/Cannabis_drug_testing
15. Radović- Rajević G., Zovko E., Islamović S., Marjanović S., Kvalitativna analiza droge, Banja-Luka, 2010.
16. Hrvatska komora medicinskih biokemičara, Lijekovi i analitička toksikologija, 2011. Dostupno sa: http://ebookbrowsee.net/harmonizacija-toksi-revidirano-doc-d178706166

17. Salamunić Ilza,Laboratorijska dijagnostika autoimunih bolesti–nove tehnologije, stare nedoumice.BiochemiaMedica2010;20(1):45-56.
18. Mitrović D., Kriminalistički i krivično procesni aspekti dokaza i dokazivanja, 2013, str. 447-465
19. Lalić D.,Nazor M.,Narkomani: smrtopisi, Zagreb,1997.
20. Pelição FS,Peres MD,Pissinate JF,De Martinis BS, A One-Step Extraction Procedure for the Screening of Cocaine, Amphetamines and Cannabinoids in Postmortem Blood Samples, J Anal Toxicol.,2014.
21. Skender Lj., Karačić V., Određivanje kokaina i benzoilekgonina u urinu plinskom kromatografijom sa spektrometrom masa, Opatija, 1997.
22. Yong-Wha Lee, Simultaneous Screening of 177 Drugs of Abuse in Urine Using Ultra-performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in Drug-intoxicated Patients, Clin Psychopharmacol Neurosci. Dec 2013; 11(3): 158–164
23. Siniša Brlas, Terminološki opisni rječnik ovisnosti, 2011.

8. ŽIVOTOPIS

Anđa Primorac

24.11.1992., Metković

Broćanska b.b., Čitluk, Bosna i Hercegovina

OBRAZOVANJE

2011.-2014. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2007.-2011. Opća gimnazija fra Slavka Barbrića, Čitluk

1999.-2007. Osnovna škola fra Didaka Buntića, Čitluk

2001.-2007. Osnovna glazbena škola, Čitluk

2007.-2011. ženska klapa Brotnjo, Čitluk

Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Davorki Sutlović na ukazanom povjerenju i pruženoj pomoći tijekom izrade završnog rada.

Od srca zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i omogućenom školovanju na Sveučilištu u Splitu.