Usporedba preliminarnih i potvrdnih metoda određivanja sredstava ovisnosti

Ribičić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:176:171227

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

Sara Ribičić

USPOREDBA PRELIMINARNIH I POTVRDNIH METODA ODREĐIVANJA SREDSTAVA OVISNOSTI

Završni rad

Split, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Sara Ribičić

USPOREDBA PRELIMINARNIH I POTVRDNIH METODA ODREĐIVANJA SREDSTAVA OVISNOSTI

COMPARISON OF PRELIMINARY AND CONFIRMABLE METHODS OF DETERMINING MEANS OF ADDICTION

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

U Splitu, srpanj 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Sredstva ovisnosti 1

1.2. Psihoaktivne droge 1

1.2.1. Podjela psihoaktivnih droga 2

1.3. Nove psihoaktivne droge 3

1.3.1. Podjela novih psihoaktivnih droga 3

1.4. Svrha određivanja psihoaktivnih droga 4

2. METODE ODREĐIVANJA 5

2.1. Preliminarne metode 5

2.1.1. Imunokemijske metode 5

2.2. Potvrdne metode 6

2.2.1. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa, GC-MS 6

2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC 8

3. CILJ RADA 11

4. MATERIJALI I METODE 12

4.1. Ispitanici i uzorci 12

4.2. Metode prikupljanja i obrade podataka 12

5. REZULTATI 15

6. RASPRAVA 22

7. ZAKLJUČAK 24

8. LITERATURA 25

9. SAŽETAK 28

10. SUMMARY 29

11. ŽIVOTOPIS 30

1. UVOD

1.1. Sredstva ovisnosti

Sredstva ovisnosti i njihova zlouporaba predstavljaju jedan od najvećih problema današnjice. To su prirodne ili sintetičke tvari s psihoaktivnim djelovanjem, a zloupotrebljavaju se zbog stvaranja osjećaja ugode koje vodi k ponovljenom uzimanju, a u njih se ubrajaju droge, lijekovi, alkohol te duhan (1).

Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization,* WHO) definira sredstva ovisnosti kao bilo koju tvar, koja je u stanju, kada se nađe u živome organizmu, promijeniti jednu ili više njegovih funkcija te nakon ponovljene upotrebe dovesti do psihičke ili fizičke ovisnosti (2).

Vrlo važno je i razlikovanje pojma „ovisnosti“ te „navike“, odnosno pojmove fizičke i psihičke ovisnosti. Fizička ovisnost podrazumijeva stanje organizma kod kojeg se organizam priviknuo na određeni stimulans zbog njegova ponavljanog uzimanja, a izostankom stimulansa javljaju se simptomi ustezanja, odnosno apstinencijski sindrom karakterističan za svaku drogu. Nasuprot tome, psihička ovisnost ili navika je izuzetno jaka potreba za ponovnim uzimanjem droge kako bi se održao osjećaj dobroga psihičkog stanja. Također, veliki broj sredstava uzrokuje razvoj tolerancije, drugim riječima, pojavu kod koje je potrebno uzimati sve veće količine određenoga sredstva da bi se postigao isti učinak (1, 3).

1.2. Psihoaktivne droge

Psihoaktivne droge su kemijske tvari, izrazitog fiziološkog učinka, koje mijenjaju moždanu funkciju, što rezultira s privremenom ili pak dugotrajnom promjenom percepcije, raspoloženja, svijesti ili pak ponašanja (4).

Konzumacija psihoaktivnih droga nije novitet ni izmišljotina modernog društva, arheološki dokazi upućuju na uporabu najčešće biljaka za žvakanje unazad desetak tisuća godina, dok povijesni dokazi kulturološke uporabe psihoaktivnih tvari datiraju unazad pet tisuća godina. Povijesno gledano, psihoaktivne tvari su koristili svećenici prilikom

vjerskih obreda kao ritualno piće iscjeljenja (npr. Amantia muscaria), iscjelitelji u medicinske svrhe (npr. Opijum) ili pak ljudi u svakodnevnoj, rekreativnoj upotrebi (5). Uporaba psihoaktivnih tvari u povijesti u odnosu na danas nije se pak značajno promijenila. Od davnina, jednako se koriste u medicinske svrhe, kao i za religijske obrede te su tako primjerice opijati dobiveni iz mliječnoga soka nedozrelih glavica biljke bijeloga maka (Papaverum somniferum) korišteni u Mezopotamiji prije gotovo sedam tisuća godina, a danas se koriste u gotovo svim bolničkim ustanovama u obliku morfina za analgeziju (6).

Sjedinjenje s većinom i prihvaćanje normi određene kulture nije ništa neobično, novo i nepoznato. Na Dalekom istoku opijum je bio sredstvo društvenog kontakta i lijek tisućama godina. Sličnu ulogu imao je na Bliskom istoku hašiš, u Americi marihuana, Indiji konoplja, u Africi kif. Kokain je karakteristika kultura vezanih za kulturu Inka u Srednjoj Americi (7).

Velik problem je nastao kad je došlo do civilizacijskih pokreta odnosno miješanja kultura, prenošenja opojnih sredstava na područja u kojim ne postoji tradicija njihove uporabe u određenoj kulturi, pa nisu uspostavljeni društveni mehanizmi zaštite od neželjenih učinaka. Stoga je pojava narkotika svih vrsta, domaćih i stranih, danas vrlo raširena na našim prostorima i zahtijeva suočavanje s tom epidemijom (6).

1.2.1. Podjela psihoaktivnih droga

Psihoaktivne ili opojne droge mogu se podijeliti s obzirom na mehanizam djelovanja, to jest način aktivacije mezolimbičnog dopaminergičnog sustava, s obzirom na učinak te s obzirom na podrijetlo (8). S obzirom na učinak, većinu opojnih droga možemo svrstati u jednu od skupina: opijati, sedativi, psihostimulansi, halucinogeni te hipnotici. S obzirom na podrijetlo, opojna droga može biti prirodnog, to jest organskog podrijetla, polusintetska – nastala laboratorijskom modifikacijom tvari organskoga porijekla te sintetska droga – u potpunosti nastala procesom sinteze u laboratoriju, najčešće iz organskih prekursora (9).

1.3. Nove psihoaktivne droge

Nove psihoaktivne droge (*engl. Novel/New Psychoactive Substances,* NPS) poznate pod nazivom dizajnerske droge (*engl. legal highs, herbal highs, research chemicals, bath salts*) su analozi ili kemijski derivati kontroliranih droga, dizajnirane da iskažu učinke slične kontroliranima, ali s namjerom izbjegavanja međunarodne zakonske politike (10). Mnoge NPS nastale su primjenom dostupne literature koju je javnosti pružila i farmaceutska industrija, ali i znanstvena zajednica. S obzirom na narav NPS, one se tržišno distribuiraju putem Interneta te u takozvanim „smart-shop“ trgovinama, trgovinama koje prodaju opremu za konzumaciju duhana i kanabisa (11).

U Republici Hrvatskoj lista ilegalnih droga oglašena je u Narodnim novinama pod nazivom «Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga», donesena temeljem Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (12).

1.3.1. Podjela novih psihoaktivnih droga

Najveći broj novih psihoaktivnih tvari prijavljenih Europskom centru za praćenje droga i ovisnosti o drogama svrstan je u pet skupina, s obzirom na tvari po čijem su uzoru i nastale: (13)

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

1.4. Svrha određivanja psihoaktivnih droga

U posljednje vrijeme sve više ljudi, posebice mlađa populacija, eksperimentira s rekreativnim uzimanjem droga. Upravo zbog takvoga porasta, iznimno je važno naglašavati potrebe testiranja bioloških uzoraka kako bi se otkrilo koji spojevi i tvari su konzumirane.

Veliku problematiku u otkrivanju i određivanju psihoaktivnih tvari, predstavlja neprestana pojava novih spojeva i tvari čime su proizvođači i njihovi kupci uvijek korak ispred Zakona. Rast tržišta psihoaktivnih tvari omogućen je povećanom povezanošću svijeta, putem Interneta te općenito globalizacijom.

Uvođenje generičkih lista, program na kojem radi Europska komisija i centar za droge, uvelike bi pomoglo u pogledu zakonske regulative i kontrole te u procjeni rizika štete koju mogu uzrokovati psihoaktivne tvari (14).

2. METODE ODREĐIVANJA

Izbor analitičke tehnike ovisi o: broju uzoraka koje je potrebno analizirati, potrebi za osjetljivošću i pouzdanošću, raspoloživom kadru te instrumentima, vremenu u kojem se rezultat treba i dobiti, ali i o troškovima. Također, bitna stavka pri odabiru metode jest činjenica radi li se o općem probiranju ili ciljanoj analizi te kvalitativnoj ili kvantitativnoj analizi.

Preporučeni analitički protok za otkrivanje psihoaktivnih tvari u biološkim uzorcima sastoji se od 1) osjetljive tehnike probira koja razlikuje negativne od vjerojatno pozitivnih uzoraka koji podliježu daljnjoj analizi i 2) visoko specifične tehnike za potvrđivanje vjerojatno pozitivnih uzoraka (15).

Danas se u većini laboratorija za analizu psihoaktivnih tvari u biološkim uzorcima rabe imunokemijske tehnike kao metode probira (*engl. Screening*), a za potvrđivanje razne kromatografske tehnike.

2.1. Preliminarne metode

Svrha izvođenja preliminarnih metoda i analiza jest utvrditi nalazi li se u ispitivanom uzorku droga i kojoj skupini ista pripada. Važno je pritom naglasiti da se ovim metodama analize ne može potvrditi postojanje droga, već samo mogućnost je li određena vrsta droge prisutna u uzorku ili ne (1).

2.1.1. Imunokemijske metode

Početno probiranje na sredstva ovisnosti provodi se imunokemijskim metodama od kojih su među najzastupljenijima radioimunokemijska (RAI), enzimsko-imunokemijska (EIA, ELISA) te fluorescentno-polarizacijska (FPIA).

Princip ovih metoda jest interakcija između molekula antigena i antitijela, a sama podjela metoda zasniva se na načinu obilježavanja antigena.

Prednost imunokemijskih tehnika jest visok stupanj osjetljivosti, reproducibilnosti te jednostavnosti, mogućnost automatizacije i analize velikog broja uzoraka u

ograničenom vremenu, potrebni su minimalni zahtjevi za osobljem i kemikalijama, a standardi se nabavljaju zajedno sa strojevima te se koriste isključivo upute proizvođača.

Unatoč zadovoljavajućoj osjetljivosti, tehnike imaju nedovoljnu specifičnost; antitijela reagiraju križno sa srodnim drogama i specifična su za obitelj kemijski sličnih tvari, ali ne i za pojedinu drogu. Kvalitativne pretrage za ispitivanje zlouporabe sredstava ovisnosti u mokraći zahtijevaju graničnu vrijednost (engl. *cut-off*) koja će razlikovati pozitivne od negativnih rezultata. Rezultati ispod granične vrijednosti interpretiraju se kao negativni, a iznad kao pozitivni. Veća granična vrijednost povećava dijagnostičku specifičnost, ali smanjuje osjetljivost te obrnuto. Rutinsko kvalitativno probiranje na sredstva ovisnosti u kliničkoj praksi uključuje amfetamine, kokain (i metabolite), kanabinoide, metadon, opijate, benzodiazepine i barbiturate. Analiziraju se skupine, a ne pojedinačne droge, odnosno njihovi metaboliti. Upravo zbog toga je nužno pozitivni rezultat dobiven imunokemijskom metodom potvrditi, odnosno identificirati pojedinačne metabolite potvrdnim tehnikama (16, 17).

2.2. Potvrdne metode

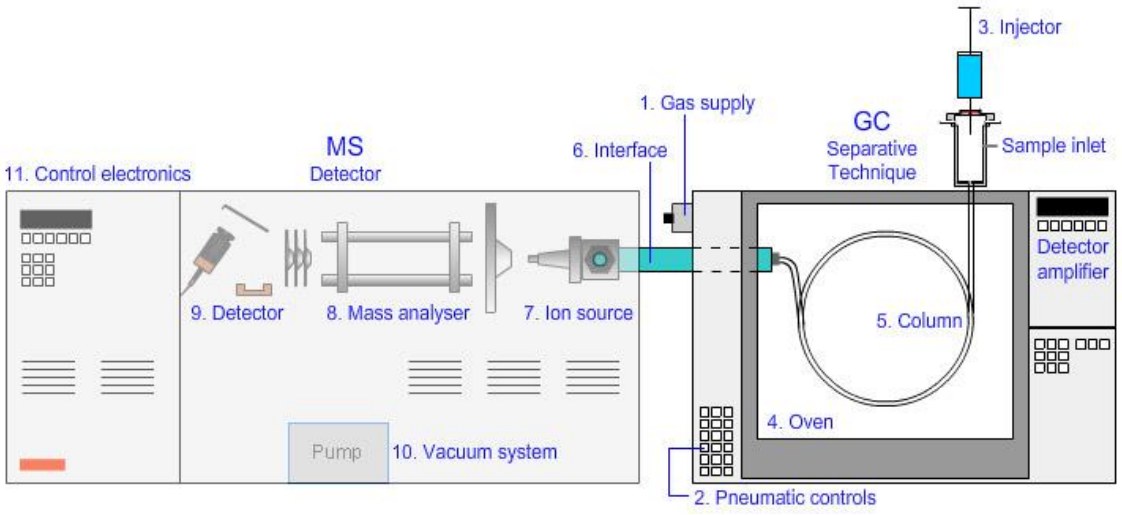
Potvrdne metode odnose se na primjenu instrumentalnih metoda, bilo kvalitativnih ili kvantitativnih. Razvijeno je niz metoda za identifikaciju različitih sredstava ovisnosti, od kojih su među najrasprostranjenijima kromatografske tehnike poput metode plinske i tekućinske kromatografije sa spektrometrom masa te tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (1). Kromatografske metode predstavljaju analitičke tehnike kojima se omogućuje odjeljivanje, identifikacija i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u kompleksnim maticama uzoraka (18).

2.2.1. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa, GC-MS

Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *Gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS*) predstavlja „zlatni standard“ kvalitativne i kvantitativne forenzične i kliničke analize medicinskih pripravaka, sredstava ovisnosti i bioloških uzoraka. Predstavlja analitičku metodu u kojoj se objedinjuju značajke plinske

kromatografija koja je pogodna za odjeljivanje smjesa te kvantifikaciju sastojaka te spektrometra masa koji se koristi za kvalitativnu analizu i individualnu identifikaciju pojedinačnih sastojaka.

Sprega kromatografskih i spektrometrijskih tehnika povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost te na taj način omogućava najučinkovitije razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih i poluhlapljivih tvari u biološkim uzorcima (19).



Slika 1. Prikaz uređaja GC-MS (plinski kromatograf sa spektometrom masa) (20)

Karakteristični podaci dobiveni plinskom kromatografijom su vrijeme zadržavanja, (značajno za identifikaciju sastojka) i površina ispod pika (proporcionalna količini sastojka), a spektrometrom masa dobiva se spektar masa jedinstven za svaku tvar (prikazuje relativnu zastupljenost nastalih fragmenata u ispitivanom spoju) pa se često naziva i „otiskom prsta“ za kemijske spojeve.

Uzorak za plinsku kromatografiju prevodi se u paru te se u tom obliku injektira na početak kolone kroz koju putuje nošen plinom nosiocem (helij, dušik, argon, ugljični dioksid) koji mora biti kemijski inertan kako ne bi interferirao s uzorkom. Uzorak se potom razdvaja na komponente koje kolonom putuju različitom brzinom te naposljetku

dolaze do detektora (21). Detekcija analita iz uzorka na kromatografu očitava se kao pik odnosno vršak (*engl. Peak)* na grafičkom prikazu detekcije u određenom retencijskom vremenu odnosno vremenu zadržavanja u kromatogramu. Površina ispod pika proporcionalna je količini analita u uzorku. Podaci prikupljeni navedenom metodom uspoređuju se sa standardima i podacima iz knjižnica spektara masa (*engl. Mass spectral libraries)* čime se potvrđuje odnosno isključuje prisutnost određene tvari u uzorku.

Prednosti GC-MS metode su visoka osjetljivost, preciznost, pouzdanost, selektivnost i male količine uzoraka potrebnih za analizu te također bogate biblioteke spektara koje olakšavaju identifikaciju nepoznatog analita u području forenzične toksikologija (22). S druge pak strane, veliki nedostatak predstavlja visoka temperatura injektora zbog čega se termički labilne tvari mogu razgraditi prilikom prolaska kroz kolonu plinskog kromatografa pa se ovom metodom analiziraju samo termostabilni spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C. Hlapljivost i termostabilnost komponenti uzorka može se povećati postupkom kemijske derivatizacije. Osim spomenutog, nedostatak metode predstavlja dugotrajan i skup postupak pripreme, posebice pri kvantitativnim analizama (23).

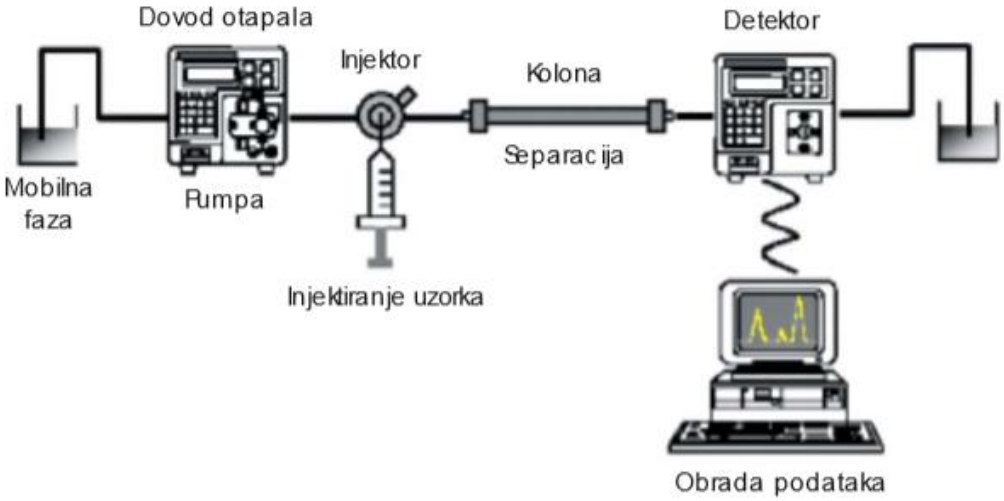
2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC

HPLC (*engl. High-performance liquid chromatography*) je oblik kromatografije na stupcu koji se često koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Svoju popularnost zahvaljuje dobroj separaciji različitih vrsta uzoraka, iznimnoj razdjelnoj snazi, brzini te vrlo niskom pragu detekcije koji se mjeri u nanomolima.

Otopina uzorka se injektira u mobilnu fazu i potom putuje kroz kolonu, punjenu stacionarnom fazom, pod visokim pritiskom. Interakcija uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuje brzinu eluiranja i separaciju molekula u uzorku, pa se komponente eluiraju sa kolone različitom brzinom. Eluat protječe kroz neki od detektora koji daje odziv. Učinkovitost separacije molekula ovisna je o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, kao i o brzini protoka mobilne faze kroz kolonu (24).

Tekućinska kromatografija predstavlja metodu odjeljivanja u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3-10 μm) noseći uzorak za analizu. Molekule uzorka putuju tako niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze. Može se podijeliti na: a) adsorpcijsku kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza adsorbensi b) razdjelnu kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza kapljevina nanesena na čvrsti inertni nosač.

HPLC metoda koristi se tekućom mobilnom fazom koja djeluje kao nosač za tekući uzorak. Injektirani uzorak prolazi kroz stacionarnu fazu uz povišeni tlak koji dodatno povećava efikasnost odvajanja. Uzorak se unosi u tok mobilne faze te dolazi do razdvajanja smjese na sastavne komponente koji se zadržavaju u koloni i na temelju vremena zadržavanja (vremena potrebnog da pojedina komponenta prođe kroz kolonu) identificira se pojedina komponenta. Vrijeme zadržavanja (*retention time*, Rt) ovisi o prirodi komponente koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze.



Slika 2. HPLC sustav čine spremnik mobilne faze (otapala), crpka, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor i računalo.

Rezultat provedene HPLC analize predstavlja kromatogram, niz simetričnih eluacijskih krivulja odnosno pikova koji nastaju nakon prolaska analita kroz kolonu i detektor. Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora, koncentracije analita u eluatu ili druge veličine koja se koristi kao mjera koncentracije eluata prema volumenu eluata ili vremenu (25).

3. CILJ RADA

Ciljevi ovoga rada su opisati i usporediti preliminarne i potvrdne metode analiziranja sredstava ovisnosti iz uzorka mokraće.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici i uzorci

U ovom radu korišteni su rezultati uzoraka nepoznatih pacijenata koji su prethodno metodama probira i potvrde dali pozitivan rezultat na prisutstvo sredstava ovisnosti iz NPS skupine. Pohranjeni su u prikladne spremnike te čuvani u hladnjaku na +4˚C do analize.

4.2. Metode prikupljanja i obrade podataka

Uzorci su ponajprije obrađeni početnim probiranjem na sredstva ovisnosti koje se provodi imunokemijskim metodama, u ovom slučaju EIA metodom koja kvalitativno obrađuje uzorak. Ekstrakti su nadalje analizirani i potvrđeni korištenjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa.

4.2.1. Enzimsko-imunokemijska metoda, EIA

Uzorci su obrađeni na uređaju Abbott, Architect ci8200. Uređaj radi na principu homogenog enzimskog imunološkog testa u kojem se koriste tekući reagensi spremni za uporabu. Koriste se poliklonska antitijela kojima se može dokazati većina spojeva i njihovih metabolita u urinu. Lijek obilježen enzimom i lijek iz urina natječu se za točno određen broj specifičnih veznih mjesta za antitijela. U odsutnosti lijeka u uzorku, specifično antitijelo veže se za lijek obilježen glukoza-6-fosfat dehidrogenazom (G6PDH) te se inhibira aktivnost enzima. Zbog ovog je fenomena koncentracija lijeka u urinu proporcionalna enzimskoj aktivnosti (26, 27).

Tablica 1. Prikaz pretraga, metoda, uzoraka te *cut-off* vrijednosti za početno probiranje na sredstva ovisnosti

Pretraga/analit	**Preporučena metoda i/ili postupak**	**Uzorak**	**Jedinica**	**Negativan rezultat**
Amfetamini/metamfetamini	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<1000
Kanabinoidi	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<50
Kokain (metaboliti)	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<300
Metadon	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<200
Opijati	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<300
Benzodiazepini	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<200
Barbiturati	EIA, FPIA, EMIT, ELISA	slučajni uzorak mokraće	µg/L	<200

4.2.2. Instrumentalna analiza GC-MS metodom

Uzorci su analizirani korištenjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010 (slika 6). Korištena je kapilarna kolona plinskog kromatografa Restek, RTx-5MS, dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25 µm. Ukupan rad instrumenta i obrada podataka kontrolirani su GCMS Solution računalnim programom.

Kromatografska analiza pripremljenih uzoraka izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (engl. Total Ion Chromatogram, TIC) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (engl. Single ion monitoring, SIM). Optimiran je temperaturni program.

Optimalni radni uvjeti:

- volumen injektiranja: 1 µL (splitless)
- temperatura injektora 250 °C
- protok plina nosioca 1,0 mL/min

- ukupno trajanje temperaturnog programa iznosi 20 minuta:

I 100 °C izotermno 0,5 min

II 5 °C /min do 220 °C

III 275 °C izotermno 5 min



Slika 3. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa; Shimadzu GCMS-QP2010

5. REZULTATI

Rezultati pribavljeni analizom bioloških uzoraka GC-MS metodom prikazani su tablicom i grafički.

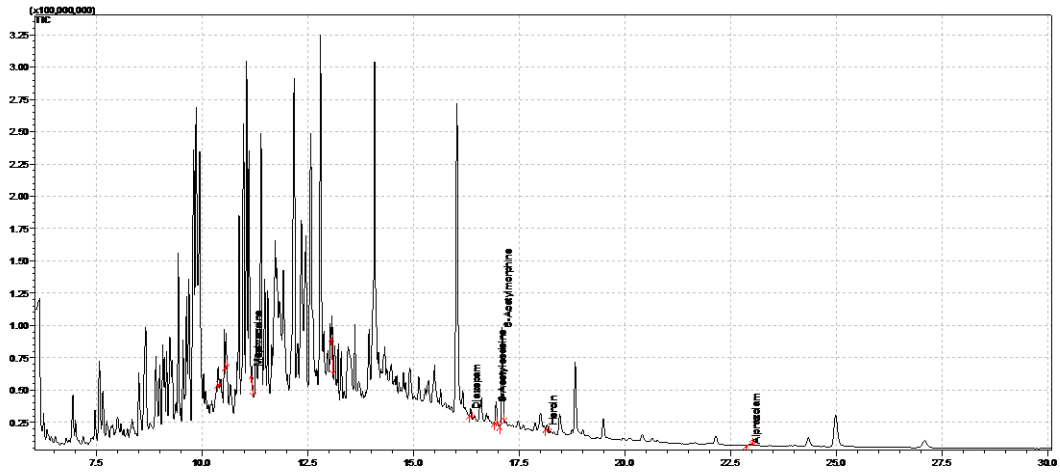
U Tablici 2. su prikazani redni brojevi uzoraka te supstance koje su nađene nakon analize u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split te u laboratoriju za kemijsko-toksikološke analize, Kliničkog odjela za sudsku medicinu, Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

Tablica 2. Prikaz rezultata analiziranih 7 uzoraka urina dobivenih metodom probira imunokemijskom metodom EIA i potvrde primjenom GC-MS metode

Red. br. uzorka	**Probir imunokemijska metoda EIA**	**Potvrda GC-MS analiza**
1	Amfetamini	Fenobarbiton; kokain; risperidone
2	Opijati	4-fluorometamfetamin; morfin; nordazepam; 6-acetil kodein; 6-acetil morfin; heroin; alprazolam
3	amfetamini	MDA; MDMA; paracetamol; JWH-122; fenobarbital; dimetil piperazin
4	kanabinoidi	1-2-fluoro benzil-4-propil piperazin
5	Kokain; kanabinoidi	Amantadin; 2,4-dimetoksi amfetamin; pentobarbital; kokain; matamizol; kokaetilen
6	amfetamini	Klorazepam; diazepam
7	amfetamini	Pentobarbital; MDA; MDMA; Metilon; pseudoefedrin; p-fluorokatinon

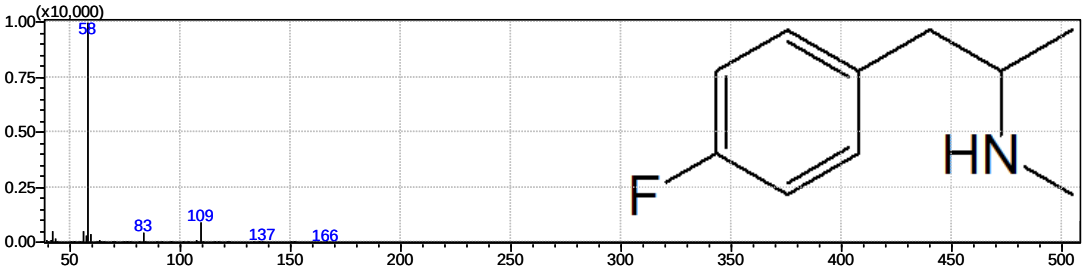
Rezultati analize bioloških uzoraka ispitanika pod rednim brojem 2 i 7 te njihovi karakteristični spektri masa prikazani su i grafički na slikama 3. i 11.

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

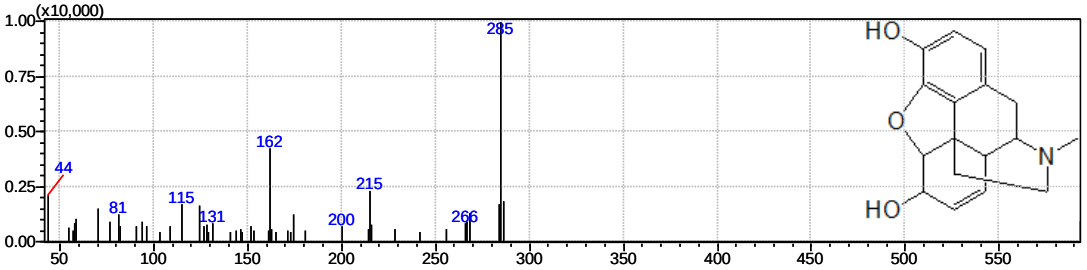


Slika 3. Kromatogram ekstrahiranog biološkog uzorka urina analiziranog GC-MS metodom (br. 2 – Tablica 2.)

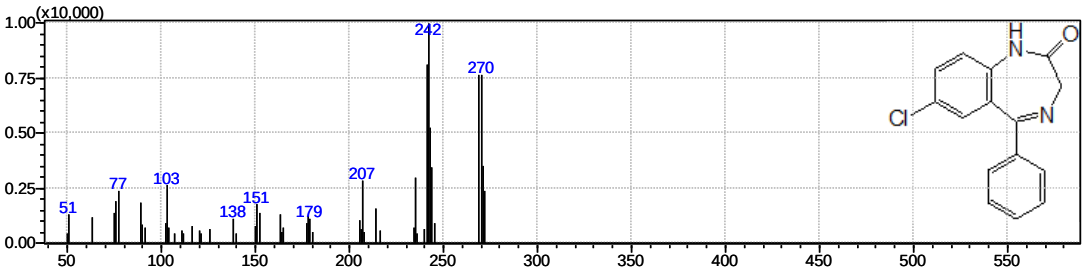
Karakteristični spektri masa tvari dokazanih u ispitivanim uzorcima prikazani su na slikama 4. do 10. te 12. do 17. grafički. Na apscisi se prikazuje omjer mase i naboja (m/z) molekulskih fragmenata pristiglih na detektor, a na ordinati odaziv detektora, odnosno intenzitet signala. Vrijednosti m/z prikazuju se redom od mase manje prema većoj.



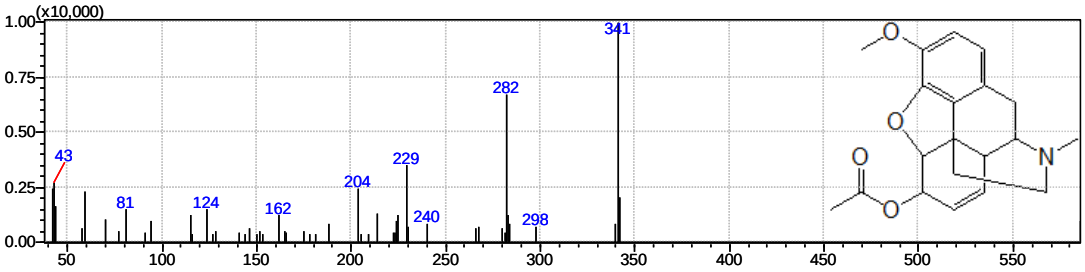
Slika 4. Karakterističan spektar masa za 4-fluoroamfetamin.



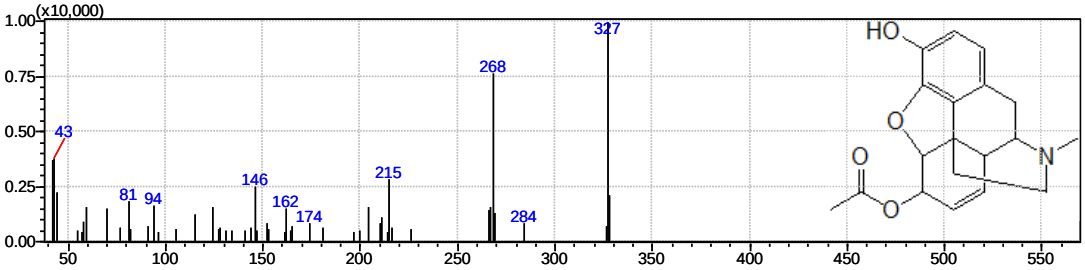
Slika 5. Karakterističan spektar masa za Morfin.



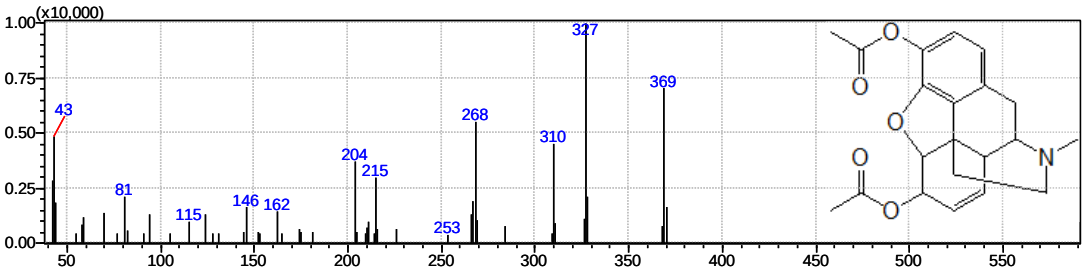
Slika 6. Karakterističan spektar masa za Nordazepam.



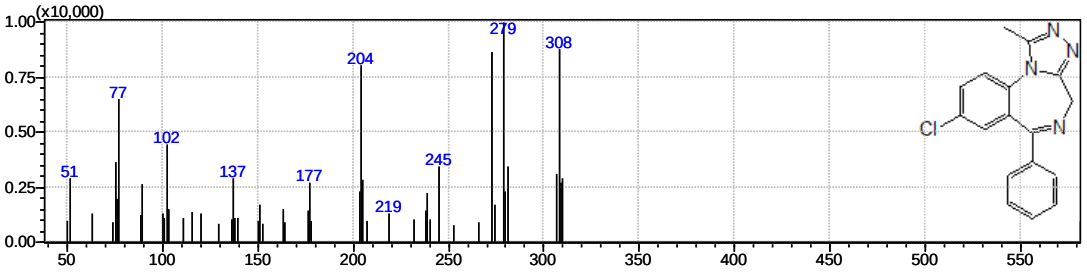
Slika 7. Karakterističan spektar masa za 6-acetilkodein.



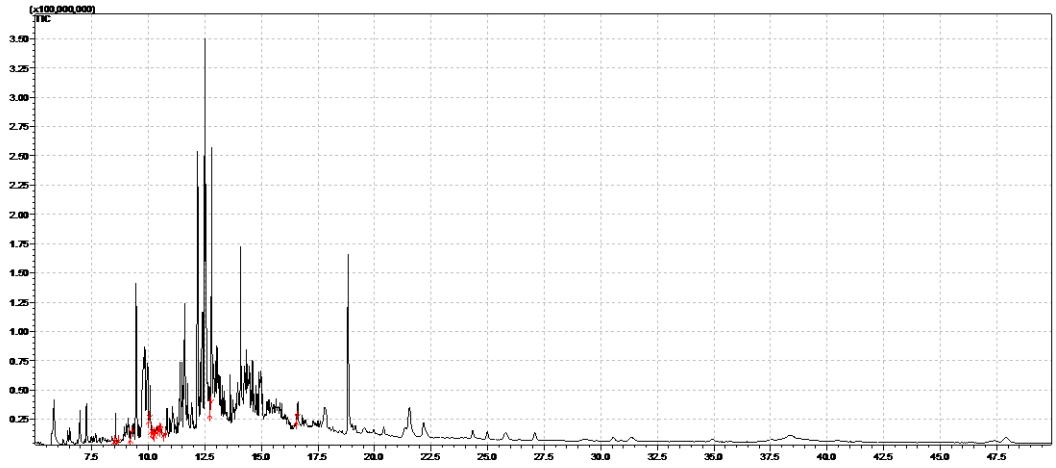
Slika 8. Karakterističan spektar masa za 6-acetilmorfin.



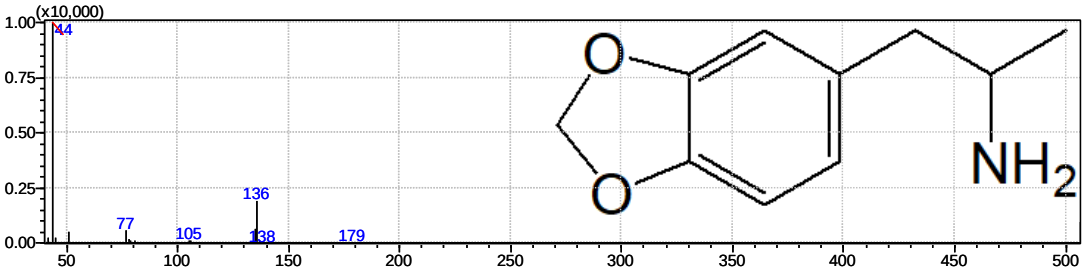
Slika 9. Karakterističan spektar masa za Heroin.



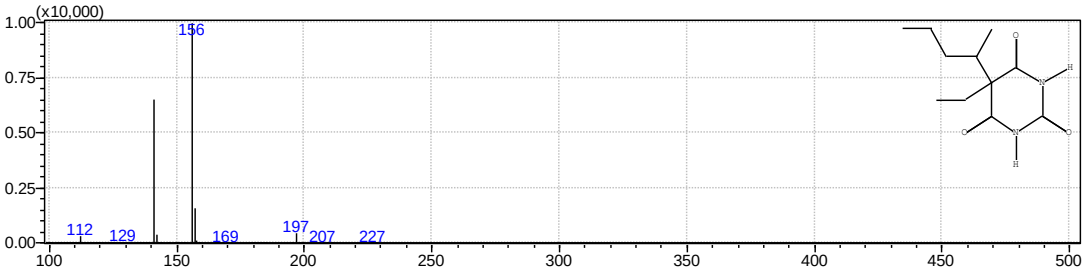
Slika 10. Karakterističan spektar masa za Alprazolam.



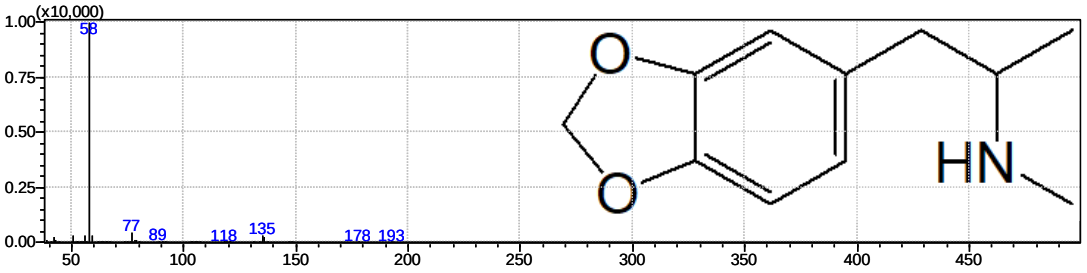
Slika 11. Kromatogram ekstrahiranog biološkog uzorka urina analiziranog GC-MS metodom (br. 7 – Tablica 2.)



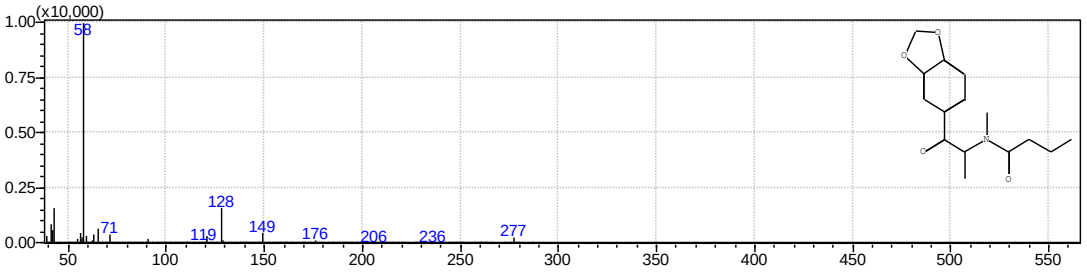
Slika 12. Karakterističan spektar masa za MDA.



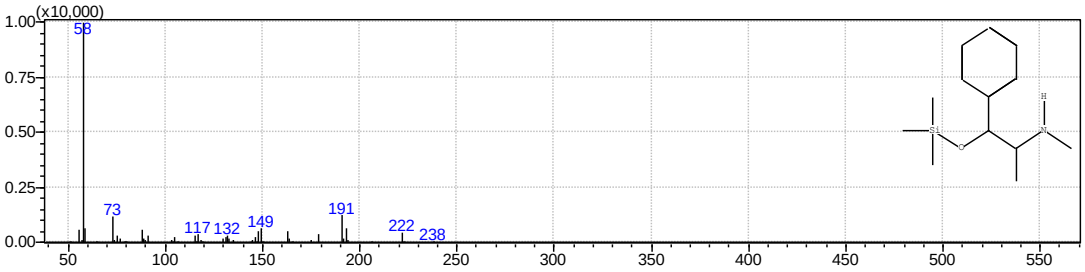
Slika 13. Karakterističan spektar masa za Fentobarbital.



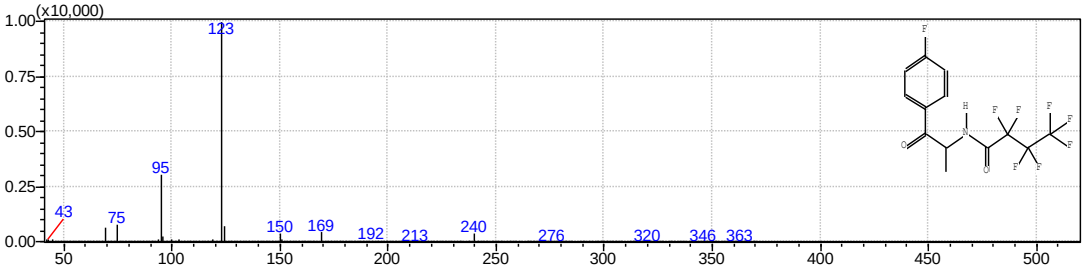
Slika 14. Karakterističan spektar masa za MDMA.



Slika 15. Karakterističan spektar masa za Methilon.



Slika 16. Karakterističan spektar masa za Pseudoefedrin.



Slika 17. Karakterističan spektar masa za p-Fluorokatinon.

6. RASPRAVA

Usporedbom dobivenih rezultata za 7 ispitivanih uzoraka urina (Tablica 2.) uočeno je da svi rezultati dobiveni primijenjenom metodom probira nisu potvrđeni potvrdnom GC-MS metodom.

U uzorcima br. 1, 3, 6 i 7 preliminarnom metodom EIA dokazana je prisutnost funkcionalne skupine amfetamina, dok je GC-MS metodom potvrđena prisutnost spojeva amfetamina samo u uzorcima br. 3 i 7. U svim uzorcima u kojima su metodom probira pronađeni amfetamini, GC-MS metodom je utvrđeno postojanje i drugih spojeva što jasno daje do znanja da imunokemijska metoda probira nije dovoljno selektivna te također nije pogodna za otkrivanje novih psihoaktivnih droga (NPS).

Nadalje, u uzorku br. 2 metodom probira utvrđena je prisutnost tvari iz skupine opijata što je GC-MS metodom potvrđeno. Dokazana je prisutnost raznih analita koji spadaju u tu skupinu, kao što su: 6-acetil kodein te 6-acetil morfin. Pronađena je prisutnost i drugih tvari koji spadaju u skupinu amfetamina.

Preliminarnom imunokemijskom metodom u uzorcima br. 4 i 5 pronađena je prisutnost skupine kanabinoida te kokaina, no GC-MS metodom potvrde samo je u uzorku br. 5 isto potvrđeno, a pronađene su i drugi tvari iz skupine amfetamina.

Metode probira služe za brzu provjeru nalazi li se u ispitivanom uzorku droga i kojoj skupini pripada, a potvrdne metode identificiraju pojedinačne tvari i njihove metabolite. Iz Tablice 2. jasno je vidljivo da metode potvrde GC-MS metodom nisu u svim uzorcima potvrdile nađenu skupinu droga dobivenu probirom imunokemijskom metodom EIA.

Usporedbom analiziranih rezultata, dobivenih određivanjem sredstava ovisnosti preliminarnim i potvrdnim metodama utvrđena su odstupanja od literatura. Baker DP et al. (1995) u svom su istraživanju na temelju uzoraka urina nasumično odabranih pacijenata određivali skupinu amfetamina koja je u 97% uzoraka uspješno analizirana imunokemijskom metodom, dok je u samo 55% potvrđena i GC-MS metodom (28). Također, u svom radu Donald L. Frederick i Judy Green (1985) uspoređivali su metode

određivanja kanabinoida te su u svim uzorcima GC-MS metodom potvrdili pronađene skupine tvari koje su dokazane imunokemijskom metodom EIA (29).

Nadalje, u svom su istraživanju Ray H Liu et al. (2006) uspoređivali imunokemijsku metodu i GC-MS metodu određivanja raznih skupina psihoaktivnih tvari. Za razliku od našeg istraživanja koje metodom potvrde nije potvrdilo prisutnost kanabinoida detektirano metodom probira, Ray H Liu et al. u svom su istraživanju dokazali da je metoda probira dovoljno specifična i osjetljiva te su isto potvrdili GC-MS metodom koja je pronašla odgovarajuće metabolite te funkcionalne skupine (30). U svim ostalim skupinama psihoaktivnih tvari što podrazumijeva amfetamine, opijate te kokaine, dokazali su isto što je i naše istraživanje pokazalo. Imunokemijske metode zahtijevaju granične vrijednosti koje će razlikovati pozitivne od negativnih rezultata, no isto tako postoji mogućnost križne reakcije koja može dati lažno pozitivne, odnosno negativne rezultate. Upravo zbog toga nužno je imati metodu potvrde kao što je GC-MS koja će razlučiti pozitivne od negativnih rezultata te dati pouzdane informacije o pojedinačnim metabolitima funkcionalnih skupina ispitivanih tvari.

Stalna pojava psihoaktivnih tvari svakako postaje sve veći zdravstveni, ali i opće društveni problem. Tvari se proizvode u laboratorijima diljem svijeta, a dok se jedna zabrani, druga se već pojavi. Tako popis novih psihoaktivnih tvari postaje svakim danom sve veći.

Analitička toksikologija strogo propisuje obvezu potvrđivanja pozitivnog nalaza, ali isto tako je moguće isključiti nejasno negativan rezultat. Metode potvrde trebaju imati bolju specifičnost i barem istu osjetljivost, a u kliničkim se laboratorijima uspješno provode tankoslojna i plinska kromatografija.

„Zlatni standard“ pak predstavlja instrumentalna analiza plinskog kromatografa sa spektrometrom masa. GC-MS metoda za razliku od drugih metoda koje detektiraju prisutnost odnosno odsutnost ispitivane tvari, omogućava separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju analita. Treba napomenuti da je za optimizaciju metode kvalitativne analize novih psihoaktivnih tvari i neophodno neprekidno nadopunjavanje knjižnica spektara masa (engl. *mass spectral libraries*) što nerijetko ne sustiže brzinu pristizanja novih psihoaktivnih tvari na tržište droga.

7. ZAKLJUČAK

1. Usporedbom rezultata dobivenih analizom uzoraka urina primjenom preliminarne metode i potvrdne metode određivanja sredstava ovisnosti nije dokazano dobro slaganje.
2. Zbog standardiziranosti metode i jednostavnosti uzorkovanja najčešće korišteni biološki uzorak za određivanje sredstava ovisnosti jest urin.
3. Početno probiranje na sredstva ovisnosti provodi se imunokemijskim metodama koje imaju zadovoljavajuću osjetljivost, no često nedovoljnu specifičnost.
4. Zlatni standard i preporučena metoda potvrde je plinska kromatografija sa spektrometrom masa zbog svoje točnosti, osjetljivosti i preciznosti.

8. LITERATURA

1. Sutlović D. i suradnici, 2011. Osnove forenzičke toksikologije, 59, 303-18
2. WHO, Lexicon of alcohol and drug terms, Geneva, 1994. Dostupno na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39461/1/9241544686_eng.pdf
3. Katzung BG., 2011. Temeljna klinička farmakologija, Opojne droge, 553.
4. Psihoaktivne droge, definicija [Internet]. Dostupno na: https://hr.wikipedia.org/wiki/Psihoaktivne_droge
5. Dostupno na: https://www.livescience.com/49666-prehistoric-humans-psychoactive-drugs.html
6. Marc-Antoine Crocq, (2007 Dec), Historical and cultural aspects of man's relationship with addictive drugs, Dialogues Clin Neurosci. 9(4): 355–361. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202501/
7. Stephen Nkansah-Amankraa and Mark Minellib, (2016 Dec), "Gateway hypothesis" and early drug use: Additional findings from tracking a population-based sample of adolescents to adulthood, Published online 2016 May 28. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929049/
8. Dostupno na: http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45276
9. Manchester KR, Lomas EC, The emergence of new psychoactive substance (NPS), 2018 Jan;10, Drug Test Anal.
10. J. Mihaljević, Ovisnost o drogi i alkoholu - bolest, liječenje, prevencija, str. 8-9.
11. Sutlović D. Sredstva ovisnosti. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzičke toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 59.-102.
12. United Nations Office on Drugs and Crime: The challengee of new Psychoactive substances; a Report from the Global SMART Programme, 2013.
13. Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga. Narodne novine, br. 10/2016. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016_01_10_258.html
14. Dostupno na: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/emcdda_en ž

15. Cristina Miliano, 2016 Apr 19, Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): Focus on the Rewarding and Reinforcing Properties of Cannabimimetics and Amphetamine-Like Stimulants. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835722/
16. United Nations (UN). International Drug Control Programme. Recommended methods for the determination and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivates. New York: UN, 1995.
17. Darwish IA, (2006 Sep), Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances.
18. Assay Guidance Manual [Internet]. Karen L. Cox, BS, Viswanath Devanarayan, PhD, Aidas Kriauciunas, Joseph Manetta, BS, Chahrzad Montrose, PhD, and Sitta Sittampalam, PhD, Immunoassay Methods, Published May 1, 2012; Last Update: December 24, 2014.
19. Ashish Chauhan1*, Manish Kumar Goyal and Priyanka Chauhan, GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology, Published date: November 17, 2014, Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques
20. Dostupno na: https://www.chromacademy.com/Electron_Ionization_for_GC-MS_Essential_Guide.html
21. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. In: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; 1999. p. 645–74.
22. Elena Stashenko, Jairo René Martínez, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, 2014.
23. Kaluzna-Czaplinska J. Current medical research with the application od coupled techniques with mass spectrometry. Med Sci Monit. 2011;17(5):RA117-23.
24. Riha B. Potvrdna analitička metoda, plinska kromatografija - spektrometrija masa. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 394–5.
25. O. H. Drummer, Post-mortem toxicology, *Forensic Sci.Int.*, 2007.,165(2-3), 199-203.
26. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, H.F. (1999) Osnove analitičke kemije, prvo izd. (preveli Kujundţić, N., Ţivčić-Alegratti, V., Ţivković, A.) Školska knjiga, Zagreb

27. Dostupno na: https://www.corelaboratory.abbott/int/en/home
28. Baker DP1, Murphy MS, Shepp PF, Royo VR, Caldarone ME, Escoto B, Salamone SJ. Evaluation of the Abuscreen ONLINE assay for amphetamines on the Hitachi 737: comparison with EMIT and GC/MS methods. 1995 Jan, J Forensic Sci.
29. Donald L. Frederick* and Judy Green, Comparison of Six Cannabinoid Metabolite Assays, May/June 1985, Journal of Analytical Toxicology.
30. Ray H Liu et al. Correlation of Drug-Testing Results - Immunoassay versus Gas Chromatography-Mass Spectrometry, January 2006, Forensic Science

9. SAŽETAK

Uvod: Sredstava ovisnosti, droge prirodne su ili sintetične tvari s psihoaktivnim djelovanjem koje se zloupotrebljavaju zbog osjećaja ugode što vodi ka ponovljenom uzimanju koje u jednom trenutku može izmaknuti kontroli. Veliku problematiku u otkrivanju i određivanju psihoaktivnih tvari, predstavlja neprestana pojava novih spojeva i tvari. Danas se u većini laboratorija za analizu psihoaktivnih tvari u biološkim uzorcima rabe imunokemijske tehnike kao metode probira (*engl. Screening*), a za potvrđivanje razne kromatografske tehnike.

Cilj: Cilj ovog rada je opisati i usporediti preliminarne i potvrdne metode za određivanje sredstava ovisnosti u biološkom uzorku urina.

Materijali i metode: Materijali korišteni i priloženi u ovome radu su uzorci urina koji su dio arhive Centralnog laboratorija KBC-a Split te Laboratoriju za kemijsko-toksikološke analize, Kliničkog odjela za sudsku medicinu, Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Korištena tehnika početnog probiranja jest imunokemijska metoda, najčešće obilježena enzimom koja zbog svoje nedovoljne specifičnosti zahtijeva potvrdu. Kao zlatni standard primjenjena je metoda plinskog kromatografa sa spektrometrom masa koja potvrđuje pozitivan nalaz te isključuje negativan.

Zaključak: Usporedbom rezultata metode probira i metode potvrde uočena su odstupanja. Uzorak izbora za analizu na sredstva ovisnosti je mokraća. Analitička metoda izbora, ujedno i zlatni standard jest plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom.

Ključne riječi: sredstva ovisnosti, urin, imunokemijske metode, GC-MS

10. SUMMARY

Introduction: Means of addiction, drugs are natural or synthetic substances with psychoactive effects that are being abused due to a sense of pleasure leading to the repeated taking which at one time can get out of control. A major issue in detecting and determining psychoactive substances is the constant occurrence of new compounds and substances. Today, most of the laboratories for the analysis of psychoactive substances in biological samples use immunochemical techniques as screening methods, and for validation various chromatographic techniques.

Objective: The aim of this paper was to describe and compare screening and confirmatory methods in the biological urine samples.

Materials and methods: The materials used and included in this paper are urine samples which are a part of the archives of the Central Laboratory of KBC Split and the Laboratory for Chemical Toxicological Analysis, Clinical Department of Judicial Medicine, Department of Pathology, Judicial Medicine and Cytology KBC Split. The initial screening technique used is an immunochemical method, most commonly labeled with an enzyme that requires verification due to its insufficient specificity. As a gold standard, a gas chromatographic method with a mass spectrometer was used which confirms a positive finding and excludes negative ones.

Results: By comparison of results made by preliminary and confirmable methods deviations were observed. A sample of choice for analyzing means of addiction is urine. The analytic method of choice, at the same time the gold standard is gas chromatographic mass spectrometry.

Keywords: means of addiction, urine, immunochemical methods, GC-MS

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Sara Ribičić

Datum rođenja: 20. ožujka 1997.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

OBRAZOVANJE

2015.-2018. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2011.-2015. IV. gimnazija Marko Marulić, Split, Hrvatska

2004.-2011. Osnovna škola Split 3, Split, Hrvatska

POSEBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Poznavanje svih računalnih programa, MS Office, Internet.

Poznavanje engleskog jezika u govoru i pismu (C1).

OSTALO

Aktivno sudjelovanje na 4. Kongresu Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost, održanom u Zagrebu.

Tijekom cijelog studija predstavnica smjera Medicinsko laboratorijska dijagnostika, član Stručnog vijeća Sveučilišnog odjela zdravstvenih studija te član Studentskog zbora Odjela zdravstvenih studija.

Zahvaljujem se profesorici Davorki Sutlović na stručnom vođenju i savjetima pri izradi i pisanju ovog završnog rada.