

УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ СА  
ПРИВРЕМЕНИМ СЕДИШТЕМ У КОСОВСКОЈ МИТРОВИЦИ  
ПРИРОДНО МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Вера Р. Лукић

**САВРЕМЕНЕ МЕТОДЕ МАСЕНЕ  
СПЕКТРОМЕТРИЈЕ У АНАЛИТИЦИ  
ПСИХОАКТИВНИХ СУПСТАНЦИ У  
СУДСКОЈ ТОКСИКОЛОГИЈИ**

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2022.

UNIVERSITY OF PRISTINA TEMPORARY SETTLED IN  
KOSOVSKA MITROVICA

FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS

Vera R. Lukić

**CONTEMPORARY METHODS OF MASS  
SPECTROMETRY OF PSYCHOACTIVE  
SUBSTANCES ANALYSIS IN FORENSIC  
TOXICOLOGY**

Doctoral Dissertation

Kosovska Mitrovica, 2022.

Универзитет у Приштини са привременим  
седиштем у Косовској Митровици  
Природно-математички факултет

---

**др Драган Манојловић, редовни професор, председник комисије**  
Универзитет у Београду  
Хемијски факултет  
Ужа научна област - аналитичка хемија

---

**др Ранко Симоновић, редовни професор, члан комисије**  
Универзитет у Приштини са  
привременим седиштем  
у Косовској Митровици  
Природно-математички факултет  
Ужа научна област - аналитичка хемија

---

**др Ружица Мицић, редовни професор, члан комисије - ментор**  
Универзитет у Приштини са  
привременим седиштем  
у Косовској Митровици  
Природно-математички факултет  
Ужа научна област - аналитичка хемија

---

**др Владимир Живковић, ванредни професор, члан комисије**  
Универзитет у Београду  
Медицински факултет  
Ужа научна област - судска медицина

---

**др Бранка Петровић, ванредни професор, члан комисије**  
Универзитет у Приштини са  
привременим седиштем  
у Косовској Митровици  
Природно-математички факултет  
Ужа научна област - аналитичка и физичка хемија

Датум одбране

Косовска Митровица, \_\_\_\_\_

*Докторска дисертација је урађена у токсиколошкој лабораторији Института за судску медицину „Милован Миловановић“ Медицинског факултета Универзитета у Београду, на чему се најтоплије захваљујем.*

*Захваљујем се ментору професорки Ружици Мицић на помоћи, стручним саветима, мотивацији, храбрости и подршци током израде овог рада. Са њом је путовање кроз рад било инспиративно, занимљиво и лепо.*

*Посебно се захваљујем Биљани Арсић на сарадњи и конструктивним стручним саветима.*

*Члановима комисије се захваљујем на професионалности и сарадњи.*

*Захваљујем се свим дугогодишњим колегама и сарадницима Института за судску медицину у Београду, који доживљавам својом другом кућом.*

*Такође се захваљујем запосленима на одсеку за хемију Природно-математичког факултета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици, одакле су моји корени.*

*Највећу захвалност дугујем својој породици, мајци, брату, сестрама, и мојој неисцрпној љубави деци, Николи, Неди и Нини који су моја највећа подршка и снага и којима посвећујем ову дисертацију.*

## **Наслов дисертације**

Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији

**Резиме:** Масена спектрометрија је као аналитичка техника изузетно брзо напредовала. На тржишту су се појавили нови инструменти са изванредним карактеристикама. Развијени су јонски извори на атмосферском притиску, усавршени постојећи масени анализатори а њиховом комбинацијом направљени нови хибридни инструменти чије су карактеристике подигле масену спектрометрију на изузетну позицију међу аналитичким методама. Истовремено се на тржишту дрога појављују новодизајнирани психоактивни молекули који су заједно са новим технологијама утицали на рад токсиколошких лабораторија. У аналитици психоактивних супстанци масена спектрометрија се сматра методом избора.

У раду су коришћене савремене инструменталне технике: GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS и LC-QTOF/MS у циљу идентификације психоактивних супстанци у узорцима од значаја у области судске токсикологије. Оптимизовани су аналитички параметари у тандем масеној спектрометрији; одабирани су прекурсор јони, продукт јони, колизионе енергије селектоване су реакције за праћење анализата за одабране психоактивне супстанце тзв. класичне (морфин, кодеин, 6-моноацетилморфин) и новодизајниране дроге (из групе синтетичких канабиноида, опиоида, катинона, фенетиламина, пиперазина и арилициклохексиламина) у циљу њихове идентификације. Разматрани су и критеријуми за идентификацију психоактивних супстанци методама масене спектрометрије. Постављене методе за идентификацију психоактивних супстанци примењене су на реалним узорцима у судској токсикологији.

## **Кључне речи**

Масена спектрометрија, идентификација, MRM оптимизација, HRMS, новодизајниране психоактивне супстанце, судска токсикологија

**Научна област:** Хемија

**Ужа научна област:** Аналитичка хемија, UDK број 543

## **Title**

Contemporary methods of mass spectrometry of psychoactive substances analysis in forensic toxicology

**Summary:** Mass spectrometry as an analytical technique has advanced extremely rapidly. New instruments with extraordinary characteristics have appeared on the market. Atmospheric ion sources have been developed, existing mass analyzers have been improved, and new hybrid instruments have been combined, the characteristics of which have raised mass spectrometry to an exceptional position by the analytical method. At the same time, newly designed psychoactive molecules are appearing on the drug market, which, together with new technologies, have influenced the work of toxicological laboratories. In the analysis of psychoactive substances, mass spectrometry is considered the method of choice. In this thesis modern instrumental techniques were used: GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS and LC-QTOF/MS in order to identify psychoactive substances in samples of importance in the field of forensic toxicology. Analytical parameters in tandem mass spectrometry were optimized; precursor ions, product ions, collision energy and reactions for monitoring analytes were selected, for the chosen psychoactive substances, so-called classic (morphine, codeine, 6-monoacetylmorphine) and newly designed drugs (from the group of synthetic cannabinoids, opioids, cathinone, phenethylamine, piperazine and arylcyclohexylamines) in order to identify them. Criteria for the identification of psychoactive substances by mass spectrometry were also considered. The set methods for the identification of psychoactive substances were applied to real samples in forensic toxicology.

**Keywords:** Mass spectrometry, identification, MRM optimization, HRMS, new designed psychoactive substances, forensic toxicology

**Scientific area:** Chemistry

**Science discipline:** Analytical chemistry, UDK No. 543

## Садржај

1.	УВОД.....	1
1.1.	Циљ.....	4
2.	ОПШТИ ДЕО.....	5
2.1.	Судска токсикологија.....	5
2.1.1.	Постмортем токсикологија.....	7
2.2.	Постмортем узорци за токсиколошку анализу.....	10
2.2.1.	Крв.....	10
2.2.2.	Урин.....	11
2.2.3.	Течност стакластог тела.....	13
2.2.4.	Јетра.....	13
2.2.5.	Узорци који се чувају у формалдехиду или сакупљају после балзамовања.....	15
2.2.6.	Коса.....	16
2.2.7.	Узорци прикупљени са места догађаја.....	18
2.2.8.	Припрема узорака за хемијско-токсиколошку анализу.....	19
2.3.	Масена спектрометрија.....	20
2.3.1.	Основни принципи масене спектрометрије.....	21
2.3.2.	Методе јонизације.....	23
2.3.3.	Електронска јонизација.....	25
2.3.4.	Електроспреј јонизација.....	28
2.3.5.	Масени анализатори.....	33
2.3.6.	Квадруполни масени анализатор.....	33
2.3.7.	Масени анализатори на бази времена прелетања.....	34
2.3.8.	Детектори јона.....	36
2.4.	Тандем масена спектрометрија.....	38
2.4.1.	Тандем масена спектрометрија у простору и времену.....	39
2.4.2.	Тандем масена спектрометрија – начини скенирања.....	40
2.4.3.	Колизијом изазвана дисоцијација – CID.....	42
2.5.	Хемијска идентификација.....	43
2.5.1.	Идентификација у масеној спектрометрији.....	44
2.5.2.	Токсиколошка анализа психоактивних супстанци.....	46
2.6.	Конформациона анализа.....	48
2.7.	Психоактивне супстанце.....	49
2.7.1.	Хероин – злоупотреба.....	49
2.7.2.	Нове психоактивне супстанце.....	52
2.7.3.	Синтетички катинони.....	53

2.7.4. Фенетиламини .....	62
2.7.5. Синтетички канабиноиди .....	65
2.7.6. Пиперазини .....	66
2.7.7. Синтетички опиоиди .....	67
2.7.8. Арилциклохексиламини .....	68
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО .....	75
3.1. Мерни инструменти .....	75
3.1.1. Гасни хроматографи са масеним и тандем масеним анализаторима .....	75
3.1.2. Течни хроматографи са тандем масеним и ТОF анализаторима .....	76
3.2. Лабораторијски прибор .....	77
3.3. Хемикалије и растварачи .....	78
3.3.2. Аналитички стандарди .....	79
3.4. Узорци .....	79
3.4.1. Узорци биљног материјала .....	79
3.4.2. Узорци биолошког материјала .....	80
3.5. Припрема основних и радних раствора аналитичких стандарда .....	81
3.5.1. Припрема радних раствора новодизајнираних дрога .....	81
3.5.2. Припрема радних раствора опијата за калибрациону криву .....	81
3.6. Припрема узорака .....	82
3.6.1. Припрема узорака биљног материјала .....	82
3.6.2. Припрема узорака биолошког материјала – ткива органа .....	82
3.6.2.1. Припрема узорака свежег ткива јетре и ткива из формалина .....	82
3.6.2.2. Припрема узорака ткива јетре из калуца .....	83
3.6.2.3. Припрема спајк узорака ткива за калибрациону криву .....	83
3.6.3. Припрема узорака за анализу NPS – урин .....	84
3.7. Аналитички инструменти - оптимизација параметара метода .....	84
3.7.1 GC-MS – анализа биљног материјала .....	84
3.7.2. LC-QTOF/MS – анализа биљног материјала .....	85
3.7.3. LC- MS/MS – оптимизација методе – ММВ-СНМІСА .....	86
3.7.4. GC- MS/MS – оптимизација методе – синтетички канабиноид JWH-018 .....	87
3.7.5. LC-MS/MS – оптимизација методе – одабране новодизајниране дроге .....	87
3.7.6. GC-MS – анализа метаболита хероина у ткиву јетре .....	88
3.7.7. GC- MS/MS – анализа метаболита хероина у ткиву јетре .....	89
3.7.8. LC-QTOF/MS – токсиколошки скрининг .....	89
3.8. Конформациона анализа .....	91
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	92
4.1. Идентификација синтетичких канабиноида у биљном материјалу .....	92
4.1.1. ММВ-СНМІСА – GC-MS резултати .....	92
4.1.2. LC-QTOF/MS – резултати .....	93



4.1.3. LC- MS/MS – резултати оптимизације методе .....	95
4.1.4. JWH-018 - GC-MS резултати .....	99
4.1.5. GC-MS/MS – Селекција прекурсор и продукт јона синтетског канабиноида JWH-018.....	99
4.1.6. Примена методе на реалним узорцима - приказ случаја .....	105
4.2. Одабране новодизајниране дроге - LC- MS/MS резултати .....	108
4.2.1. LC- MS/MS – резултати селекције прекурсор и продукт јона одабраних новодизајнираних психоактивних једињења.....	108
4.2.2. Примена методе LC- MS/MS на реалним узорцима .....	111
4.2.3. Резултати конформационе анализе NPS .....	113
4.3. Анализа метаболита хероина у ткиву јетре .....	114
4.3.1. GC- MS - резултати .....	114
4.3.2. GC-MS/MS - резултати .....	116
4.3.3. Поређење метода GC-MS и GC-MS/MS.....	133
4.4. LC-QTOF/MS .....	134
4.4.1. Примена методе LC-QTOF/MS на реалним узорцима .....	139
5. ЗАКЉУЧАК .....	142
6. ЛИТЕРАТУРА .....	146
ПРИЛОЗИ.....	159
БИОГРАФИЈА .....	202

## 1. УВОД

Две су се „револуције“ десиле у готово исто време. Револуција у развоју масене спектрометрије и експанзија новодизајнираних дрога. Случајно или не, али на пољу аналитичке токсикологије дешава се сучељавање две моћне силе. На једној страни масена спектрометрија са палетом јонских извора, масених детектора, високом резолуцијом масе, а на другој нови мали молекули, мало или мало више али довољно различити да распале машту аналитичара који се нашао у средини ове две ерупције моћи. Треће не мање важно нови приступ у рутинском раду, нове могућности са нижим границама детекције, нови критеријуми и правила. Нисмо ни ми одолели изазову па смо се у овој дисертацији помоћу савремених метода масене спектрометрије ухватили у коштац са новим и старим психоактивним молекулима како бисмо их идентификовали у матриксама од судско-медицинског значаја и дали допринос у разрешењу неких важних питања у области судске токсикологије.

Психоактивна супстанца је свака супстанца, која по уношењу у организам мења једну или више његових психичких функција и након поновљене употребе може довести до психичке или физичке зависности.

Злоупотреба психоактивних супстанци је највећи социјални и здравствени проблем широм света. Поред последица по здравље корисника злоупотреба психоактивних супстанци доводи и до бројних социјалних проблема, као и до економских губитака због пораста трошкова лечења, ширења илегалних токова новца, пораста трошкова здравствене и социјалне заштите и др.

Са судско-медицинског као и хемијско-токсиколошког аспекта значајне су криминалне радње, убиства, самоубиства под утицајем дрога због важне чињенице да се само хемијско-токсиколошком анализом може доказати присуство психоактивних супстанци у организму а тиме и утицати на правне последице насталог кривичног дела. Као посебна и најважнија област судске токсикологије издваја се постмортална судска токсикологија. Летални исход тровања не може се доказати у судском смислу уколико се несумњиво не потврди присуство отрова у ткивима и/или телесним течностима троване особе. Обзиром да велики број отрова и лекова не показује карактеристична патолошка оштећења њихово присуство у организму може се

доказати само после екстракције и идентификације које су спроведене научно прихватљивим методама и поступцима.

Уколико се токсиколошке анализе избегавају или се не раде на одговарајући начин смртни случајеви као последица тровања могу се погрешно приписати неком потпуно другачијем узроку што може да има значајне правне и друштвене последице. Коначно, резултати токсиколошких анализа могу да дају и значајне епидемиолошке и статистичке податке. Токсиколози могу да упозоре на честу употребу неких лекова или дрога у већим дозама, или укажу на појаву нових психоактивних супстанци које се налазе на тржишту, а које могу да изазову промене у понашању корисника, тровање или доведу до смртог исхода. Појава „нових психоактивних супстанци”, дизајнираних као „легална” замена за илегалне дроге задала је нове сложене задатке аналитичарима, али и унела нову живост у лабораторијском раду. Разноврсност нових дрога и њихов растући број чине их сталном покретном метом за аналитичара. Позната је и „трка” која је настала између синтетичара који у илегалним лабораторијама изналазе решења за синтезу нових једињења и аналитичара да их у рутинском раду идентификују, као и регулаторних тела да их након процене ризика ставе под контролу.

Поред нових једињења на тржишту дрога и стални развој аналитичких инструмената током последњих двадесетак година извршио је велики утицај на рад токсиколошких лабораторија. У аналитици психоактивних супстанци масена спектрометрија се сматра методом избора. Често је због своје корисности називају златним стандардом. Масена спектрометрија је као аналитичка техника изузетно брзо напредовала. На тржишту су се појавили нови инструменти са изванредним карактеристикама. Развијени су јонски извори на атмосферском притиску, усавршени постојећи масени анализатори, а њиховом комбинацијом направљени нови хибридни инструменти чије су карактеристике подигле масену спектрометрију на изузетну позицију међу аналитичким методама (1). Раније су гасна хроматографија са масеном спектрометријом GC-MS и електронском јонизацијом (EI), а касније и хемијском јонизација (CI), биле једине коришћене технике масене спектрометрије. Данас се разне MS технике могу наћи у многим токсиколошким лабораторијама. Најчешће су

то LC-MS са електроспреј јонизацијом (ESI) или хемијском јонизацијом под атмосферским притиском (APCI) и тандем масена спектрометрија (MS/MS) са троструким квадруполом или јонском замком (2). Виши стадијум еволуирања настаје увођењем масене спектрометрије високе резолуције (HRMS) > 10000, којом се омогућава прецизно мерење масе са тачношћу од <5 ppm. То доводи и до лаганог преласка са инструментације са јединичном резолуцијом (LRMS) у којој доминирају квадруполи према инструментима високе моћи резолуције (HRMS) као што су нпр. масени спектрометри Time-of-flight и Orbitrap Fourier-transform mass spectrometry.

Технике масене спектрометрије омогућавају детекцију и идентификацију компоненти у траговима у сложеним смешама као и анализу неиспарљивих и термолабилних једињења. Осетљивост без премца, ниске границе детекције и брзина, утицале су на разноврсност њене примене. Захваљујући развоју масене спектрометрије појављују се и нови термини као што су метаболомика, протеомика и друге „омике“. Рутински се користи у контроли загађења животне средине, контроли хране, у праћењу технолошких процеса у привреди, фармацеутској индустрији и многим другим областима. У форензичкој науци је незаобилазна техника. Увођење нових техника масене спектрометрије у токсиколошким лабораторијама утрло је пут за нове примене у токсиколошкој анализи (1) (2). Развој масене спектрометрије подигао је на виши ниво и анализу психоактивних супстанци у судској токсикологији. Нове могућности идентификације подстакле су креативност токсиколога да у различитим биолошким матриксама пронађу одговарајућа решења за екстракцију и идентификацију дрога, лекова или других ксенобиотика од интереса. Просто је задивљујућа палета узорака који се користе у ове сврхе, од биолошких течности до кератогених ткива и чак ларви инсеката.

Узорци који се рутински користе у постмортем судској токсикологији, уколико су доступни су телесне течности: крв, течност стакластог тела и урин. Одабир узорака зависи и од стања тела након смрти као и од околности случаја. Ткиво јетре се ређе користе у рутинској анализи. Међутим како је јетра примарни метаболички орган изузетно је значајан алтернативни узорак за хемијско-токсиколошку анализу, нарочито када узорци крви, течности стакластог тела или урина нису доступни.

Може да послужи и као додатна потврда о присуству дроге, лека, метаболита или неке друге супстанце која је потенцијални узрок тровања.

У форензичким случајевима када узорци за токсиколошку анализу нису сакупљани у тренутку обдукције, већ се потреба за токсиколошком анализом указала накнадно због сумње на употребу дроге, да би се избегла ексхумација леша некада се користе узорци ткива јетре који су стављени у раствор формалина ради даље припреме ткива за хистопатолошку анализу. Узорак из формалинског раствора пролази даљу процедуру хистолошке припреме и на крају се калупи у парафину.

### **1.1. Циљ**

Циљ рада је развој аналитичких метода за идентификацију психоактивних супстанци у биолошком или другом материјалу који може бити предмет токсиколошке анализе ради њихове примене на реалним узорцима. У раду ће се користити савремене аналитичке инструменталне технике (GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS и LC-QTOF/MS).

Такође ће се испитати могућност да се ткиво јетре које је припремљено за хистопатолошку анализу, а налази се у парафинском калупу може користити за хемијско-токсиколошку анализу јер се у њему може доказати неки од метаболита хероина, што би у случајевима да је део ткива једини узорак који се чува након обдукције могао да буде доказни материјал да је особа користила хероин и да је то могло да доведе до смртог исхода.

Наша идеја је да узорак који се налази у парафинском калупу искористимо за токсиколошку анализу како бисмо доказали или одбацили хипотезу о могућности употребе овог узорка у случајевима када је једини сачувани након обдукције тела.

Посебан циљ је развој метода за идентификацију изабраних новодизајнираних психоактивних супстанци на LC-MS/MS-у што подразумева оптимизацију хроматографских услова за њихову идентификацију.

## 2. ОПШТИ ДЕО

Ово поглавље се бави судском токсикологијом са посебним освртом на постмортем токсикологију, општим принципима масене спектрометрије са акцентом на врсту јонизације и врсту масених анализатора, психоактивним супстанцама класичним и новодизајнираним као и узорцима који могу бити предмет хемијско-токсиколошке анализе.

### 2.1. Судска токсикологија

Термин „судска токсикологија“ означава примену различитих научних дисциплина ради проучавања отрова и његовог деловања да би се разјаснила питања постављена на суду, било да се ради о кривичном или грађанском поступку. Иако се судска токсикологија углавном везује за рад са полицијом, мртвозорницима и правосудним органима и токсиколошки резултати у склопу контроле јавног здравља или екологије (безбедност хране, воде, ваздуха) на пример, могу бити предмет судског спора али грађанског, не кривичног тако да и ови аспекти у ширем смислу спадају у домен судске токсикологије (3).

Основни задатак судске токсикологије је да користећи знања и принципе опште токсикологије, фармакологије и аналитичке хемије, помогну у медицинском или правном истраживању узрока смрти, тровања или употребе дрога. У оквиру судске токсикологије издвајају се три дисциплине:

- Постмортем токсикологија (енг. Postmortem Toxicology)
- Токсикологија људског понашања (енг. Human Performance Toxicology)
- Форензичко тестирање дрога (енг. Forensic Drug Testing)

Од ове три дисциплине које се издвајају у данашњој пракси постмортем судска токсикологија има најближи однос са историјском перцепцијом судске токсикологије везаном за убилачка тровања (4).

Као посебна дисциплина издваја се и форензичко тестирање дрога као потреба откривања употребе дрога међу појединцима. Има широку примену у областима као што су тестирање на радном месту, тестирање спортиста, тестирање код условних казни везаних за узимање дроге и тестирање кандидата за посао.

Токсикологија људског понашања се бави везом између количине присутне дроге код појединца и његовог понашања. На њеним основама се заснива и спровођење закона који се односе на вожњу под дејством дрога. Ова дисциплина се назива и бихејвиорална токсикологија. Користи концепте модерне психологије како би се истражио однос доза-одговор између дроге и њима изазване промене у понашању. Судски токсиколог је често позван да након токсиколошке анализе да своје мишљење и повеже добијене резултате са понашањем појединца под њеним утицајем. Такви су случајеви у вези са вожњом под утицајем дрога (енг. driving under the influence of drugs, DUID) или алкохола (енг. driving under the influence of alcohol, DUIA), као и случајеви криминалних радњи, плјачки, физичких обрачуна (енг. drug-facilitated assault, DFA) или силовања под утицајем дрога (drug-facilitated sexual assault, DFSA) (5). Форензичка истраживања се проширују и на истраживања последица злоупотребе дрога на појединца или друштво. Међутим и поред проширене примене судске токсикологије, основна одговорност форензичког токсиколога и даље остаје на помоћи правосудном систему у одлучивању да ли одређена супстанца може да има клинички или токсиколошки утицај на исход у правном смислу. У ту сврху, форензички токсиколог мора прво да утврди присуство и тачни идентитет хемијске супстанце (отров, лек на рецепт или дрога) било код покојника, било код живог појединца и успоставити однос између изложености и појаве штетног ефекта, понашања или смрти (4).

Дакле, главни задатак аналитичара у области судске токсикологије је да отров идентификује и квантификује. Три су главна циља овог сложеног задатка:

- да се утврди да ли су токсиканти присутни у организму и да ли су могли допринети смртном исходу (енг, medicolegal death investigations)

- да се утврди да ли су токсиканти присутни у организму и да ли су могли да изазову промене у понашању (код учесника у саобраћају или жртава сексуалног злостављања (енг. human performance issues)
- да се утврди да ли су токсиканти присутни у организму, да ли се ради о легитимној употреби (нпр. прописани лекови) или изложености (нпр. на радном месту) (енг. drug testing) (6).

### **2.1.1. Постмортем токсикологија**

Постмортем токсикологија се бави идентификацијом хемијских супстанци у биолошком материјалу узетог у току обдукције како би се утврдио начин и узрок смрти у случајевима када постоји сумња на тровање. Тежина тровања се обично процењује концентрацијом фармаколошки или токсиколошки активног једињења у крви. Међутим ово тумачење које је могуће применити у клиничкој токсикологији где се ради о тровањима код живих особа, показало се тешким или некада немогућим у постмортем токсикологији. Бројни биохемијски и биолошки процеси почињу одмах након смрти, тако да добијене концентрације анализата из обдукционих узорака не одражавају нужно и њихову концентрацију у крви у тренутку смрти. Предвиђање да ли је и у којој мери дошло до постморталних промена још увек је немогуће за појединачне случајеве јер оне почињу да се дешавају и пре него што тело стигне на обдукцију (7). Тумачење добијених резултата се стога мора обавити пажљиво, узимајући у обзир околности случаја и све доступне информације.

У тзв. преаналитичкој фази, односно фази пре саме анализе потребно је прикупити што више информација о конкретном случају; утврдити да ли постоји сумња на одређену врсту дроге; уколико постоји упутити се о начину на који се она метаболише, који су производи њеног метаболизма, у којим биолошким узорцима их треба очекивати, у ком временском интервалу; упутити се да ли постоје нека конкретна питања од стране суда на која треба одговорити осим идентификације и квантитативне анализе потенцијално присутне дроге; ићи корак даље и претпоставити која би све питања могла да буду постављена од стране суда или родбине; у разговору са патологом утврдити у каквом је стању тело; да ли постоје



неке постморталне промене, видљиви знаци; у складу са тим предложити које доступне узорке је потребно издвојити, како би се касније добијени резултат интерпретирао на најбољи могући начин и дао одговор да ли је или није и у којој мери идентификована супстанца допринела смртном исходу.

То значи да токсиколошка анализа почиње са првим информацијама добијеним у вези са случајем. Важне су и информације о годинама старости, полу, навикама појединца, да ли постоје подаци о конзумирању наркотика, да ли има података о претходној терапији, колико је времена прошло од смртог исхода до проналаска тела и саме обдукције, на који начин је тело транспортовано и складиштено пре обдукције, да ли постоји медицинска документација, да ли је покојни био анимиран од стране лекара хитне помоћи, да ли је том приликом добио неку терапију и коју. Све су то питања која стварају почетну слику о догађају који је потребно сагледати како бисмо за почетак одабрали прави узорак који ће бити најинформативнији за дати случај.

Токсиколог би требало да унапред припреми одговоре на потенцијална питања суда. Могуће је очекивати питања као што су нпр. она која се односе на начин и време када је супстанца унета у организам, затим на темпо уноса, једнократно, повремено или хронично, да се изјасни да ли су утврђене концентрације терапијске или токсичне, да грубо процени временски интервал између уношења дроге у организам и настанка смртог исхода. Да би било могуће дати одговоре на оваква софистицирана питања и правилно тумачити добијени аналитички резултати важно је прикупити што више информација пре самог узорковања (8).

Некада је на основу прикупљених података: запажања и налаза на лицу места, извештаја о догађајима непосредно пре смрти, резултатима полицијских увиђаја и евиденцији о медицинској или социјалној историји преминулог на самом почетку јасно да је токсиколошка анализа неопходна за доношење коначног закључка о узроку смрти. Све добијене информације су корисне и дају смернице за избор одговарајућих узорака. Осим тога, докази пронађени на лицу места могу пружити вредне информације и олакшати одлуку о томе која тестирања ће се приоритетно изводити (9).

Међутим у одређеном броју случајева, сумња на тровање може изостати а тровање неутврђено зато што околности евидентирание након полицијског увиђаја, екстерни преглед леша и налаз на обдукцији могу бити недовољни да објасне узрок смрти. Код већине смртних случајева повезаних са дрогом не постоје очигледни или специфични знаци на лешу као нпр. они који се налазе код отказивања органа, карцинома или трауме. Већина лекова и хемикалија не даје карактеристичне патолошке промене. Често, једина индикација тровања или интоксикације је конгестија главних органа, већа прокрвљеност, и едем плућа и мозга. Важно је нагласити да је потребно и у случајевима који се у почетку обрађују као рутински обезбедити да одговарајући узорци са обдукције увек буду доступни за извођење токсиколошких испитивања (8) (9).

Биолошки узорци доступни за постмортем токсиколошку анализу могу бити бројни и променљиви. Њихов одабир и прикупљање требало би да буде добро осмишљено и правилно изведено. Могу се бирати на основу околности конкретног случаја, посебних захтева, правних аспеката и доступности у датом случају тако да свако узорковање у току обдукције треба сматрати јединственим. Узорци који се рутински прикупљају на обдукцији су телесне течности као што је крв са периферних места и крв из срца, течност стакластог тела, урин, жуч, цереброспинална течност, садржај желуца и ткива органа, посебно јетра (10) (11). У зависности од конкретног случаја потребно је поред узорака који се рутински узимају, уколико су доступни размислити о томе да ли и неки од алтернативних узорака може пружити додатне информације о начину примене, дуготрајној или недавној употреби/изложености леку или отрову, као што су на пример коса и нокти (9). У случајевима када се ради о разложеном, декомпензованом, скелетизованом или балзамованом лешу доступност узорака је ограничена, стога ови случајеви представљају јединствен изазов за токсиколога (11).

## 2.2. Постмортем узорци за токсиколошку анализу

Постмортем узорци за токсиколошку анализу могу бити бројни. Можемо их сврстати у неколико група:

- Телесне течности: крв, урин, течност стакластог тела, перикардијална течност, цереброспинална течност, жуч, садржај желуца;
- Ткива органа: јетра, бубрег, мозак, скелетни мишићи, масно ткиво;
- Алтернативни узорци: брисеви слузокожа носних шупљина, орални брисеви, брисеви коже; кератинозни узорци: коса, нокти; плеурална течност; непаремхимски узорци: кост, коштана срж, зуби; садржај црева: меконијум нпр.; ентомолошки узорци: ларве инсеката;
- Узорци са места догађаја: шприцеви, кашике, таблете, празне фолије лекова, непознате течности, прашкови, биљни материјал, каустична средства;
- Узорци који се чувају у формалдехиду или сакупљају после балзамовања.

Сваки узорак који се користи за анализу носи неку информацију о уносу дроге/лека или њеном не конзумирању. Узорци крви, урина и течности стакластог тела су најчешће коришћене телесне течности у постмортем судској токсикологији. Ткива органа се не анализирају рутински. Како се један део овог рада односи на анализу ткива јетре у свежем и у стању након третирања формалином то ће у даљем тексту бити речи о овим узорцима као и о најчешће коришћеним телесним течностима.

### 2.2.1. Крв

Крв је узорак избора за утврђивање скорашњег уноса дрога или страних супстанци. Позитиван налаз може указивати на недавну употребу или изложеност, јер многе супстанце прилично брзо нестају из циркулације. Због података о терапијским, токсичним или леталним концентрацијама који постоје у литаратури крв је најпогоднији узорак за тумачење добијених резултата квантификованих лекова/дрога и одговарајућих метаболита. Квантификација се обично врши из узорака са периферних места, нпр. из феморалне вене.

Постморталана крв је често хемолизована и пуна крвних угрушака. И након дуготрајног центрифугирања најчешће није могуће издвојити серум. У неким случајевима, након тешких повреда или траума узорци крви из вена нису доступни. Тада је једино доступна „крв“ из грудног коша или трбушне дупље. Међутим састав ове „крви“ се разликује од пуне крви тако да њиховом анализом можемо добити само квалитативни податак о присуству дроге или лека. Одређивање концентрације лека у крви је довољно у случајевима када је концентрација лека у токсичном опсегу и када је из околности случаја евидентно да се ради о тровању. Крв је такође добар узорак за употребу у случајевима тровања гасовима или испарљивим једињењима, нпр. код смртних случајева намерног или случајног удисања издувних гасова. Крв је такође одговарајући узорак у случајевима када је потребно проверити да ли је покојник узимао било шта од прописаних лекова (9) (12) (13).

Многе студије показују значајне разлике у концентрацији испитиване супстанце између артеријске и венске крви као и између крвних судова у различитим деловима тела (14). Ове разлике могу али не морају бити последица згрушавања или хемолизе настале постмортем (12). Срчана крв је обично обилнија од периферне крви. Нађено је такође и да су нивои лекова у крви из срца генерално виши од оних у феморалној венској крви. Због тога је крв из срца погодна за почетни токсиколошки скрининг, нарочито лекова који се екстензивно метаболишу. За разлику од концентрација добијених из периферних извора, референтни подаци о концентрацијама лекова у срчаној крви од живих особа нису доступни (9).

### **2.2.2. Урин**

Урин је значајан узорак за добијање информација о антемортем изложености дроги/леку. Урин није циркулишућа течност већ се прикупља у мокраћној бешици а након тога излучује. Због тога је концентрација акумулираних лекова и метаболита обично висока што олакшава откривање злоупотребе или изложености дрогама. Међутим у 50% смртних случајева, дешава се да се бешика испразни у тренутку умирања што за последицу може имати одсуство урина као узорка (5). Урин садржи око 99% воде. За разлику од крви, углавном нема протеине и липиде, па се може

анализирати било директно имунотестовима или неинструменталним спот тестовима као и после екстракције одговарајућим растварачем. Често се користи као узорак одабира за токсиколошки скрининг, нпр. код смрти у вези са злоупотребом дрога и прописаних лекова као и код несрећних случајева када постоји сумња на злоупотребу. Припрема узорка је једноставнија у односу на крв. Чак и када се анализом крви не открије страна супстанца, анализом урина је могуће открити недавну изложеност идентификацијом његових метаболита. Негативан налаз у урину се може добити када је смрт наступила веома брзо. Оно што је са судскомедицинског и токсиколошког аспекта важно је да не постоји уопштено корелација између концентрација лека у урину и фармаколошких ефеката, и налаз лека/дрогe у урину није увек индикација за акутно тровање. Супстанце које се брзо метаболишу, обично нису присутне у урину у матичном облику или су присутне у ниским концентрацијама. Међутим и присуство метаболита у узорку урина је важна информација која се може добити. Лажно позитивни резултати скрининга постморталних узорака урина су могући (15).

Три су основна недостатка узорка урина у постмортем токсикологији. Доступан је само у око 50% смртних случајева, јер се обично бешика испразни током процеса умирања. Зато није практично развијати аналитичке протоколе за постмортем тестирање који се искључиво ослањају на детекцију дрога у урину. Друго, многи лекови се интензивно метаболишу тако да се основни лек не детектује у урину, или је присутан само у релативно ниској концентрацији. Међутим, ако се траже метаболити урин може бити корисна течност. Трећи недостатак је што је тешко или немогуће протумачити добијене концентрације већине лекова у урину. Корелација између концентрације дрога у урину и крви је изузетно мала. Примарни разлог за то је што урин није течност која циркулише, већ је отпадни производ који се сакупља у бешици. Концентрације лекова и метаболита у урину зато зависе од времена формирања урина у односу на узорковање и унос дроге (5).

### 2.2.3. Течност стакластог тела

Течност стакластог тела је провидна желатиозна течност која испуњава простор очне јабучице иза задње коморе ока. Њена анатомска локализација штити је од продора бактерија па је у односу на остале телесне течности мање подложна труљењу (13). Садржи врло мало ензима и протеина. Због тога се дроге/лекови који су у значајној мери везани за протеине или су липофилни у течности стакластог тела обично налазе у нижим концентрацијама (9) (11). Стакласто тело је значајан узорак за анализу дрога. Може да укаже на злоупотребу хероина када је б-моноацетилморфин детектован у стакластом телу а негативан у крви (16) (17). Мало студија је објављено на тему односа концентрација дрога у крви и стакластом телу (17) (18). У стакластом телу се вероватно дешава успорено или, одложено преузимање лекова али и обрнуто, изгледа да постоји и кашњење у процесу излучивања. У стакластом телу се концентрација дроге повећава посмртно. Ово запажање се углавном приписује дехидрацији (9). Међутим постоје и објашњења да се дрога складишти у ткиву ока а да се касније излучује у течност стакластог тела (19). Повећање концентрације у стакластом телу после смрти примећене су и код анализе кокаина. Концентрације различитих нитробензодиазепина су биле ниже у стакластом телу него у крви, у просеку за једну трећину (20). Концентрације диазепана, десметилдиазепана и темазепана су биле слични или ниже у стакластом телу него у крви (18). Многе студије су нагласиле корисност стакластог тела за анализу алкохола (21). Користи се за разликовање антемортемног уноса алкохола од његовог постмортем формирања (10). Главни недостатак овог узорка је мала запремина. Може се добити до око 3 mL из сваког ока. б-моноацетилморфин је стабилнији у ТСТ него у крви, вроватно због релативног недостатка естераза у ТСТ.

### 2.2.4. Јетра

Јетра је најважније ткиво органа које се анализира у постмортем токсикологији. Неки од разлога су велика количина доступног ткива, лакоћа сакупљања и у односу на друга ткива релативно лакша припрема узорка. Оно што је још важније у

литератури постоји доступна релативно велика база података о концентрацији лекова у јетри у поређењу са количином података за остала ткива. Ова чињеница олакшава интерпретацију добијеног резултата. Поред тога концентрације многих основних лекова су веће у јетри него у крви, што олакшава њихову идентификацију. Јетра се фаворизује као узорак када крв није доступна због искрварења, пожара или распадања/труљења.

Уочена је и већа стабилност лекова и дрога у јетри када се посматра са аспекта постморталне прерасподеле. Међутим и концентрација лекова у јетри може у мањој количини да опада због постморталне дифузије али и да се локално повећа услед дифузије из желуца. Главни недостаци јетре као узорка су брже труљење у односу на крв и тенденција да буде масна што отежава екстракцију циљаних анализата (5).

Ткива органа, најчешће јетре и мозга раније су се чешће користила у рутинској постморталној токсикологији због високих концентрација у односу на крв, чак 10-50 пута. Међутим са повећавањем осетљивости аналитичких метода данас се већина анализата или њихових метаболита може доказати у крви тако да се крв фаворизује чак и као једини узорак за анализу. Међутим са открићем феномена као што је на пример постмортална редистрибуција концентрација лекова у крви се може значајно смањити а у неким случајевима и повећати (2-10 пута). Због тога анализа ткива нарочито јетре добија на значају зато што је концентрација лекова у овом ткиву релативно стабилна. Проблем лежи у интерпретацији добијених концентрација дрога у ткиву. За разлику од крви, референтни опсег за лекове у ткивима није могуће добити из клиничких студија, а подаци добијени у експериментима на животињама нису директно преносиви на људе. Судски токсиколози се због тога морају ослоњати на податке добијене из других, у литератури описаних случајева или на основу искустава стечених у сопственим лабораторијама (5).

Да би били корисни, постмортални подаци морају укључивати и случајеве у којима су лекови узимани у терапијским дозама, а не само случајеви предозирања. Поставља се питање да ли је могуће „концентрацију лека у ткивима превести у концентрацију лека у крви“? Ткива органа се разликују анатомски од крви и имају различиту кинетику. Оно што је можда генерално тачно је да су високе

концентрације лека у крви праћене високим концентрацијама у ткивима. То је веома корисна чињеница али недовољна да би се направила нека математичка апроксимација концентрације лека у крви. Такође немогуће је извести студију односа дозе и концентрације лека у ткивима на људима. Ово указује да се мора опрезно тумачити добијени резултат у ткивима органа, нарочито онда када се жели извести закључак о његовој вези са концентрацијом у крви. Концентрација лека у ткивима свакако помаже као додатна информација која заједно са концентрацијама нађеним у крви, подацима добијеним у току обдукције, као и околностима случаја може помоћи у формулисању коначног закључка о улози дрога/лекова (уколико их има) као узрока смрти или његовог доприноса настанку смртог исхода (5).

#### **2.2.5. Узорци који се чувају у формалдехиду или сакупљају после балзамовања**

Некада је потребно урадити анализу узорака који су припремљени за патохистолошки преглед или из узорака који су узети из тела након балсамације. Заједничко за узорке добијене након балсамације и узорке ткива органа фиксираних формалином за потребе хистопатолошке анализе је то што су третирани формалдехидом и претрпели одређене хемијске промене. Некада су ови узорци једини доступни за токсиколошку анализу. То се најчешће дешава када пре почетка обдукције није постојала сумња на употребу дрога или излагање хемикалијама па узорци биолошког материјала нису издвојени за токсиколошку анализу или из неког другог разлога нису доступни. Међутим накнадно се добијају подаци који подгревају сумњу да је постојала могућност тровања или предозирања. У овим случајевима, једини начин да се изврши накнадна токсиколошка анализа је ексхумација тела (немогуће у случајевима кремације) или анализа ткива различитих органа фиксираних формалином који се прикупљају након већине клиничких и судско-медицинских обдукција за хистопатолошке прегледе (22). Раствор формалина који садржи најчешће између 2-20% формалдехида се користи за припрему ткива за хистопатолошку анализу, али и у случајевима када се ради балсамација леша у различите сврхе. Познато је да је формалдехид веома реактивна хемијска супстанца



која реагује са анализом у поступку фиксације ткива. Како део ткива стоји одређено време у раствору формалина (неколико сати или дана, у зависности за коју врсту хистопатолошког прегледа је намењено) долази до разблаживања узорка јер део анализата прелази у раствор (23). Поред тога припрема ткива фиксираним формалдехидом за пребацивање у тзв. парафинске калупе подразумева поступак дехидрације алкохолем што додатно утиче на смањење концентрације анализата у третираном ткиву. У литератури постоје подаци о испитивању стабилности неких анализата (22) (24) (25) током стајања у формалину, и концентрацијама нађеним у ткивима јетре, бубрега, плућа и концентрацијама у раствору формалина у коме су били фиксирани. Након калупљења парафином у тзв. парафинске блокове, ткиво се за хистопатолошки преглед сече и боји а онда фиксира на стаклену плочицу предметним стаклом.

#### **2.2.6. Коса**

Коса је јединствени материјал за ретроспективну анализу хроничне употребе дрога или лекова. Под претпоставком идеалног и равномерног раста косе (око 1 cm месечно), сегментна анализа косе може пружити информације о временском току употребе или излагања супстанци. Међутим, физиолошка позадина раста длаке, механизми уградње лекова/дрога нису једноставни и још увек нису у потпуности разјашњени.

Косу чине длаке (власи) које избијају на горњој кожи главе (власиште). Длака има два дела, корен и стабло. Корен длаке се зове фоликул. Налази се 3-4 mm испод површине коже и окружен је богатом мрежом крвних капила. У корену длаке ћелије су у активној пролиферацији (деоби, расту), док је метаболизам унутар длаке изнад коже занемарљив и зато се често каже да је коса мртво ткиво. Три врсте жлезда су повезане са фоликулом длаке - апокрине, лојне и знојне жлезде као и мишић тзв. подизач длаке. Сматра се да су три основна механизма инкорпорације дрога/лекова у длаку: из крви у току формирања длаке, из зноја и себума, и контаминацијом из спољашње средине. На уградњу дроге/лека у косу утиче и садржај меланина у коси као и физичко-хемијске особине супстанце која се у косу инкорпорира. Због тога

немамо јасну корелацију између унете дозе и количине дроге која се може детектовати у коси (26).

Коса не расте равномерно већ у циклусима. Разликујемо три фазе раста косе: анагену, катагену и талогену фазу. Анагена фаза је период раста косе који траје отприлике 4-8 година. Током ове фазе коса расте у просеку 0,22-0,52 mm на дан или 0,6-1,4 cm месечно. У овој фази се налази око 85% длака. Катагена фаза почиње након завршетка фазе раста. Зове се и фаза транзиције која може да траје око три недеље. У овој фази се длака спрема за фазу мировања и у њој се налази око 2% длака. Талогена фаза је фаза мировања. На крају ове фазе длака се потпуно одваја од корена и опада. Овај процес траје 2-6 месеци. У талоген фази се налази око 14% длаке. Као последица тога прамен косе на глави може да садржи између 5 и 20% косе у фази мировања, што значи длаке које су и до 6 месеци старије од већине длака које су у фази раста. Завршетком талогене почиње поново анагена фаза. Фактори као што су раса, обољења, нутритивни статус и године су фактори за које се зна да утичу и на период раста и на период мировања. У просеку на кожи главе одрасле особе око 85% длака је у фази раста а 15% у фази мировања. У физиолошким условима може да се изгуби око 100 длака (26).

Због овог биолошког природног цикличног раста длаке и прамен косе који се узима за анализу није хомоген. У једном прамену се истовремено могу наћи длаке у различитим фазама раста. Сматра се да су длаке на потиљачном делу главе највећим делом у фази раста (око 85%) те одатле и препорука да се узорак косе узима са потиљачног дела главе.

Чињеница да се путем густе мреже крвних капилаара простом дифузијом дрога/лек инкорпорира у корен длаке везивањем за њене структуре, да коса у потиљачном делу прилично равномерно расте у просеку 1 cm месечно (око 85% длака је у фази раста), да метаболизам практично престаје у длаци која је изнад коже главе и да је дрога на неки начин највећим делом "заробљена" у процесу формирања длаке у корену и да тако "заробљена" путује заједно са длаком која расте, користи се за ретроспективну анализу њеног намерног или ненамерног уношења у организам. Секвентна анализа укључује узимање узорка читаве дужине косе, што ближе кожи

главе и сечење у делове одговарајуће дужине да би се одредила концентрација или само присуство дроге/лека у одређеном сегменту косе и на тај начин утврдио временски период њеног конзумирања (27) (26).

Сматра се да је потребно неко време (око 10 дана) да длака која је у фази раста од формирања избије изнад површине коже главе. Узимајући у обзир тај податак и стопу раста косе од око 1 cm на месечном нивоу сегментном анализом можемо урадити ретроспективну анализу уноса дроге. Сматра се да је због нехомогености узорка косе једног сегмента у односу на фазе раста појединих длака могуће детектовати трагове дрога и након више месеци од последњег уноса. Најчешће се говори о три месеца након уноса последње дозе (26).

### **2.2.7. Узорци прикупљени са места догађаја**

Докази пронађени на лицу места могу обезбедити додатне информације и усмерити токсиколошку анализу у одређеном смеру. Утврђивање коришћења дрога може бити олакшано анализом кашика поцрнелих од чађи и садржаја шприцева нпр., док празне табле лекова могу указати на предозирање лековима. Анализа преостале течности у чашама или флашама може да укаже на супстанцу која је коришћена за самоубиство, убиство или другу врсту злочина. У неким случајевима, производи за домаћинство као што су каустици, растварачи или пестициди могу пружити додатне доказе токсикологу. Међутим супстанце пронађене на лицу места не морају бити у вези са смртним исходом или тровањем. То значи да посредни докази могу поткрепити али без анализе телесних течности не могу бити меродавни код одлучивања постојања тровања или настанка смрти (28).

Узорци биљног материјала сумњивог на присуство новодизајнираних дрога су често предмет хемијско-токсиколошке анализе. У неким случајевима они су предмет заплена, некада се достављају на анализу независно, на захтев особа које сумњају да неко њима близак користи дати материјал, некада су директно везани са клиничким случајем збрињавања због тровања а некада се сумњиви биљни материјал може наћи поред тела преминулог и анализира се у склопу постмортем токсиколошке анализе.

### 2.2.8. Припрема узорака за хемијско-токсиколошку анализу

Припрема узорка је подједнако важна за успешну анализу као и аналитичка метода која се примењује. Ово посебно долази до изражаја код захтева за анализу ниских концентрација анализата у сложеним матриксама, као што су биолошке течности или ткива органа.

Чврсто-течна екстракција (енг. *Solid Phase Extraction*, SPE) је моћна техника за брзу и селективну припрему узорака, погодна за изоловање анализата, концентрисање и пречишћавање. Заснива се на селективној расподели једне или више компоненти између две фазе, од којих је једна чврсти сорбенс, а друга течност, мада може бити и емулзија, гас или суперкритични флуид. Механизми задржававања анализата на чврстој фази зависе од карактеристика сорбенса и анализата. Пошто целокупни узорак прође кроз чврсту фазу анализат се уклања (елуира), најчешће погодним органским растварачем, преводи у облик компатибилан са аналитичком техником и анализира (29).

SPE је у последње две деценије успешно прихваћена као метода екстракције кључних анализата у токсиколошким, фармацеутским, биомедицинским као и истраживањима у области животне средине, контроли квалитета животних намирница, индустрији. Нове методе се свакодневно развијају (30) (31).

У судској токсикологији се најчешће користи комбинација течно-течне и чврсто-течне екстракције са или без дериватизације. Поступак припреме узорка зависи од самог анализата као и од инструменталне технике која се примењује. У ретким случајевима је могућа анализа узорка једноставним разблаживањем, центрифугирањем и филтрирањем. Ово се односи на невискозне биолошке течности као што је нпр. урин. Међутим овакав приступ није широко заступљен.

Најчешћи начин припреме ткива органа је њихова хомогенизација у води или одговарајућем пуферу при чему однос воде и пуфера варира. Често се користи један део ткива (најчешће 5 грама) а три дела воде, док је некада тај однос један део ткива а 10 делова воде или пуфера након чега се врши пречишћавање екстракцијом (5).

Некада се у оквиру припреме ткива пре екстракције користи и ензимска дигестија. У ткиво количине најчешће десетак грама се додаје пуфер и протеолитички ензими који на повишеној температури 50-60 степени, у трајању од једног до неколико сати разарају ткиво и тако омогућавају да се у раствору додатог пуфера издвоји аналит који се даље пречишћава екстракцијом.

Многи лекови/дрогe се у својим метаболичким процесима у јетри везују за глукуронску киселину и формирају глукурониде. Како су глукурониди присутни и у циркулацији хидролиза у циљу добијања слободног једињења се може радити не само у узорцима ткива јетре у којима се глукурониди формирају или ткиву бубрега путем кога се глукурониди елиминишу из организма већ и у биолошким течностима (крви, урину, стакластом телу). Хидролиза глукуронида се може вршити или одговарајућим ензимима (бета глукуронидазом) или растворима киселина (најчешће 1 mol хлороводоничном киселином) на различитим температурама (нпр. од 37 -100 степени) и трајању (више сати или у оквиру 30-60 min). Међутим хидролиза киселинама се не препоручује због значајног повећања ометајућих једињења из матрикса и мањег приноса аналита (5).

### 2.3. Масена спектрометрија

Општи појам масена спектрометрија (енг. Mass Spectrometry, MS) означава физичко-хемијску методу која се заснива на претварању испитиваног узорка у јонски сноп и раздвајању тог снопа на саставне компоненте на бази њиховог односа масе и наелектрисања ( $m/z$ ).

Масена спектрометрија као аналитичка техника је изузетно брзо напредовала током последњих деценија. Развијен је велики број метода за увођење узорка и њихову јонизацију; конструисани су нови облици анализатора и врло осетљиви детектора јона; уведени су савремени поступци за обраду података. Као резултат напретка у инструментацији масена спектрометрија је продрла у велики број научних дисциплина и примењује се за решавање разноврсних проблема. У судској токсикологији је незаобилазна техника која се обично користи за квалитативну и квантитативну хемијску анализу.

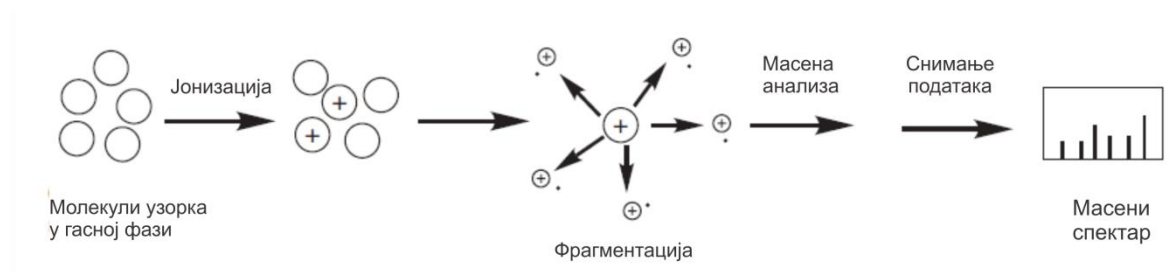
MS мери однос масе и наелектрисања тј.  $m/z$  било ког анализата, органске или неорганске природе, који је претходно јонизован (32).

Широка популарност масене спектрометрије резултат је њених јединствених могућности:

- ненадмашна молекуларна специфичност; мери тачну молекулску масу; пружа информације о структури помоћу фрагмената јона анализата.
- ултрависока осетљивост детекције; до реда величине атомола и зептомола ( $10^{-18}$  и  $10^{-21}$ ).
- неупоредива свестраност за одређивање структуре већине класа једињења.
- применљива је на све елементе.
- применљива је на све врсте узорака: испарљиве или неиспарљиве; поларне или неполарне; чврсте, течне или гасовите. У комбинацији са уређајима за одвајање високе резолуције, јединствена је за анализу сложених узорака из „стварног света“ (33).

### 2.3.1. Основни принципи масене спектрометрије

Основни принцип масене спектрометрије заснива се на превођењу анализата у јоне и детекцији јонске струје коју производе раздвојени јони према односу  $m/z$ . За разлику од неутралних врста, јонима се може лако манипулисати, тј. утицати на брзину и смер њиховог кретања. За контролу кретања јона у масеним анализаторима користе се магнетно и/или електрично поље. Анализа се спроводи у три основна корака (слика 1) :



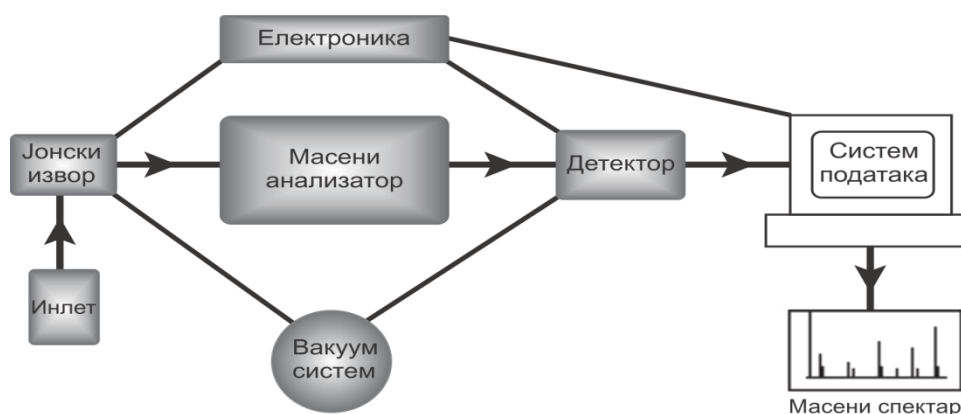
**Слика 1:** Основни концепт анализе у масеној спектрометрији (34)

Први корак је јонизација којом се молекули или атоми анализата преводе у јонске врсте у гасној фази. У овом кораку долази до уклањања или додавања електрона или протона. Вишак енергије који се преноси током јонизације може разбити молекул на карактеристичне фрагменте.

Следећи корак је раздвајање молекулских јона и њихових наелектрисаних фрагмената у масеним анализаторима, на основу односа масе и наелектрисања.

Последњи корак је мерење и појачавање јонских струја које производе јони раздвојени по маси, и њихово приказивање у облику масеног спектра (35).

Основни делови масеног спектрометра прилагођени су обављању наведених функција. Састоје се из једне од многих комбинација следећих основних елемената: а) система за увођење узорка; б) јонског извора; в) масеног анализатора; г) детектора; д) система за обраду података (рачунара); њ) вакуум система (пумпе, уређаји за праћење – мерачи високог вакуума); и е) електронике (27) (36) (слика 2).



Слика 2: Основни делови масеног спектрометра (34)

Као резултат мерења добија се масени спектар. Масени спектар је у ствари дијаграм на коме се на  $x$  оси налази  $m/z$  (однос масе и наелектрисања) а на  $y$  оси обилност насталих јона (енг. *abundance*). Тумачењем масених спектра добијају се информације о молекулој маси, а некада и о структури анализираног једињења.

У зависности од величине молекула, масена спектрометрија даје информације о номиналној, моноизотопној и просечној маси. Информације о номиналној маси и моноизотопској маси добијају се за једињења мале масе, док се за једињења велике масе мери просечна вредност масе.

Узорци за анализу у масеној спектрометрији могу бити у чврстом, течном, гасовитом стању или у облику раствора што захтева различите начине уношења узорка у јонски извор (директно ињектовање или уметање путем различитих носача). Додатни изазов представља и разлика у притисцима; потребно је узорак са атмосферског притиска унети у мањи или већи вакуум. Савремени инструменти располажу обично са два независна вакуум система – први за део за убацивање узорка а други за анализаторски део. Први обично обезбеђују механичке, тзв. грубе пумпе, док се високи вакууми у анализаторима постижу тзв. турбомолекуларним пумпама.

### 2.3.2. Методе јонизације

Јонски извори служе да молекуле или атоме анализата преведу у јоне. То су делови масених спектрометара у којима се одвија процес јонизације анализата пре анализе у масеним анализаторима.

Јонизација анализата је први кључни корак у анализи било које класе једињења масеном спектрометријом. Кључ успешне анализе у великој мери зависи од начина претварања неутралног једињења у јонску врсту у гасној фази. Развијен је велики број техника јонизације али ниједна нема универзалну примену. У неким техникама, јонизација се изводи избијањем или хватањем електрона од стране анализата да би се произвео катјон радикал  $[M^+\bullet]$  или анјон радикал  $[M\bullet^-]$ . У другим случајевима, протон се додаје или одузима да би се добили  $[M+H]^+$  или  $[M-H]^-$  јони. У неким методама се формирају адукти са катјонима алкалних метала (нпр.  $Na^+$  и  $K^+$ ) и анјонима (нпр.  $Cl^-$ ). Избор најпогоднијег начина јонизације зависи од природе узорка и од карактера података који се желе добити.



Раније су се јонски извори налазили искључиво под високим вакуумом у делу масеног спектрометра заједно са масеним анализатором. Међутим развијени су нови извори јона који јонизацију анализата врше на атмосферском притиску. Одатле и једна од подела јонских извора на јонске изворе на ниском притиску, под високим вакуумом и јонске изворе на атмосферском притиску. Јонски извори под високим вакуумом углавном су делови масених спектрометара повезани са гасним хроматографима док се јонски извори на атмосферском притиску најчешће комбинују са течним хроматографима.

Неке од метода јонизације молекулских врста као и притисци на којима се одвијају приказани су у табели 1 (35).

**Табела 1:** Методе јонизације и притисци који се користе

Узорак - фаза	Јонизација молекула	
	Методе јонизације	Притисак
Гас	Електронска јонизација	Високи вакуум
	Хемијска јонизација (CI)	Средњи вакуум
	Фотојонизација (PI)	Високи вакуум
	Јоонизација пољем	Високи вакуум
Раствор	Термоспреј	Ниски вакуум
	Атмосферски притисак (CI)	Атмосферски притисак
	Атмосферски притисак (PI)	Атмосферски притисак
	Електроспреј	Атмосферски притисак
Чврста фаза	Десорпција плазмом	Високи вакуум
	Десорпција пољем	Високи вакуум
	Бомбардовање брзим атомима	Високи вакуум
	Бомбардовање брзим атомима	Високи вакуум
	Матриksom потпомогнута ласерска десорпција	Високи вакуум

Битан фактор у процесу јонизације молекула је и количина енергије која се том приликом користи. Неке технике јонизације су тзв. грубе технике и доводе до интензивне фрагментације. Друге су мекше и производе само или искључиво јоне молекулских врста. Јонизација електронима (енг. *Electron ionization*, EI) хемијска јонизација (енг. *Chemical Ionisation*, CI) и јонизација пољем (енг. *Field Ionization*, FI) су погодне само за јонизацију у гасној фази па је њихова употреба ограничена на

једињења која су довољно испарљива и термички стабилна. Међутим велики број једињења су термолабилна или немају довољан напон паре. За јонизацију ових једињења користи се мање енергије и врста јонских извора који су обично део спрегнутих масених анализатора са течним хроматографима. То су на пример електроспреј јонизација (енг. *Electrospray Ionisation*, ESI), хемијска јонизација под атмосферским притиском (енг. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, APCI), фотојонизација под атмосферским притиском (енг. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI), јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из матрикса под атмосферским притиском (енг. *Atmospheric Pressure - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) (1) (2).

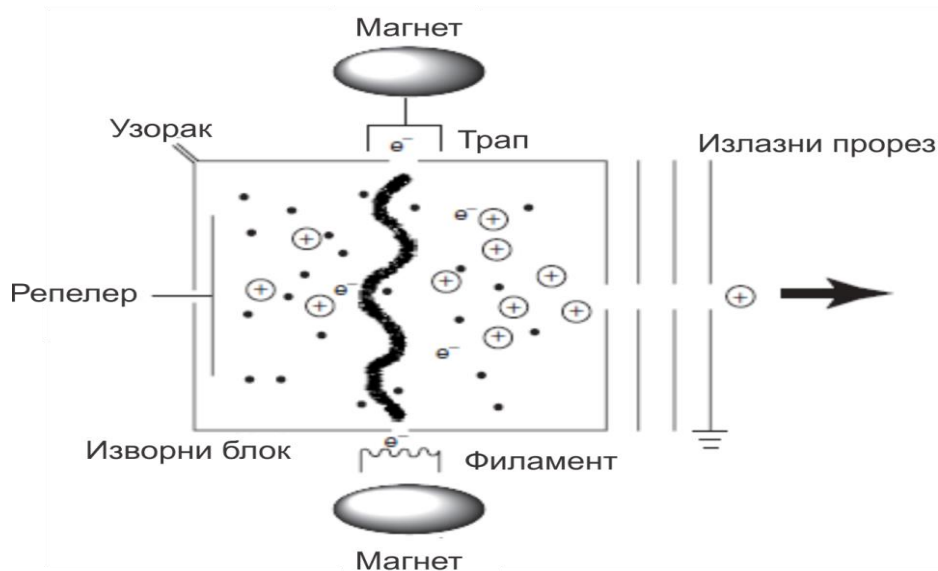
Основне карактеристике јонског извора су: (1) ефикасност јонизације (захтев за високу осетљивост детекције), (2) стабилност јонске струје, (3) ширина енергетског снопа, (4) минимална позадина јонска струја, и (5) минимална унакрсна контаминација између узастопних узорака (37).

Хофман (1) се на занимљив начин бавио принципима рада јонских извора и механизмима реакција молекулских врста у њима. Неке од њих, који ће се користити у овом раду ћемо детаљније описати ради разумевања постављеног циља овог рада.

### 2.3.3. Електронска јонизација

Електронска јонизација (EI) је један од најстаријих начина јонизације, који је први употребио Демпстер 1918. године (2). Најпопуларнији је начин јонизације органских једињења са молекулском масом, мањом од 600 Da (35). Ова техника јонизације ограничена је на термички стабилна и релативно испарљива једињења.

У изворима који се заснивају на овом принципу узорак се уводи у облику млаза гаса или паре под ниским притиском у евакуисану комору под високим вакуумом, где се јонизује интеракцијом са електронским снопом који производи загрејана нит (филамент од ренијумове или тунгстенове жице). Основни елементи извора приказани су на слици 3.



Слика 3: Шематски приказ јонског извора - електронска јонизација (35)

Електрони емитовани са усијане нити убрзавају се разликом потенцијала између нити и првог разреза (на комори), пролазе кроз јонизациону комору и скупљају се на клопци (трапу), који се обично одржава на потенцијалу од око + 20 V у односу на јонизациону комору, да би се спречило ослобађање секундарних електрона. Слабо магнетно поље постављено дуж путање електронског снопа служи за смањивање дивергенције електрона, сакупљајући их у спиралну путању.

Један део молекула интерагује са електронима у јонизационој комори; неки од њих губе један електрон и јонизују се, док се други цепају у јонизоване и неутралне фрагменте. Створени јони се извлаче из јонизационе коморе продором потенцијала са извлачеће електроде или постављањем посебне потискујуће електроде (репелера) у саму комору. Јоне даље убрзава много јаче поље између јонизационе коморе и електрода електростатичких сочива јонског извора, при чему се последња електрода одржава на потенцијалу земље (37).

Раније је било уобичајено да се ова врста јонизације зове и јонизација електронским ударом (енг. *Electron impact*) и објашњава на начин да долази до судара електрона и молекула анализата у гасовитом стању. Међутим у основи овог механизма јонизације је пренос енергије електрона на електроне молекула анализата. При томе не долази до судара између молекула анализата, насталих фрагмената и

електрона па се препоручује избегавање назива јонизација електронским ударом (1) (32). У просеку се на овај начин произведе јако мало јона, један на сваких 1000 молекула (0,1%) који улазе у јонски извор под уобичајеним условима спектрометра од 70 eV. Енергија електрона од 70 eV је много већа од јачине веза уобичајених анализата (око 10-20 eV). На молекуле се током процеса јонизације преноси између 10 и 20 eV. Пошто је отприлике 10 eV довољно да се јонизује већина органских молекула, вишак енергије доводи до екстензивне фрагментације (1) (32). Настали фрагменти мање масе представљају структурне дијагностичке јоне, од којих неки још имају довољно енергије да се даље фрагментују до јона производа друге генерације. Тако добијени образац фрагментације представља дијагностику структуре молекула узорка (35).

Фрагментација молекулских јона се дешава првенствено у региону јонског извора. Ефикасност јонизације и накнадне фрагментације расте са повећањем енергије електрона и достиже плато између 50 и 100 eV; при овим енергијама електрона, ЕИ спектар постаје „отисак прста“ једињења које се анализира. Пошто је маса „изгубљеног“ електрона занемарљива, вредност односа масе и наелектрисања ( $m/z$ ) молекуларног јона је директна мера његове молекулске масе. Молекул коме недостаје један електрон назива се молекулски јон или радикал катјон, а симболично се представља ознаком  $M^{+\bullet}$ . Ове информације се могу користити за идентификацију једињења од интереса чак и у одсуству молекулског јона, и да помогне у разјашњавању структуре непознате компоненте смеша.

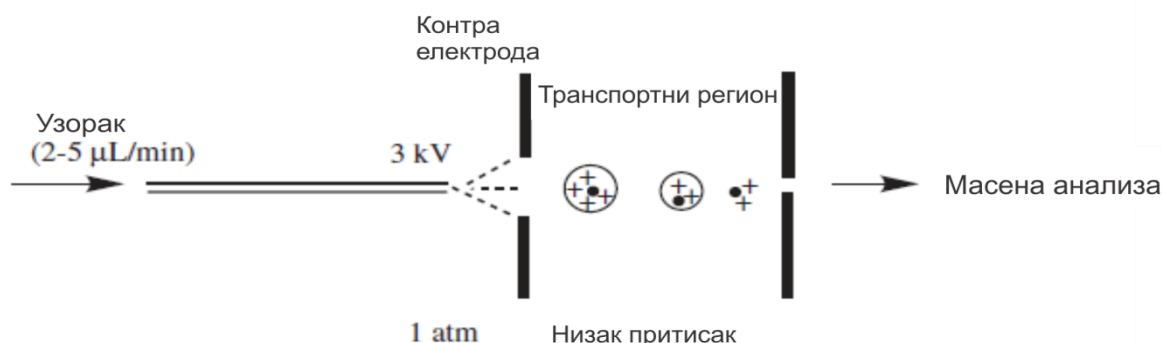
Предности и ограничења електронске јонизације; ЕИ је једноставна за употребу. Обезбеђује спектре („отисак прста“) који се могу претраживати у библиотекама за већину органских једињења, из којих се може закључити молекулска маса и структура циљаног једињења. Неколико спектралних библиотека са преко 100.000 спектралних уноса је комерцијално доступно или им се може приступити преко интернета. Главно ограничење ЕИ је, међутим, захтев да анализи буду доступни као молекули у гасној фази пре јонизације. Ово ограничење чини многа термички лабилна и неиспарљива једињења недоступнима ЕИ. Испарљивост неких једињења може се повећати хемијском дериватизацијом. Још једно озбиљно ограничење ЕИ је

да многа једињења нису стабилна у условима EI. Због веома енергичног процеса, извесни типови молекула се екстензивно фрагментују након EI, са последицом да је пик молекуларних јона или одсутан или је од веома малог значаја у њиховим спектрима. У тим условима, одређивање молекулске масе је изазов. Екстензивна фрагментација такође може да закомпликује тумачење масеног спектра. Корисни опсег масе за једињења која су подложна EI је прилично низак (око <1000 Da) (35).

#### 2.3.4. Електроспреј јонизација

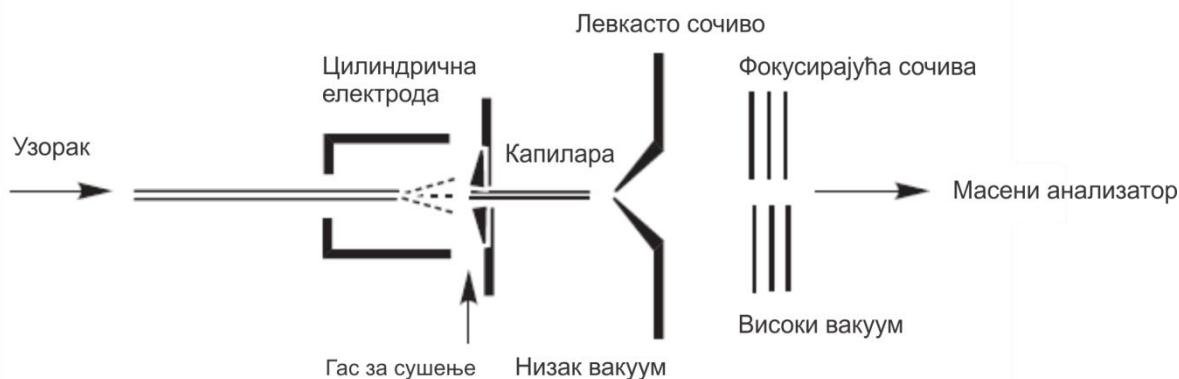
Електроспреј јонизација (енг. *Electrospray Ionisation*, ESI) је једна од најчешће коришћених врста јонизације које се одвијају под атмосферским притиском (енг. *Atmospheric Pressure Ionisation*, API). У почетку се сматрало да је намењена искључиво за јонизацију великих молекула. Касније је његова употреба проширена не само на друге полимере и биополимере, већ и на анализу малих поларних молекула. Почетак успеха ESI везује се за открића *Fenn*-а и сарадника који су показали да могу одредити молекулску масу вишеструко наелектрисаних јона добијених из протеина помоћу инструмената чији је опсег маса ограничен на само 2000 Th. Испоставило се такође да ESI омогућава да се достигне веома висока осетљивост. Поред тога веома лако се повезује са течним хроматографима или капиларном електрофорезом (1).

Електроспреј јонизација је процес у коме долази до финог распршивања високо наелектрисаних капљица под утицајем интензивног електричног поља. Испаравањем растварача наелектрисане капљице прелазе у јоне у гасној фази. Поједностављен приказ процеса у ESI је шематски приказан на слици 4.

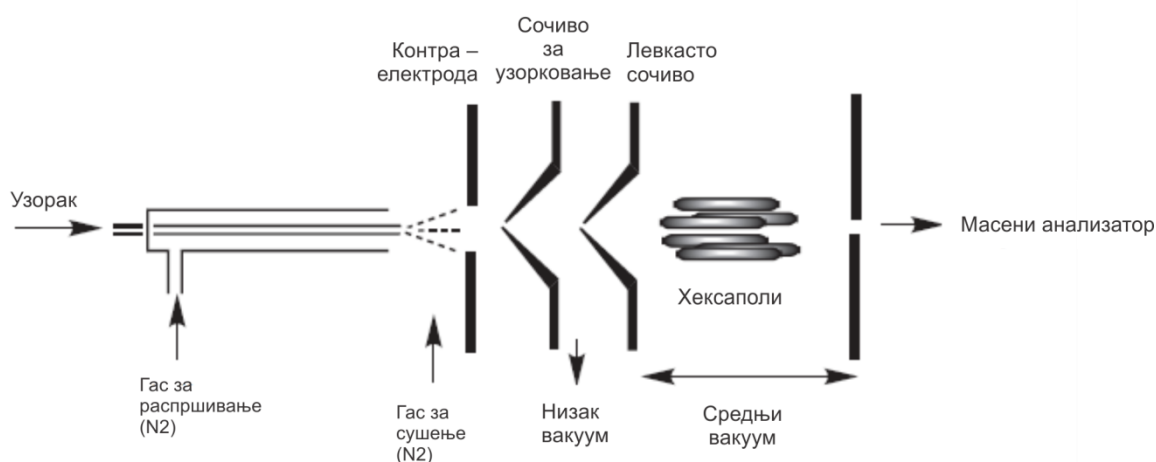


**Слика 4:** Основне компоненте ESI јонског извора (33)

Узорак који се може ручно унети у ESI налази се растворен у неком поларном испарљивом растварачу или се чешће елуира са хроматографске колоне заједно са мобилном фазом. Раствор узорка непрекидно тече кроз капиларну цев од нерђајућег челика чији се врх држи на високом потенцијалу (3-4 kV) у односу на тзв. контраелектроду. Разлика потенцијала између врха капиларе и контраелектроде (размакнуте међусобно око 0,3–2 cm) ствара електростатичко поље које је довољно јако да течни узорак распрши у фину маглу наелектрисаних капљица. Распршивање течног узорка потпомогнуто је гасом за распршивање (енг. nebulizing gas) који пролази кроз капилару заједно са узорком. Испаравање растварача из наелектрисаних капљица и настајање јона олакшано је увошењем струје врућег гаса азота (тзв гаса за сушење, енг. drying gas). Настали јони се транспортују из области атмосферског притиска до области високог вакуума масеног анализатора преко низа делова уређаја у којима се постепено смањује притисак. Најчешће су две комерцијалне верзије транспортних региона ESI извора; први се састоји се од загрејане металне или стаклене капиларе дуге неколико центиметара (приказано на слици 5), а други од левкастих (енг. scimmer) сочива са малим отворима (слика 6). Да би се побољшала ефикасност јонског преноса, радио-фреквентни (rf) мултиполи (квадруполи, хексаполи или октополи) или „јонски левци” се постављају између ESI извора и анализатора масе.



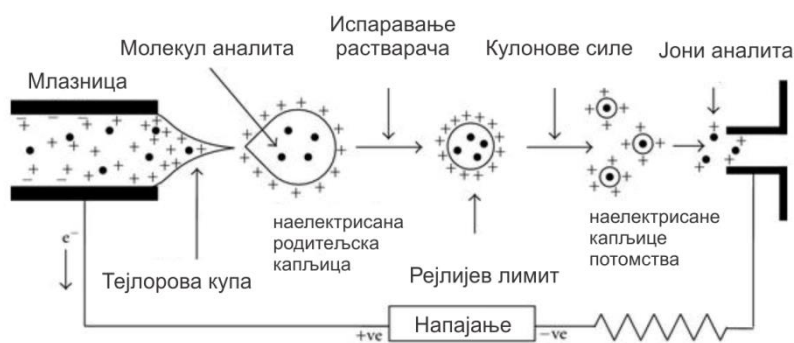
**Слика 5:** ESI јонски извор – са капиларом као транспортером јона (35)



**Слика 6:** ESI јонски извор – са скимерима као транспортерима јона (35)

Процес јонизације електроспрејом може се грубо поделити у три фазе: формирање капљица, смањење капљица (десолватација) и формирање јона у гасној фази. У почетку електростатичке силе на површини течности доводе до прегруписавања наелектрисања. У позитивном режиму рада катјони се концентришу на врху металне капиларе и теже да мигрирају према контра-електроди, док анјони мигрирају према унутрашњости капиларе, даље од врха (слика 7). Наелектрисане капи на врху капиларе тбог тога заузимају издужени облик, облик тзв. Тејлерове купе. Наелектрисане капи потпомогнуте гасом за распршивање (небулајзинг гас) и

гасом за сушење који се уводи у јонски извор испаравају, пречник капљица постаје све мањи, а површинска густина наелектрисања се повећава. Када се достигне тзв. Рејлејева граница, Кулонова одбојна сила између наелектрисања је довољна да се супротстави површинском напону капљице, долази до фисије (цепања, раздвајања) капљица на мање наелектрисане капљице. Ова појава се назива *Colson*-ова експлозија. Процес се наставља, растварач отпарива а наелектрисане капљице постају све мање све до преласка у јоне у гасној фази.



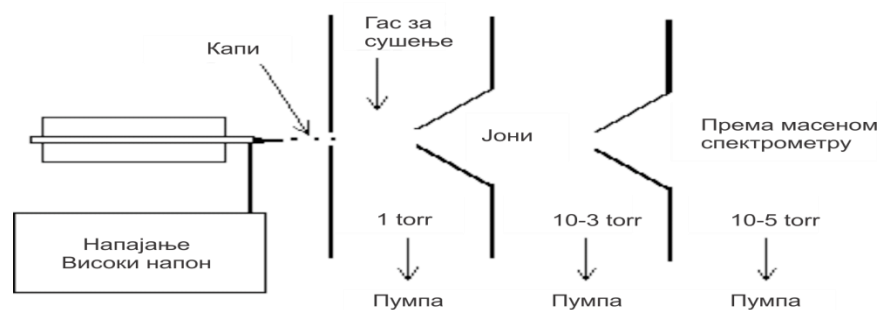
Слика 7: ESI јонски извор – процес настајања јона (36)

Како би се омогућило да сви формирану јони дођу до детектора без судара са другим молекулама гаса, сви масени спектрометри раде под високим вакуумом (низак притисак). Увођење узорка са атмосферског притиска у високи вакуум масеног спектрометра решен је grubим, турбомолекуларним, криогеним или дифузионим пумпама. Грубе, механичке пумпе омогућавају да се добије вакуум од око  $10^{-3}$  Torr а у спрези са другим пумпама може се постићи вакуум и до  $10^{-10}$  Torr што зависи од конфигурације и намене самог инструмента.

Пренос јона из јонског извора који је на атмосферском притиску у масени анализатор који се налази под ниским притиском или високим вакуумом ( $10^{-5}$  Torr) врши се усмеравањем јона кроз мале прорезе тзв. конусе или скимере. Јони кроз ове прорезе прелазе кроз одељке у којима се различитим пумпама постижу одређене вредности вакуума. Обично постоје два средња вакуумска одељка између одељка са извором и одељка у коме се налази анализатор јер је разлика у притисцима прилично велика. Притисци у међувакуумским одељцима се постепено смањују коришћењем



неколико различитих степена пумпи великог капацитета. Јони путују кроз ове мале отворе кроз преграде/одељке од вишег ка nižем притиску да би дошли до одељка анализатора. Овај отвор мора бити довољно широк да омогући увођење што више јона како би се побољшала осетљивост. Али, с друге стране, отвор не сме бити преширок због одржавања исправног вакуума у одељку анализатора. Преносни оптички систем укључујући сочива за фокусирање или вишеполна сочива за фокусирање су обезбеђена у одељцима средњег вакуума за ефикасно убризгавање јона у отворе. Шема интерфејса са атмосферског притиска је илустрована на слици 8.



Слика 8: ESI - интерфејс (1)

Анализа електроспрејом може се вршити у позитивном и негативном режиму јонизације. Подешава се променом напона на капилари. Нова карактеристика ESI масеног спектра је формирање нетакнутих молекуларних јона анализата. Променом напона на конусу за узорковање може се утицати на фрагментацију јона. Овај процес је познат као дисоцијација изазвана колизијом у извору ( енг. *in-source collision-induced dissociation*, CID) или дисоцијација млазница-скимер (*nozzle-skimmer* (NS) *dissociation*).

ESI полимерних врста даје спектар у облику звона који садржи низ вишеструко наелектрисаних јона опште природе  $[M + nH]H^+$  или  $[M - nH]H^-$ . Сваки пик у том спектру разликује се од свог суседа за једно наелектрисување. Пошто масени спектрометар анализира јоне на основу њихових  $m/z$  односа, а не на њиховој стварној маси, вишеструко наелектрисување омогућило је анализу једињења велике масе чак и са обичним масеним спектрометрима ограниченог опсега масе.

Спајање ESI извора са квадруполним анализатором масе је најуспешнија ESI-MS комбинација. Од развоја ортогоналне екстракције јона у TOF анализаторима масе, спајање ESI са TOF-MS је такође постало могуће. Постоји и друге успешне комбинације, нпр. ESI-QIT, ESI-LIT, ESI-Orbitrap и ESI/FT-ICRMS. Постоји невиђен распон једињења који се могу анализирати коришћењем ових ESI-MS система. Ова листа укључује протеине, пептиде, лекове и метаболите лекова, клиничке узорке, нуклеотиде, олигонуклеотиде, адукте ДНК, олигосахариде, синтетичке полимере, органометале, загађиваче животне средине и многа друга једињења.

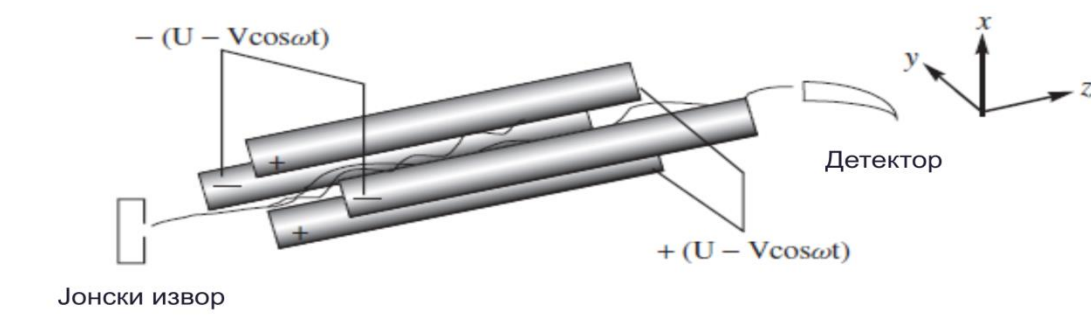
### 2.3.5. Масени анализатори

Масени анализатор је основни део масеног спектрометра, јер се помоћу њега остварује примарна функција масене анализе - раздвајање појединих маса из јонизованог узорка и омогућавање мерења њихових обилности. Масени анализатор има, дакле, двоструки задатак: да одвоји јоне масе  $m$  од јона блиске масе  $m + \Delta m$  и да, затим, фокусира издвојени сноп јона. Ове функције се остварују дејством електричних и магнетних поља, која у овом случају преузимају улогу призми и сочива у оптичкој спектроскопији. У литератури је описан велики број различитих врста масених анализатора, али ширу примену налазе следећи типови: магнетни анализатор с једноструким фокусирањем, анализатори с двоструким фокусирањем, анализатори на бази времена прелетања (Time-of-Flight, TOF), квадруполни анализатори и јонски трап.

### 2.3.6. Квадруполни масени анализатор

Квадруполни масени анализатор, кога су усавршили Paul (Paul) и његови сарадници 1953. године, заснива се на осцилацијама јона при проласку кроз аксијално симетрично радиофреквентно поље (слика 9).

Дводимензионално квадруполно поље успоставља се између четири цилиндричне или хиперболичне шипке, суперпонирањем једносмерног  $U$  и радиофреквентног потенцијала  $V_{\text{cosat}}$  на шипке.



Слика 9: Шема квадруполног анализатора (35)

Масени спектар се добија променом фреквенце наизменичног напона  $\omega$  или истовременим мењањем  $U$  и  $V_0$ , одржавајући при томе њихов однос константним. Ако се високофреквентни потенцијал искључи, линија скенирања се поклапа са апсисом и све масе се скупљају, што омогућава лако мерење укупне јонске струје. На стабилност осцилације јона не утичу правац и брзина уласка јона у квадруполно поље, па, према томе, није неопходно имати улазни прорез који би дефинисао облик јонског снопа. Међутим, ако су брзине јона сувише велике, само мали број осцилација се остварује и карактеристике инструмента се погоршавају. Само јони одређене  $m/z$  вредности имају стабилну путању и стижу до детектора док се остали разелектришу на шипкама.

Најозбиљнија експериментална тешкоћа при конструкцији овог анализатора састоји се у прављењу униформних шипки електрода и њиховом врло прецизном постављању, тако да не одступају од неколико микрометара. Међутим, релативно једноставна конструкција, кратко време скенирања (мање од 100 милисекунди), ниска цена и компактност у поређењу с магнетским анализатором допринели су да су квадруполни анализатори постали врло популарни последњих година.

### 2.3.7. Масени анализатори на бази времена прелетања

Код анализатора на бази времена прелетања (*Time of Flight, TOF*) јони различитих маса се раздвајају тако што добијају исту почетну енергију при којој јони

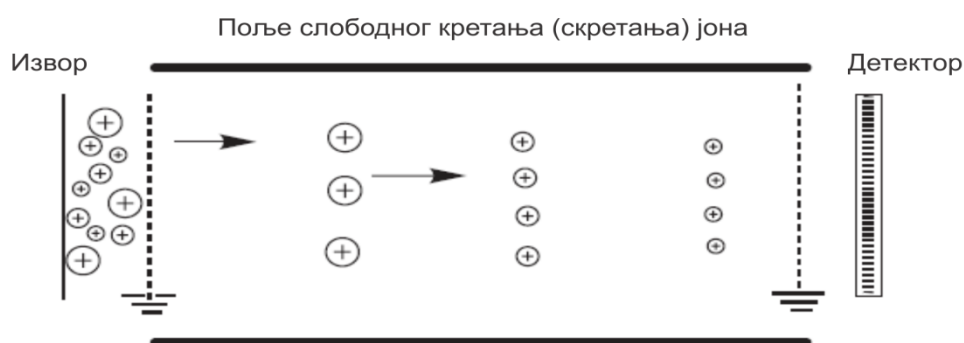
различитих маса имају различите полазне брзине. При томе је растојање које јони треба да пређу фиксно, тако да време прелетања зависи од масе молекула. Лакши јони ће путовати брже и стићи од извора до детектора за краћи временски период.

Проласком кроз разлику потенцијала  $U$ , јони масе  $m$  добијају кинетичку енергију  $E_k = mv^2/2 = eU$ , док је њихово време прелетања растојања  $d$  између извора и детектора једнако  $t = d/v$ . Одатле је,  $t = d(m/2eU)^{1/2}$ .

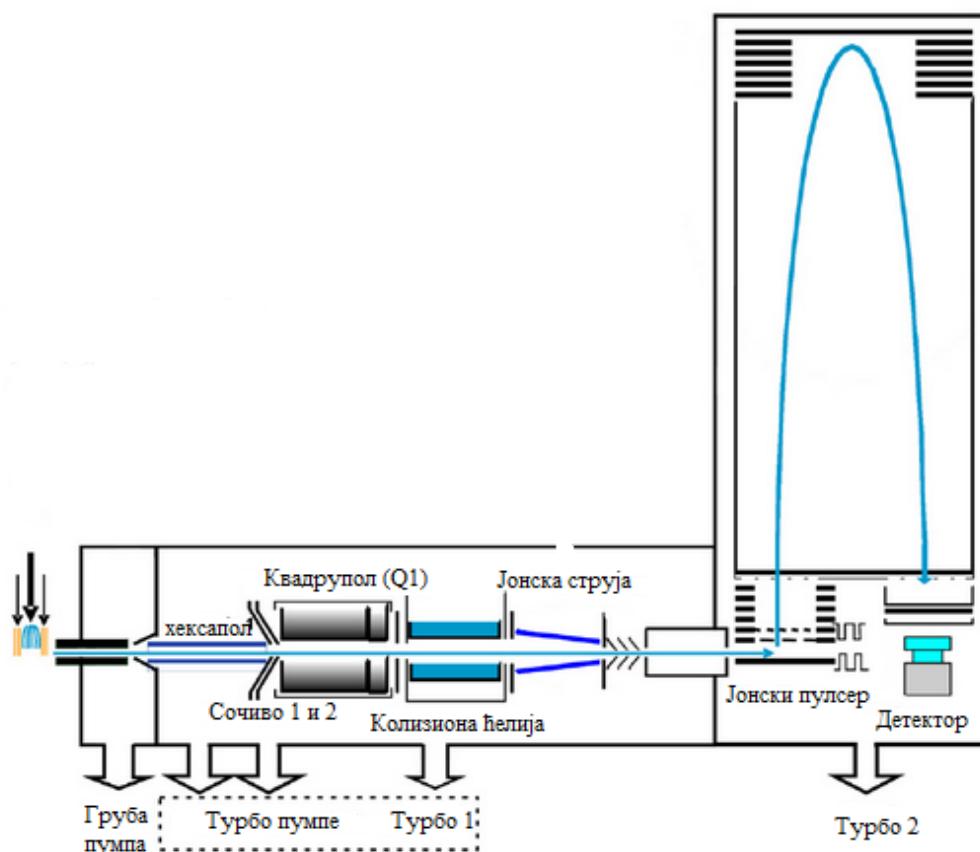
Ако се  $d$  и  $U$  одржавају константним, онда је:

$$t = k(m/e)^{1/2} \quad (1)$$

На тај начин време прелетања јона пропорционално је квадратном корену односа њихове масе и наелектрисања, а детектор региструје "пакете" јона који су раздвојени по времену прелетања (слика 10). На слици 11 је приказана комбинација TOF-а и квадрупола који омогућава MS/MS анализу.



Слика 10: Поједностављена шема TOF масеног анализатора (35)



Слика 11: Поједностављена шема QTOF-MS масеног анализатора (38)

### 2.3.8. Детектори јона

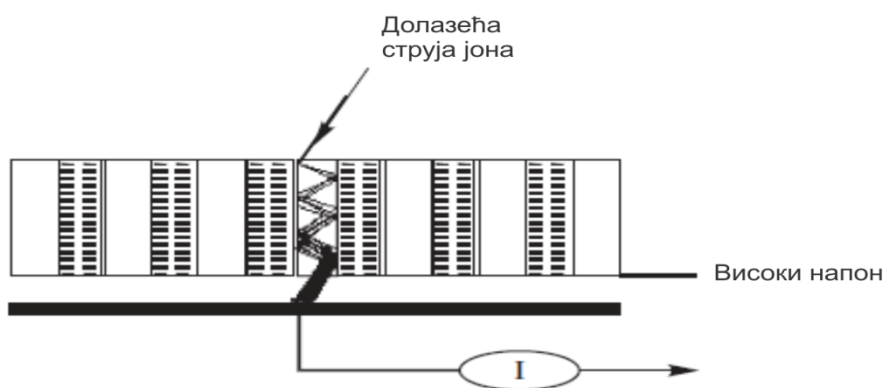
Детектор даје информације о токовима јона или обиљу јона након њиховог изласка из масених анализатора. Детектор претвара снап јона у електрични сигнал који систем података може појачати, ускладиштити и приказати у облик који је лако уочљив људском оку. Осетљивост, тачност, резолуција, време одзива, стабилност, широк динамички опсег и низак ниво шума су најважније карактеристике које се траже у сваком детектору јона.

Детекција се најчешће изводи електричним путем, тако што се мери абунданца – укупна јонска струја. Када су абунданце мале јачине ( $10^{-9} - 10^{-6}$  А), користе се разни једносмерни електрични појачивачи (енг. amplifier), фотомултипликатори (енг.

photomultiplier conversion dynode), електронски мултипликатор (енг. electron multiplier) и динамички кондезатори (енг. vibrating – reed electrometer).

Први масени спектрометри за детекцију су користили фотографске плоче, међутим, сада се готово искључиво користе фотомултипликатори код којих сваки удар јона у катоду изазива избијање електрона који се затим у електричном пољу убрзавају и ударају у фотоосетљиву электроду, диноду (диноде су обично издубљене површине да би се сви секундарни електрони фокусирали под дејством електричног поља), где долази до избијања двоструко већег броја електрона. Ови електрони поново се убрзавају и усмеравају у правцу друге диноде, која је на вишем потенцијалу од претходне. Овај поступак понавља се каскадно тако да се на крају ланца добије читава лавина електрона, који при удару у аноду, даје електрични импулс који се даље електронским путем појачава. Број динода може бити различит (10 и више), а повећање примарне фотострује је реда величине  $10^{12}$ . Највећа осетљивост постиже се при напону од око 3000 V, али овако висок напон скраћује век трајања детектора.

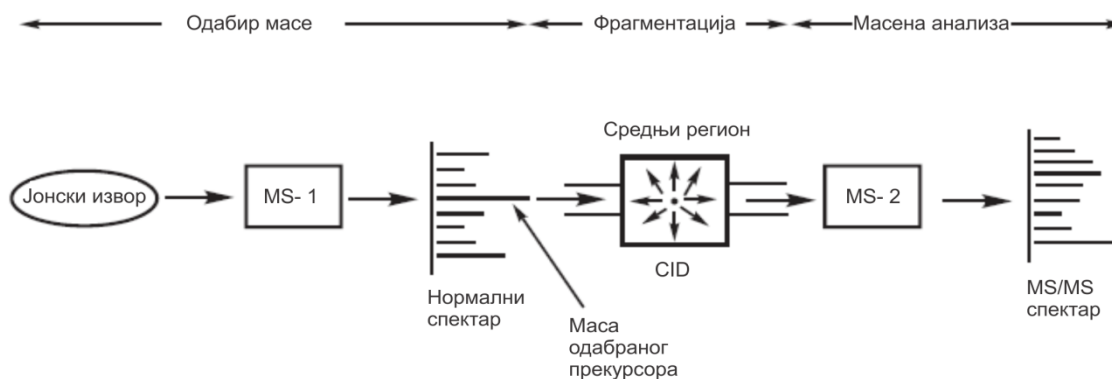
Микроканалски плочасти електронски мултипликатор (енг. Microchannel Plate Electron Multipliers, MCP ) састоји се од танке плоче која садржи низ малих ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) канала (слика 12). Јони улазе кроз било који канал, ударају о зид плоче при чему се емитују електрони који се крећу до следеће плоче и тако редом. Повећање примарне струје, које се постиже применом једне плоче је реда  $10^5$ , а применом више плоча може се постићи повећање струје до  $10^8$  пута. Овај тип детектора се најчешће користи у анализаторима на бази времена прелетања (TOF) (33).



Слика 12: Шематски приказ микроканалског плочастог електронског мултипликатора (35)

## 2.4. Тандем масена спектрометрија

Тандем масена спектрометрија, скраћено MS/MS, је било која метода која укључује најмање два корака анализе масе, било у спрези са процесом дисоцијације или у хемијској реакцији која изазива промену масе или наелектрисања јона (1). У тандем масеној спектрометрији први анализатор се најчешће користи да изолује прекурсор јон (енг. precursor ion), који се затим спонтано или неком активацијом подвргава фрагментацији да би се добили јони производа (енг. product ions) и неутрални фрагменти:  $m_p + \rightarrow m_f^+ + m_n$



Слика 13: Основни принцип тандем масене спектрометрије (35)

Други спектрометар анализира продукт јоне. Принцип је илустрован на слици 12. Могуће је и повећати број корака: изабрати масу првог јона, затим масу другог јона добијених фрагмената и онда анализирати фрагменте касније одабраних јона. Ово се означава као MS/MS/MS или MS<sup>3</sup> експеримент. Број корака се може повећати да би се добили MS<sup>n</sup> експерименти (где се n односи на број генерација јона који се анализирају).

#### 2.4.1. Тандем масена спектрометрија у простору и времену

У основи, тандем масени спектрометри се могу замислити на два начина: извођење тандем масене спектрометрије у простору спајањем два физички различита инструмента, или у времену обављањем одговарајућег низа догађаја у уређају за складиштење јона. Према томе постоје две главне врсте инструмената у којима се могу вршити експерименти тандем масене спектрометрије: тандем масени спектрометри у простору или у времену. Уобичајено инструменти у простору имају два анализатора масе, који омогућавају извођење MS/MS експеримената. Најчешће се код овог типа инструмента користе квадруполни анализатори маса (енг. Quadrupoles, QqQ). Конфигурација QqQ означава инструмент са три квадруполоа где је други, означен малим словом q, део у коме се одвијају реакције. Први ради само у RF режиму и тако делује као сочиво за све јоне. Други инструменти комбинују електричне и магнетне секторе (E и B) или E, B и qQ, дакле електрични, магнетни сектори и квадрупол. TOF инструменти са рефлектроном, или комбинација квадруполоа са TOF инструментом, се такође користе.

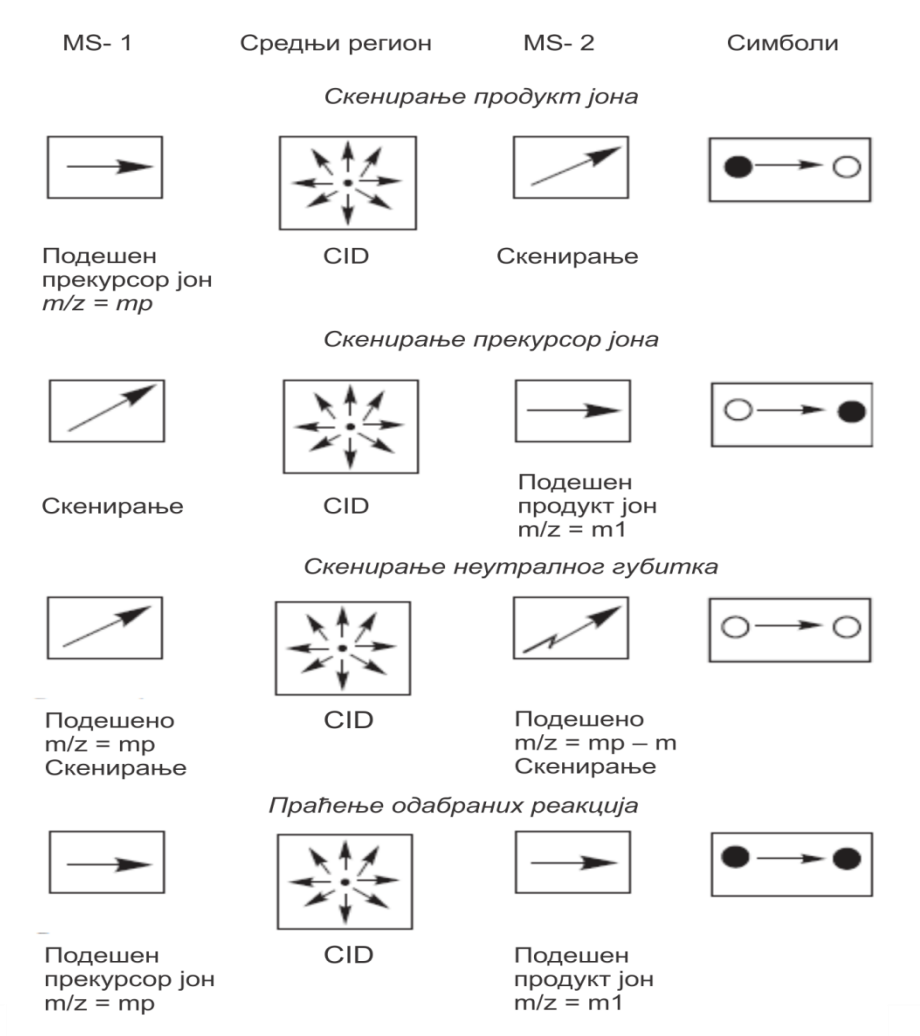
За добијање спектра вишег реда MS<sup>n</sup> потребно је комбиновати n анализатора, повећавајући сложеност а самим тим и цену спектрометра. Узастопни анализатори могу бити распоређени на било који број, али зато што је удео јона који се преносе у сваком кораку низак, практични максимум је три или четири анализатора у случају инструмената са снопом. Поред ове методе просторног раздвајања коришћењем узастопних анализатора, тандем масена спектрометрија се такође може постићи кроз временско одвајање са неколико анализатора као што је јонске замке, орбитрап и FTICR, програмирани тако да се различити кораци сукцесивно изводе у истом



инструменту. Максималан практични број корака за ове инструменте је седам до осам.

### 2.4.2 Тандем масена спектрометрија – начини скенирања

Четири главна режима скенирања коришћењем тандем масене спектрометрије приказана су на слици 14. Могући су и многи други режими MS/MS скенирања, али је у овом случају фокус на фрагментације који се јављају са инертним колизионим гасом.



Слика 14: Начини снимања у MS

1. Скенирање продукт јона (скенирање ћерка јона) састоји се од одабира јона прекурсора (или родитељског јона) изабраног односа масе и наелектрисања и одређивање свих производних јона (ћерка јони) који су резултат CID -а дисоцијације изазване сударом (collision-induced-dissociation, CID). Ако се реактивни гас користи у колизионој ћелији, прате се CAR продукти реакције активирани сударом (collision-activated-reaction CAR). Када се производе само јони фрагмената, овај режим скенирања се такође назива и „скенирање фрагмент јона“ ‘fragment ion scan’.

2. Скенирање прекурсор јона састоји се од избора продукт јона и одређивање јона прекурсора (или матичних јона). Овај метод се назива „прекурсор“. скенирање“ јер су идентификовани „јони прекурсора“. Овај режим скенирања се не може изводити са масеним спектрометрима заснованим на времену. Ово скенирање захтева фокусирање другог спектрометар на изабраном јону док скенира масе помоћу првог спектрометра.

3. Скенирање неутралног губитка састоји се од одабира неутралног фрагмента и откривања свих фрагментација које доводе до губитка тог неутралног. Као и у случају скенирања прекурсора јона, овај режим скенирања није доступан код масених спектрометара заснованих на времену. Ово скенирање захтева да оба масена спектрометра скенирају заједно, али са константним помаком масе између два. Дакле, за разлику масе  $a$ , када јон масе  $m$  прође кроз први масени спектрометар, детекција се дешава ако је овај јон произвео фрагмент јона масе  $(m - a)$  када напусти колизиону ћелију.

4. Мониторинг селектоване реакције (SRM) састоји се од одабира реакције фрагментације. За ово скенирање, и први и други анализатор су фокусирани на одабране масе. Овде нема општег скенирања. Метода је аналогна праћењу одабраних јона у стандардној масеној спектрометрији. Али овде се само детектују јони одабрани првим анализатором масе ако произведу дати фрагмент, одабраном реакцијом. Одсуство скенирања омогућава фокусирање на прекурсоре и фрагментацију јона током дужег времена, повећавајући осетљивост за праћење одабраних јона. Повећану осетљивост прати и високо повећање селективности.

### 2.4.3. Колизијом изазвана дисоцијација – CID

Тандем масена спектрометрија подразумева фрагментацију прекурсор јона селектованих у првом анализатору и анализу продукт јона у другом анализатору. Јони који излазе из извора могу се класификовати у три категорије. Прва категорија јона, са животним веком већим од  $10^{-6}$  s, достиже детектор пре него што дође до било какве фрагментације. Друга категорија, са животним веком мањим од  $10^{-7}$  s, фрагментује се пре напуштања извора и детектују се само фрагменти. Последња категорија, названа метастабилни јони, има средњи животни век. Ови јони су стабилни довољно да их први анализатор одабере и садрже довољан вишак енергије да дође до њихове фрагментације пре него што стигну до другог анализатора. Вероватноћа повезана са овом појавом је релативно ниска (1%) јер је њихов број мали и проводе веома кратко време у реакционом региону. Ако се јони прекурсора подвргну колизионој активацији (CA), повећава се њихова унутрашња енергија која индукује њихову разградњу, тако да је горе описана ситуација знатно побољшана. Ова техника декомпозиције активираних колизијом (CAD), такође позната као дисоцијација изазвана сударом (CID), омогућава да се повећа број прекурсор јона који се фрагментују у реакционом региону а такође и број путева фрагментације. Структурна анализа тако постаје лакша. CID је процес који се одвија у два корака. Први корак је веома брз ( $10^{-14}$  до  $10^{-16}$  s) и одговара колизији између јона и циљаног анализата када се део транслационе енергије јона претвара у унутрашњу енергију, доводећи јон у побуђено стање. Други корак је унимолекуларна разградња активираних јона. Принос од судара тада зависи од вероватноће распада јона активираних прекурсора према теорији квазијекулибријума, која се заснива на четири претпоставке:

1. Време дисоцијације јона је дуго у односу на време формирања и време ексцитације.
2. Брзина дисоцијације је ниска у односу на брзину прерасподеле енергије побуде између свих унутрашњих модова јона.
3. Јон постиже унутрашњи равнотежни услов где је енергија распоређена са једнаком вероватноћом међу свим унутрашњим модовима. Узимајући у обзир да јон

са  $N$  нелинеарних атома има  $3N - 6$  модова вибрација, лако је разумети како се принос судара смањује на начин да је обрнуто пропорционалан маси јона.

4. Уочени производи дисоцијације су резултат низа компетитивних и узастопних реакција.

Као последица ових претпоставки, CID је 'ергодични' метод активације јона, који омогућава прераспodelу енергије у вибрационим модовима јона јер је брзина дисоцијације спорија од брзине рандомизације енергије. У овим условима, путеви фрагментације зависе од количине депоноване енергије, а не од коришћеног метода активације јона. Како је енергија распоређена са једнаком вероватноћом између свих унутрашњих модова јона, ово води првенствено до места цепања на најслабијим везама. Из истог разлога, молекулима са више атома ће бити потребно више енергије или више времена да се раздвоје. Савремене технике јонизације омогућавају производњу јона са једињењима високе молекулске тежине. Због тога друге методе активације јона које се сада развијају повећавају пренос енергије. Постоји неколико метода које активирају јоне путем судара. Најчешћи се састоји од судара убрзаних јона ниске или високе енергије са молекулима гаса као непокретним метама. Да би се постигла колизиона активација у MS/MS инструментима са просторно одвојеним анализаторима, колизиона ћелија се поставља између два анализатора масе. Ова ћелија често једноставно одговара малој комори са улазним и излазним отворима и садржи инертни циљни гас под притиском довољним да дође до судара са јонима. У MS/MS инструментима заснованим на временски одвојеним корацима анализе масе, инертни гас се једноставно уводи у комору или замку јона.

## 2.5. Хемијска идентификација

Хемијска идентификација се дефинише као означавање, додељивање имена неког од познатих хемијских једињења или групе/класе једињења аналиту који се испитује на основу подударача њихових особина. Реч идентификација потиче од латинске речи *identificare* што значи „... препознати биће, утврдити идентитет некога или нечега“ (39).

Идентификација анализата треба да се разликује од његове детекције, која је заправо добијање аналитичког сигнала без препознавања његове праве природе (идентитета). Процедуре детекције и идентификације су део квалитативне хемијске анализе која је као област аналитичке хемије већ дуго у сенци квантитативне анализе чије се обезбеђење квалитета сматра најважнијим задатком у хемијској метрологији. Међутим показало се временом да је обезбеђење квалитета потребно за хемијску анализу у целини, нарочито у обласитима као што су судска токсикологија и антидопинг контрола (40).

### 2.5.1. Идентификација у масеној спектрометрији

Масена спектрометрија је кључна техника за квалитативну хемијску анализу. То показује и чињеница да се као резултат претраге путем *Google Scholar-a* појмови „идентификација“ и „масена спектрометрија“ појављују заједно у више од милион научних радова (41).

Разлог за то је појава нових, напредних хибридних техника, велике моћи резолуције које стављају MS у супериорнију позицију у односу на друге аналитичке технике како у погледу осетљивости, селективности, могућности карактеризације једињења молекулском масом или формулом тако и због могућности комбиновања са хроматографским техникама. Гасни или течни хроматографи као улазни уређаји у масене спектрометре раздвајају анализе из сложених смеша хемијских једињења или матрикса за њихову накнадну детекцију и идентификацију (41).

Напредак у области масене спектрометрије и потреба за тумачењем масених спектра добијених различитим техникама јонизације, праћењем одговарајућих селектованих реакција, увођење масене спектрометрије високе резолуције у рутински рад довела је до потребе за успостављањем критеријума за идентификацију. У последњих десетак година виде се помаци у виду смерница у различитим областима примењене масене спектрометрије. Ради се и на успостављању критеријума у циљу идентификације једињења и у области токсикологије мада за сада још увек не постоји званични документ који дефинише овај проблем. Међутим критеријуми за идентификацију у масеној спектрометрији у било којој области требало би да буду

исти. Због тога су предложене смернице које су до сада дате корисне и за област токсикологије.

Према смерницама за форензичке лабораторије (енг. SOFT/AAFS Forensic Laboratory) иницијално детектовану дрогу или други токсин требало би потврдити увек када је то могуће другом аналитичком техником која се заснива на различитим хемијским принципима. Препорука је да се као потврдна техника користи масена спектрометрија увек када је то могуће (42). Европска унија (енг. EU) је дала смернице за карактеристике аналитичких метода и интерпретацију добијених резултата које би требало користити у поступку контроле производа животињског порекла на присуство резидуа ветеринарских лекова (43). Описане су карактеристике и захтеви које је потребно испунити и када је у питању идентификација односно потврда присуства резидуе савременим методама масене спектрометрије, тандемским техникама ниске и високе резолуције маса. Успостављени су критеријуми бодовања изражени као тзв. идентификационе тачке (енг. Identification Points, IP) који се приписују коришћеним техникама у поступку идентификације и сабирају како би се кроз број добијених информација обезбедила поуздана и објективна идентификација одређене супстанце (Табеле 2 и 3). Смернице за критеријуме идентификације постоје и у области антидопинг контроле које је дала светска анти-допинг агенција (скр. WADA) (44) (45). Међутим у области токсикологије постоје нацрти стандарда (46) (47) којима се такође уводе критеријуми за идентификацију анализата узимајући у обзир најновији напредак у спектрометрији масе. Maralikova у свом раду скреће пажњу на непостојање критеријума за идентификацију анализата у токсикологији методом LC-MS/MS (48). Критеријумима за идентификацију бави се и Rivier у прегледном раду (45). Многи суштински аспекти идентификације разматрани су и у књизи аутора Borisa Milmana објављеној 2011. године (39).

**Табела 2:** Највише дозвољене толеранције за релативне интензитета јона код различитих техника масене спектрометрије

Релативни интензитет (% основног пика)	EI-GC-MS (релативни)	EI-GC-MS, GC-MS <sup>n</sup> LC-MS, LC-MS <sup>n</sup> (релативни)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % до 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % до 20 %	± 20 %	± 30 %
> 10 %	± 50 %	± 5 %

**Табела 3:** Однос између различитих врста масених фрагмената и зарађених идентификационих тачака

Технике масене спектрометрије	Идентификационе тачке зарађене по јону
LR-MS	1,0
LR-MS <sup>n</sup> прекурсор јон	1,0
LR-MS <sup>n</sup> транзициони продукт јон	1,5
HR-MS	2,0
HR-MS <sup>n</sup> прекурсор јон	2,0
HR-MS <sup>n</sup> транзициони продукт јон	2,5

### 2.5.2. Токсиколошка анализа психоактивних супстанци

Токсиколошка анализа биолошког материјала на присуство психоактивних супстанци у судској токсикологији је важан корак у доношењу закључака од медицинског и правног значаја. Нема значајне разлике у аналитичком приступу приликом анализе новодизајнираних молекула (49). Постоји отежавајућа околност у смислу недостатка аналитичких стандарда и база података са снимљеним спектрима ових једињења. Такође за већину ових једињења не постоје подаци о метаболичком профилу који је кључан у анализи биолошког материјала.

Приликом анализе психоактивних супстанци најпре се раде прелиминарни имунхроматографски тестови у урину, уколико је доступан. Ови тестови најчешће обухватају десет до 15 параметара дрога/лекова (45). За новодизајниране дроге постоји ограничен број прелиминарних тестова. Други корак је потврдна анализа, методама масене спектрометрије. Поуздана идентификација једињења у биолошком

материјалу је основна и најважнија. Након тога следи квантитативна анализа и тумачење добијеног резултата.

Специфичност токсиколошке анализе лежи у томе што аналитичар често не зна шта тражи а потребно је да недвосмислено потврди или одбаци постојање страних супстанци у биолошком материјалу (50). Да би се обезбедили валидни аналитички докази потребно је успоставити и спроводити нека основна правила која се тичу самих аналитичких метода и тумачења добијених резултата (45). Као резултат напретка у инструменталним методама, ранији концепт референтних метода замењен је критеријумима за прихватање (51).

Од укупно процењених 16 милиона једињења сматра се да је 8000 токсиколошки значајно (52). Због тога се у токсиколошким лабораторијама развијају методе за тзв. системску анализу или токсиколошки скрининг којим би се обухватило што више једињења и методе за циљану анализу кад је аналит познат.

С обзиром на број токсиколошки значајних једињења које је потребно анализирати и њихову хемијску разноврсност јасно је да не постоји једна метода којом би се обухватиле све супстанце од интереса. Најчешће се за токсиколошки скрининг користе гасна хроматографија са масеном спектрометријом и течна хроматографија са PDA детектором (HPLC-PDA) (53). Међутим не постоји ни начин да се само снимањем UV/VIS спектра или масеног спектра изврши идентификација непознатог једињења (54). Због тога су за ове технике развијене велике базе података (55), (56), (57), (58) са снимљеним спектрима које служе за поређење са спектрима добијеним у рутинском раду. Једноставно поређење са базом података потребно је поткренити и паралелним снимањем референтних стандарда ради потврде времена заджавања аналита у хроматографској колони. Недостатак аналитичких стандарда као и непостојање једињења у бази података отежавају овај приступ.

За токсиколошки скрининг користе се и методе LC-MS/MS и GC-MS/MS али је њихова употреба ограничавајућа на број једињења која су обухваћена скринингом.

Коришћење масених спектрометара високе резолуције са анализаторима на бази времена прелетања са масеном резолуцијом > 10 000 и масеном тачношћу <5 ппм, отворило је нове могућности за систематску токсиколошку анализу (59), (60),



(61), (62), (63), (64), (65), (66), (67), (68). Овом методом добијају се подаци о тачној маси једињења са високом поузданошћу, хемијска формула, изотопска расподела а у комбинацији са масеним спектрометром (LC-QTOF/MS) и прецизне масе насталих фрагмената. Користећи базе података или анализом добијених фрагмената овом методом је могуће извршити идентификацију непознатог једињења (69).

## 2.6. Конформациона анализа

Највише коришћене теоријске методе у молекулском моделовању су 1) *abinitio* методе; 2) теорија одбијања електронског пара валентне љуске; 3) методе молекулске механике (ММ); и 4) семи емпиријске молекулско орбиталне методе (70).

Главна претпоставка у молекулској механици је да се супстанца састоји из “атома” са потенцијалном енергијом колекције атома за сваки сет позиција. Заједно, третира се као механички систем који се креће са потенцијалном енергијом и предмет је једначине Њутна и Шредингера (71).

### *AMBER*

Главно коришћење AMBER-а је у области протеина и нуклеинских киселина (72). Ефекат поларизабилности молекула је инкорпориран у AMBER израчунавање укупне енергије, где су индуковани моменти у интеракцији са фиксним наелектрисањима и немеђусобно (веза, угао, диједар, *van der Waals*-ове силе, електростатика, поларизационе компоненте у израчунавању укупне енергије) (70).

### *MMFF*

Прва публикована MMFF верзија је названа MMFF94. MMFF94 прави значајне апроксимације у третирању важних физичких интеракција. Примарно је његово коришћење у молекулској динамици, а онда у оптимизацији енергије. По форми је слично MM2 и MM3 (70).

## 2.7. Психоактивне супстанце

Употреба дрога довела је до смртог исхода скоро пола милиона људи у 2019. години, док су последице на здравље утицале на губитак 18 милиона година здравог живота, углавном због опиоида (73). Током 2020. године, око 275 милиона људи је користило дрогу, што је у односу на 2010 за 22 одсто више (73). Појава нових психоактивних супстанци на тржишту дрога је непредвидива али и у сталном порасту.

### 2.7.1. Хероин – злоупотреба

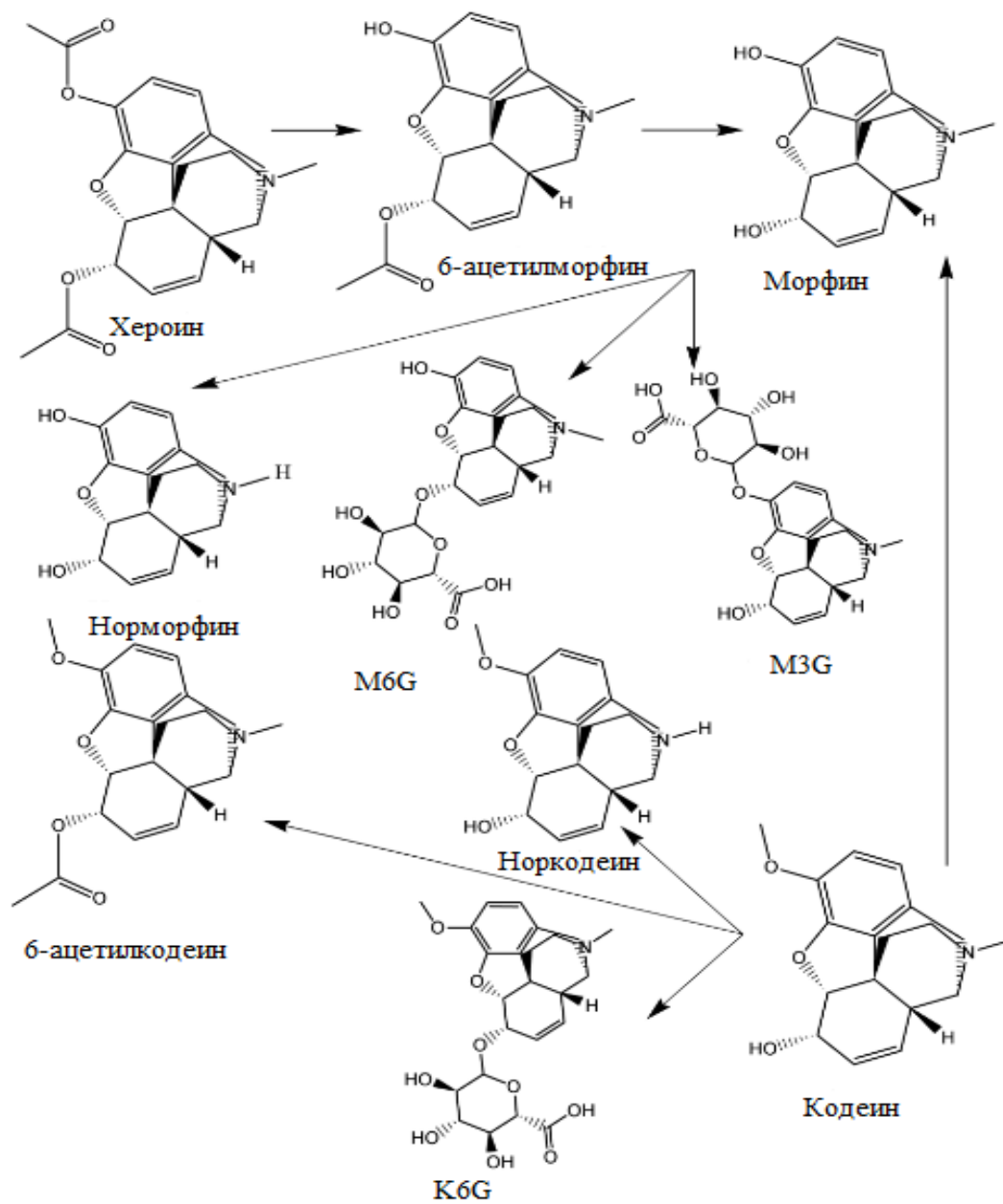
Злоупотреба хероина има дугу историју, али је и данас актуелна и забрињавајућа. На глобалном тржишту дрога годишње циркулише између 430 и 460 тона хероина (74). Хероин је и даље један од водећих узрока смрти изазваних опиоидима (75). Изазива и психичку и физичку зависност па су корисници приморани на лечење у већем броју у односу на конзументе других психоактивних супстанци. Корисници развијају и толеранцију и физичку зависност. Мозак зависника се током времена прилагођава на присуство хероина захтевајући све више супстанце да би се произвео исти ефекат. Услед тога долази до озбиљних здравствених проблема (криза) ако се хероин не узима у довољној количини. Разлика између смртоносних и рекреативних доза је мала док је варијација у чистоћи уличног хероина велика, тако да лако долази до предозирања. Додатно, хероин је дрога која се највише повезује са коришћењем ињекција (интравенско уношење), што доводи до мноштва акутних и хроничних здравствених проблема, укључујући пренос болести као што су HIV/AIDS и хепатитис С (74).

Хероин је полусинтетски дериват морфина. Познато је да се производи из опијумског мака (*Papaver somniferum*) ацетиловањем хидроксилних група морфина на позицијама 3 и 6 фенантренског прстена (76), (77). Опијум из мака поред морфина садржи и друге алкалоиде кодеин, тебаин, папаверин, нарцеин, носкапин, меконин, хидрокотарнин. Неки од њих као што су кодеин и тебаин се такође ацетиљују приликом производње хероина из опијума и настају ацетиловани кодеин и тебаин.

Ово је важно имати у виду приликом интерпретације токсиколошког налаза хероинских зависника. Некада се трагови ових алкалоида или ацетилованих производа могу наћи у слузокожи носних ходника код зависника који су унели хероин ушмркавањем. Такође се ова палета алкалоида може идентификовати и у траговима са шприцева или прибора (кашика, игала) који су коришћени приликом интравенског уношења хероина. Уличном хероину се често додају тзв. пуниоци парацетамол, кофеин, глукоза, сахароза тако да се и они могу наћи у поменутиим узорцима. У биолошком материјалу крви, урину, течности стаклатог тела, ткивима органа можемо очекивати метаболите хероина, 6-моноацетилморфин и морфин, али и кодеин који настаје метаболисањем ацетилованог кодеина (пратеће нечистоће настале приликом производње уличног хероина). Идентификација морфина и кодеина у биолошком материјалу може бити и резултат независног уноса морфина или кодеина. 6-моноацетилморфин је специфични показатељ, маркер уноса хероина. Међутим због специфичног метаболизма хероина, 6-моноацетилморфин се кратко задржава у биолошким течностима па се у случајевима да се он не идентификује испитује однос морфина и кодеина. Однос морфин/кодеин  $>1$  указује на унос хероина, или хероина и морфина и кодеина заједно (78).

Метаболички пут хероина, морфина и кодеина приказан је на слици 14, а детаљне монографије ових једињења, са подацима који су важни за разумевање предметне проблематике дате су у прилозима 1, 2 и 3 (78).

У овом раду метаболити хероина анализирају се у узорцима ткива јетре који је главни орган за њихово метаболисање. Битна полазна чињеница је да постоји доста података о стабилности морфина у ткиву јетре, али је исто тако позната и хемијска нестабилност хероина који брзо подлеже хидролизи до 6-моноацетилморфина до кога се и метаболише у року од неколико минута.



Слика 15: Шематски приказ метаболита хероина, морфина и кодеина (79)  
G – глукуронид

### 2.7.2. Нове психоактивне супстанце

Последњих година на тржишту дрога појавили су се нови молекули, опште познати као „нове психоактивне супстанце“. Представљају разнолику групу хемијских једињења која изазивају психоактивне ефекте, сличне или јаче постојећим илегалним молекулима. У основи њихове појаве лежи покушај да постану легална замена тзв. „класичним“ дрогама, нпр канабису (синтетички канабиноиди), кокаину и амфетаминима (синтетички катинони) или хероину (синтетички опиоиди). Уједињене нације дефинишу „нове психоактивне супстанце“ као „било коју супстанцу у чистом облику или у облику препарата која није укључена у Јединствену конвенцију Уједињених нација о опојним дрогама из 1961. или Конвенцију Уједињених нација о психотропним супстанцама из 1971, а која представља претњу јавном здрављу“ (80).

Термин „нова“ психоактивна супстанца не значи нужно да се ради о новосинтетисаном једињењу; многа су раније синтетисана и одавно позната. Оно што је ново је заправо начин њихове дистрибуције, велика разноврсност и широка распрострањеност, брзина модификације хемијске структуре како би се добиле нове супстанце које не подлежу законској контроли, али и нестабилност на тржишту дрога, неке се здржавају кратко а неке опстају дуже време. Само у последњој деценији пријављено је више од 1.000 нових психоактивних супстанци (81). Продају се као алтернатива, „легална“ замена за илегалне дроге, путем интернета, у тзв. „паметним продавницама“ „енг. Smart Shops“ (82) као производи под називима: „legal highs“, „herbal highs“, „research chemicals“, „plant food“, „bath salts“ или „herbal incense“, често означени као производи који „нису за људску употребу“ (82). Могу бити у облику праха, ђубрива, таблета, течности или биљног материјала (83) (84) (85). У новије време појављују се и у течностима за електронске цигарете, и импрегниране на упијајуће папире у облику сличица (86).

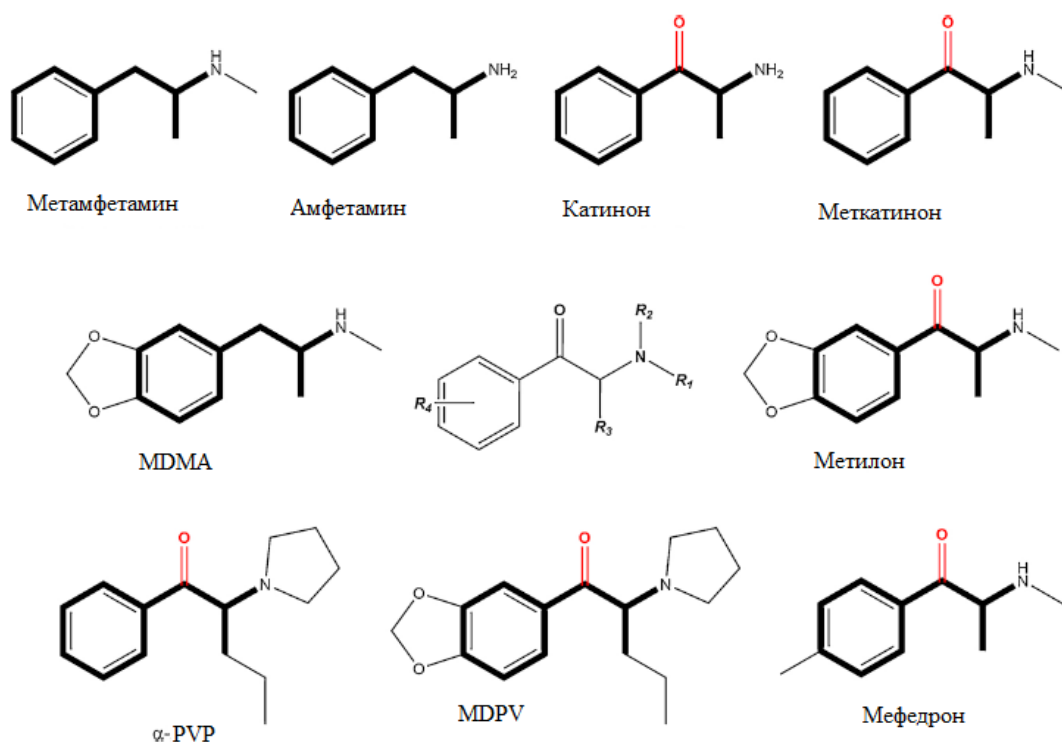
Све већи број NPS које се појављују на тржишту дрога постале су главни проблем јавног здравља, не само због све веће употребе, интоксикација и смртних исхода већ и због недостатка научних истраживања и разумевања њихових штетних ефеката (83). Ова ограничења наглашавају потребу за развојем метода за њихову

идентификацију (82). У прилог озбиљности широкораспрострањеног и мултидисциплинарног проблема говори и чињеница о потреби успостављања система за рано упозоравање на међународном нивоу. Креирање и доступност система раног упозоравања (EWS) на националном, регионалном и међународном нивоу нуди могућност за отклањање потенцијалних криза кроз брзе размене информација међу заинтересованим странама тако да се ризици које представљају синтетичке дроге могу идентификовати и ублажити (81). Откривање и идентификација синтетичких дрога су први неопходни и кључни кораци за ширење информација ради спровођења њихове контроле на националном и међународном нивоу.

Нове психоактивне супстанце се могу груписати у зависности од хемијске структуре у синтетичке канабиноиде, синтетичке катинони, фенетиламинне, арилциклохексилламинне, триптаминне, индолалкиламинне, нове синтетичке опиоиде, пиперазинне и дизајнеране бензодиазепине (87), а на основу њиховог порекла на психоактивне лекове природног порекла и синтетичке молекуле. Уједињене нације их у свом систему раног упозоравања класификују на следећи начин: синтетички канабиноиди, синтетички катинони, фенетиламини, аминокинидани, триптамини, пиперазини, фенциклидину слична једињења, једињења биљног порекла и остало (88).

### 2.7.3. Синтетички катинони

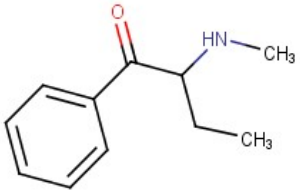
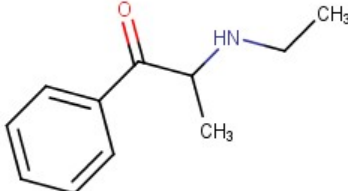
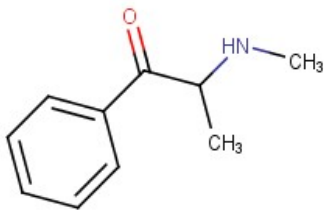
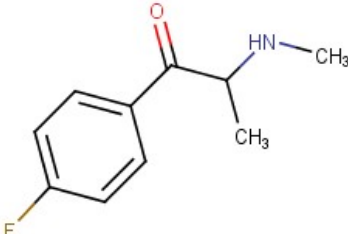
Синтетички катинони су  $\beta$ -кето фенетиламини. Деривати су алкалоида катинона, активног принципа биљке кхат или кат (*catha edulis*) (89). Хемијски су слични амфетамину и метамфетамину (слика 16).



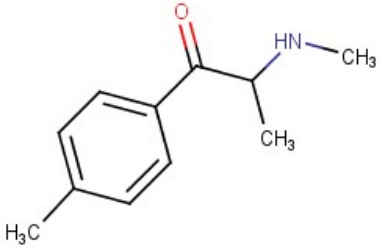
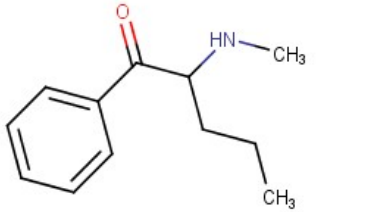
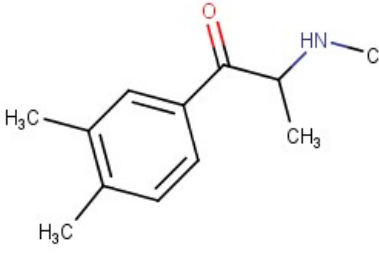
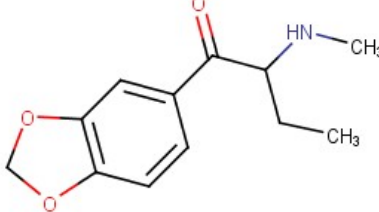
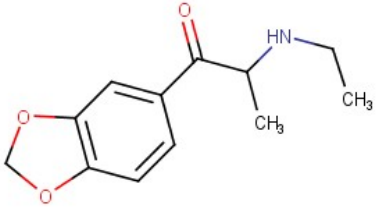
**Слика 16:** Хемијске структуре амфетамина и синтетичких катинона. Синтетички катинони имају додатак кисеоника на позицији  $\beta$ -угљеника ( $\beta$ -кетон) (90)

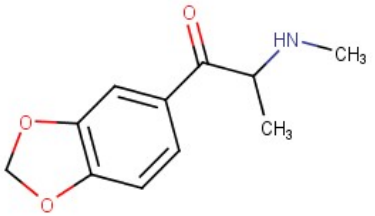
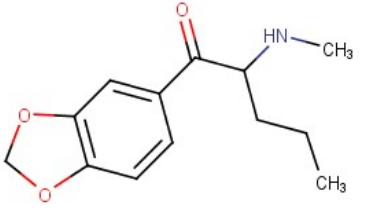

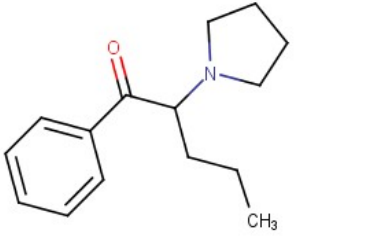
Деривати катинона су на основу хемијске структуре подељени у четири групе. Прва група је група N-алкил једињења и једињења са халогеном или алкил супституентом на било којој позицији ароматичног прстена: ефедрон, еткатинон, флефедрон, мефедрон, буфедрон и пентедрон (табела 4). Другу групу чине једињења са супституентима на било којој позицији ароматичног прстена као пентилон, метилон, и бутилон, тј. метилендиокси-супституисана једињења (табела 4). Трећа група је група природних аналога катинона са N-пиролидинил супституентом, нпр. МРНР,  $\alpha$ -PVP (табела 4). Коначно, четврту групу чине једињења која укључују и N-пиролидинил и метилендиоксил супституенте, нпр. MDPBP и MDPV (табела 4).

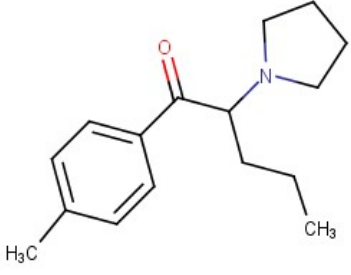
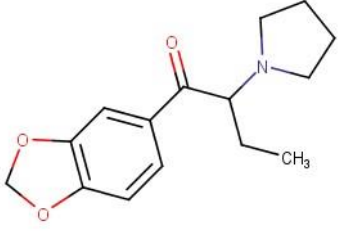
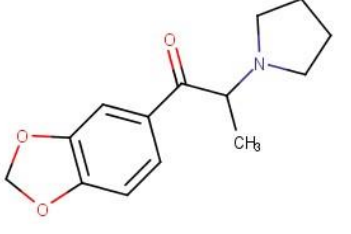

Табела 4: Деривати катинона

Хемијско име	Тривијални и други називи	Хемијска структура
[2-( <i>N</i> -Methylamino)butan-1-onyl]-benzene	Buphedrone, $\alpha$ -methylaminobutyrophenone	
[2-( <i>N</i> -Ethylamino)-propan-1-onyl]-benzene	Ethcathinone, ETCAT, <i>N</i> -ethylcathinone	
[2-( <i>N</i> -Methylamino)-propan-1-onyl]-benzene	Ephedrone, methcathinone, CAT, $\alpha$ -methylaminopropiophenone	
1-[2-( <i>N</i> -Methylamino)-propan-1-onyl]-4-fluorobenzene	Flephedrone, 4-FMC, 4-fluoromethcathinone	



Хемијско име	Тривијални и други називи	Хемијска структура
1-[2-( <i>N</i> -Methylamino)-propan-1-onyl]-4-methylbenzene	Mephedrone, 4-ММС, 4-methylmethcathinone	
[2-( <i>N</i> -Methylamino)-pentan-1-onyl]-benzene	Pentedrone, $\alpha$ -methylaminovalerophenone	
1-[2-( <i>N</i> -Methylamino)-propan-1-onyl]-3,4-dimethylbenzene	3,4-DMMC, 3,4-dimethylmethcathinone	
1-[2-( <i>N</i> -Methylamino)-butan-1-onyl]-(3,4-methylenedioxy)-benzene	Butylone, bk-MBDB, $\beta$ -keto-methylbenzodioxolylbutanamine	
1-[2-( <i>N</i> -Ethylamino)-propan-1-onyl]-(3,4-methylenedioxy)-benzene	Ethylone, bk-MDEA, 3,4-methylenedioxy- <i>N</i> -ethylcathinone	

Хемијско име	Тривијални и други називи	Хемијска структура
1-[2-( <i>N</i> -Methylamino)propan-1-onyl]-(3,4-methylenedioxy)-benzene	Methylone, bk-MDMA, 3,4-methylenedioxy- <i>N</i> -methylcathinone	
1-[2-( <i>N</i> -Methylamino)pentan-1-onyl]-(3,4-methylenedioxy)-benzene	Pentylone, bk-MBDP	
1-[2-(Pyrrolidin-1-yl)hexan-1-onyl]-4-methylbenzene	MPHP, 4-methyl- $\alpha$ -pyrrolidinohexanophenone	
1-[2-(Pyrrolidin-1-yl)pentan-1-onyl]-benzene	$\alpha$ -PVP, $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone	

Хемијско име	Тривијални и други називи	Хемијска структура
1-[2-(Pyrrolidin-1-yl)-pentan-1-onyl]-4-methylbenzene	Pyrovalerone, 4-methyl- $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone	
1-[2-(Pyrrolidin-1-yl)-butan-1-onyl]-3,4-methylenedioxybenzene	MDPBP, 3,4-methylenedioxy- $\alpha$ -pyrrolidinobutiophenone	
1-[2-(Pyrrolidin-1-yl)propan-1-onyl]-3,4-methylenedioxybenzene	MDPPP, 3,4-methylenedioxy- $\alpha$ -pyrrolidinopropiophenone	
1-[2-(Pyrrolidin-1-yl)-pentan-1-onyl]-3,4-methylenedioxybenzene	MDPV, 3,4-methylenedioxy-pyrovalerone	

Синтетички катинони („соли за купање“ у САД и „биљна храна“ или „хемикалије за истраживање“ у Европи) су синтетизовани 1920-их и коришћени за лечење пацијената са симптомима Паркинсонове болести, гојазности, и депресије (91) (92). У последње време су због својих психоактивних својстава (емпатија,

еуфорија, повећана будност, причљивост, отвореност у комуникацији, интензивирање чулних искустава, смањење апетита, осетљивост на музику, повећана друштвеност) (93), коришћене као рекреативне дроге. Поред психоактивних синтетички катинони изазивају и соматске промене, на кардиоваскуларни систем: хиповолемија, тахикардија, бол у грудима, хипертензија, СТ сегмент (период када миокард одржава контракцију да избаци крв из коморе), миокардитис, срчани застој; на централни нервни систем: несаница, вртоглавица, главобоља, напади, измењен ментални статус, тремор, конфузија, вртоглавица, колапс, дистонија, хиперрефлексија, поспаност, миоклонус, парестезије; на хематолошки систем: дисеминована интраваскуларна коагулација, анемија, тромбоцитопенија; на гастроинтестинални и јетрени систем: мучнина, повраћање, абнормални тестови функције јетре, бол у стомаку, отказивање јетре; на плућни систем: тахипнеја, кратак дах, респираторна инсуфицијенција и застој, респираторна ацидоза; на бубрежни систем: повећан бубрежни креатинин, оштећење бубрега, хипонатремија, хиперкалемија, акутна бубрежна инсуфицијенција, хиперурикемија; на мишићно-скелетни систем: повишена креатинин киназа, периферна вазоконстрикција, рабдомиолиза; на офталмолошки систем: мидријаза, нистагмус, замагљен вид; на ОРЛ систем: епистакса, поремећај говора, орални и фарингеални ефекти, бруксизам, тризам; на интраваскуларни систем: блокада вена, локална инфекција, ерозија коже, красте, квржице, апсцес, гангрена ткива, крвни угрушци и велике рупе на месту убода при прекомерном убризгавању; психијатријски нежељени ефекти су агресија, анксиозност, узнемиреност, анорексија, параноја, деперсонализација, визуелне и слушне халуцинације, параноичне заблуде, психоза, депресија, самоубилачке мисли, анхедонија, самоповређивање, когнитивни поремећаји: дуготрајна когнитивна оштећења, дезоријентација, зависност, покушаји престанка зимања дроге и толеранција.

Два су пионирска представника катинона, меткатинон (кат; 1930-их и 1940-их година коришћен је у Русији као антидепресив) и 4-метилметкатинон (4-ММС, мефедрон). Други популарни представници су метилон (3,4-метилендиокси-N-метилкатинон), који се обично комбинује са мефедроном (први пут синтетизован

1929), и 3,4- метилendioксипировалероном (MDPV) (92) (94) (95). Неки нови катинони се користе као заменски лекови у терапији и лечењу (нпр. бупропион, трговачки називи Wellbutrin, Zyban). Прописује се као помоћни лек за одвикавање од пушења и за лечење депресије (96). Пировалерон је требало да буде лек који се издаје на рецепт за лечење хроничног умора, летаргије и гојазности али је повучен са легалног тржишта због злоупотребе корисника (97) (98) (99). 4- МЕС, 4-МеPPP,  $\alpha$ -PVP, бутилон ( $\beta$ -кето-Н-метилбензодиоксилилбутанамин), пентедрон ( $\alpha$ -метиламино-валерофенон), пентилон ( $\beta$ -кето-метилбензодиоксилилпентанамин), 3-ФМС, 4-ФМС, нафирон (нафтилпировалерон) и  $\alpha$ -PVP тренутно немају прихваћену медицинску употребу у лечењу (99). 3-ММС (метафедрон) први пут се појавио у Шведској 2012. без икакве терапијске примене (100) (101). Присутан је на илегалном тржишту као бели прах или у облику кристала, а према изјава корисника, мање је моћан и интензиван од МДМА и 4-ММС (102). Power и сар. су синтетисали и анализирали 3-ММС коришћењем GC-MS, IR и NMR у 2011. години (103). Christie и сар. су користили Раманову спектрометрију за разликовање региоизомера; метода је брза и поуздана, па се може користити за детекцију приликом контроле на аеродромима (104).

Синтетички катинони лако пролазе крвномождану баријеру (ин витро експерименти) (94). Такође,  $\beta$ -кето-амфетамини изазивају стимулацију CNS-а и симпатомиметичке ефекте које карактерише повећан крвни притисак, убрзан рад срца, мидријаза и хипертермија [50,233–240] (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113). Они су инхибитори моноаминских транспортера. Њихова селективност за серотонинске рецепторе, транспортере норепинефрина и транспортере допамина је различита. Механизам катинона у неуротрансмисији се састоји од покретања пресинаптичког ослобађања допамина и смањења његовог поновног преузимања што је слично механизму амфетамина. Занимљиво, иако се везују за допаминске и серотонинске рецепторе, катинони показују највећи афинитет за норепинефринске рецепторе. Такође је откривено да катинони индукују ослобађање серотонина и инхибирају његово поновно преузимање (114).

Катинони постоје у два стереоизомерна облика. Сваки од њих може имати различит потенцијал деловања (95). S-енантиомери се налазе у кату. Међутим, већина супституисаних психоактивних супстанци је у облику рацемских смеша (115).

У зависности од потенцијала инхибиције преузимања норадреналина, допамина и серотонина и способности њиховог ослобађања, Simmler и сар. (94) поделили су синтетичке катиноне у три групе на основу *in vitro* експеримената:

1. Катинони који делују као кокаин и MDMA (кокаин-MDMA мешани катинони). Начин деловања једињења из ове групе састоји се у неселективној инхибицији поновног преузимања моноамина. Они показују бољу селективност према транспортерима допамина и стимулишу ослобађање серотонина (слично као MDMA). Метилон, мефедрон, етилон, бутилон, и нафирон су катинони из ове групе (94) (106) (108) (109) (116), (112).

2. Катинони који делују као метамфетамин (метамфетамину-слични катинони). Њихов механизам деловања се састоји приоритетно у инхибицији поновног преузимања катехоламина и ослобађања допамина. Флефедрон, меткатинон и клефедрон (4-хлорометкатинон) су катинони из ове групе (94) (107).

3. Синтетички катинони са структурама на бази пировалерона (пировалерон катинони). Чланови ове групе, MDPBP и MDPV, су веома селективни и моћни инхибитори поновног преузимања катехоламина без ефекта на ослобађање неуротрансмитера (94) (107).

Начин и јачина деловања катинона на централни нервни систем су различити и зависе од бројних фактора (нпр. године старости, пол, опште здравствено стање, степен зависности, узимање других психоактивних супстанци, употреба лекова, употреба алкохола) (117) (118). Сви катинони изазивају психомоторну ексцитацију, еуфорију, осећај повећања емпатије, повећана међуљудске отворености и самопоуздања, и повећан либидо (105) (92) (95) (119). Предозирање може довести до бројних нежељених ефеката као што су нпр. паника и агресија, поремећај памћења, халуцинације, губитак памћења, депресија и самоубилачке мисли (94).

Меуер и сар. (110) су предложили механизам за метаболизам мефедрона који укључује N-деметилацију до основног амина праћену смањењем функционалности

кетона, и хидроксилацију метил супституента ароматичног прстен (који омогућава његову оксидацију у карбоксилну киселину). Уралетс и сар. (120) су истраживали метаболите 16 синтетичких катинона пронађених у људском урину. Подела у три групе према њиховим метаболизму:

Буфедрон, мефедрон, 4-метилбуфедрон, 4-метилеткатинон, пентедрон, 3,4-ДММС, флэфедрон, еткатинон и N-етил-буфедрон припадају првој групи. Њихов метаболизам прати образац од прекурсора синтетичких катинона (тј. катинона и метакатинона). У урину рекреативних корисника дрога, откривени су метаболити из процеса редукције  $\beta$ -кетона и N-деалкилације (ефедрини и норелефедрини као главни метаболити).

Друга група укључује 3,4-метилендиокси супституисане катиноне (бутилон, метилон и етилон), који су мање склони  $\beta$ -кето редукцији у поређењу са једињењима из прве групе. Једно од објашњења може бити постојање 3,4-метилендиокси супституента у ароматичном прстену. У анализираном урину, пронађени су родитељски молекули (117).

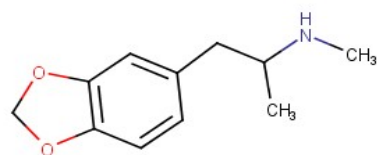
$\alpha$ -пирролидинофенони, као што су  $\alpha$ -PVP и  $\alpha$ -PVP, за које се у почетку сматрало да се даље не метаболишу редукцијом кето групе, или се налазе непромењени у урину, представници су треће групе (116) (120) (121). Shima и др. (122) су показали да главни метаболички путеви  $\alpha$ -пирролидинофенона код људи зависе од дужине алкил ланца матичног молекула. Метаболизам PV9 се значајно разликује од  $\alpha$ -PVP и  $\alpha$ -PVP, а укључује (а) редукцију кето групе у алкохол, (б) оксидацију пирролидинског прстена у пирролидон, (в) алифатичну оксидацију терминалног атома угљеника у карбоксилат, (г) хидроксилацију на претпоследњем атому угљеника до алкохола, (д) оксидацију до кетона и (б) комбинацију горњих корака (122).

#### 2.7.4. Фенетиламини

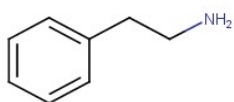
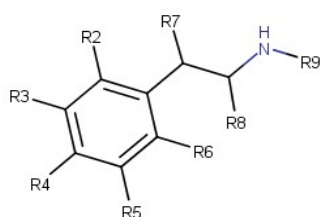
Фенетиламини су једињења која су сродна амфетаминима и MDMA. Њихов скелет је ароматичан прстен са бочним ланцима од два угљеника који се завршавају амином група (слика 17) и могу да претрпе две главне промене: (1) замена  $\alpha$ -

угљеника метил групом производи метил деривате амфетамина (слика 17) (123) и (2) супституција бензенског прстена на позицијама 2 и 5 са метокси групама и у положају 4 са супституентом фенетиламина или амфетамина (слика 17) (123) (124) (125). Тетрахидробензодифуранил и бензодифуранил („FLY“) су аналози ових серија (126). NBOMe серија, која се састоји од N-бензил деривата серије 2C (слика 17) такође је синтетисана (127) (128).

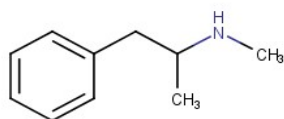




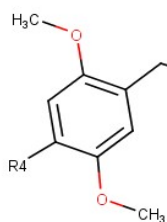
MDMA



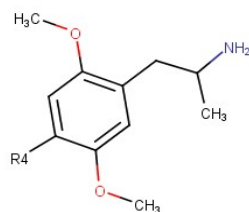
phenethylamine



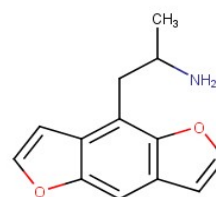
methamphetamine



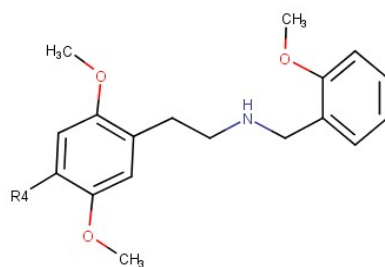
2 C series



D series



Bromo-Dragonfly



NBOMe series

Слика 17: Хемијска структура неких дрога из групе фенетиламина (102)

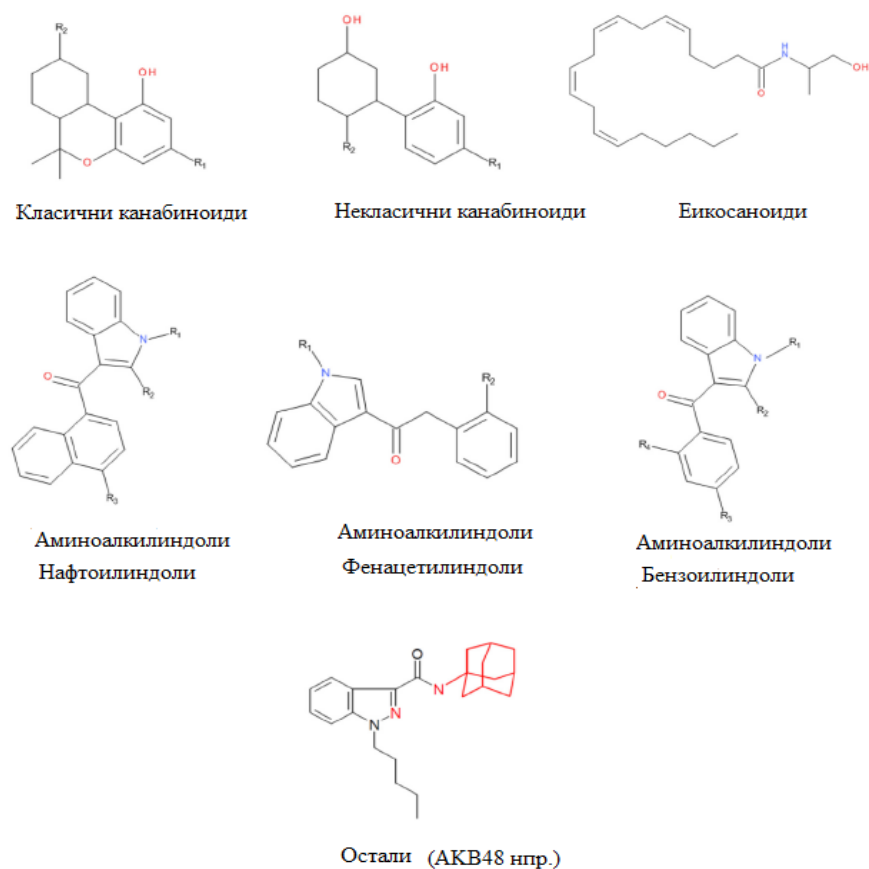
Показано је да супституција у прстену повећава афинитет једињења за 5HT<sub>2a</sub> рецепторе (129). Замена ароматичног прстена са метилендиокси групом на позицијама 3 и 4 даје МДМА и његове деривате. Они припадају новој фармаколошкој класи – ентактогена.

Нежељене реакције при конзумирању фенетиламина су осећање узнемирености и анксиозности, емоционални поремећаји, непријатне халуцинације, тахикардија и хипертензија, честа узнемиреност, тремор, и напади (130). 25I-NBOMe је нпр. дериват 2C-X серије фенетиламина. 25I-NBOMe једињења су позната као халуциногени и стимуланси и моћни агонисти хуманог 5HT<sub>2A</sub> рецептора (131).

### 2.7.5. Синтетички канабиноиди

Синтетички канабиноиди (енг. Synthetic Cannabinoids, SC) су једна од најчешћих класа NPS. На тржишту дрога појавили су се почетком 2000-их. SC су једињења првобитно дизајнирана са терапеутском намером. Показују висок афинитет за канабиноидне рецепторе CB<sub>1</sub> и CB<sub>2</sub> у људском организму, па се и користе као алтернатива марихуани, пушењем биљних мешавина које их садрже (86) (132).

У групу синтетичких канабиноида спадају многе супстанце које нису структурно сличне са такозваним „класичним“ канабиноидима, односно једињењима, као што је THC, на бази дибензопирана. За већину је заједничко да су неполарна једињења која се састоје од 22 до 26 атома угљеника, са карактеристичним бочним ланцем са више од четири засићених атома угљеника (89). Због разнолике структуре постоји и подела на класичне, оне који имају сличну структуру као и THC, некласичне и друге групе. Већина синтетичких канабиноида уклопила би се у структуре приказане на слици 18.



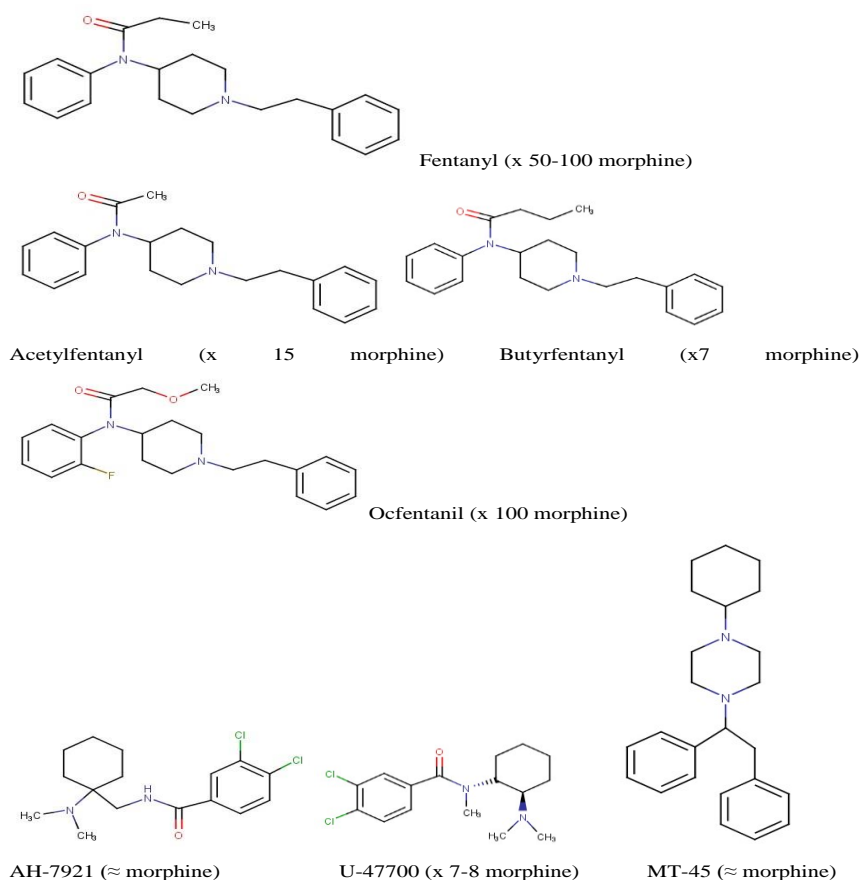
Слика 18: Хемијске структуре класа синтетичких канабиноида (133)

### 2.7.6. Пиперазини

Пиперазини који су се појавили на илегалном тржишту називају се и „пропалим фармацеутским производима“ (134). Најважнији представник ове групе, употребљаван као NPS је 1-бензилпиперазин (BZP) мада су пријављени и други деривати пиперазина. То су нпр. 1-(3-хлорофенил) пиперазин (*m*CPP), 1-(3-трифлуорометилфенил) пиперазин (TFMPP), 1-бензил-4-метил пиперазин (MBZP), 1-(4-флуорофенил) пиперазин (*p*FPP) и 1-циклохексил-4-(1,2-дифенилетил) пиперазин (MT-45) (88).

### 2.7.7. Синтетички опиоиди

Нови синтетички опиоиди (NSO) се могу поделити у две групе: 1) фармацеутски (нпр. фентанил, суфентанил, ремифентанил и алфентанил) и 2) нефармацеутски фентанили (нпр. окфентанил, бутилфентанил). Нова генерација NSO, са структурама различитим од фентанила, појавила се на тржишту лекова 2010. године: АН-7921 (аналог бензамида), МТ-45 (аналог пиперазина) и U-47,700 (изомер АН-7921) (слика 19). Одликују их различите карактеристике, као што су доступност на интернету, ниска цена, чистоћа, законитост, висока токсичност и недостатак детекције у лабораторијским тестовима (135). NSO се могу наћи у облику праха, таблета и течности (135).



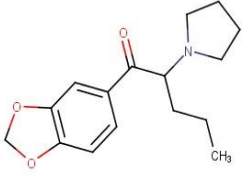
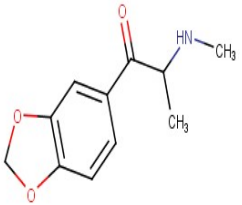
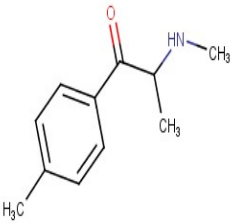
Слика 19: Структура и потенцијал токсичности NSO (135)

### **2.7.8. Арилциклохексиламини**

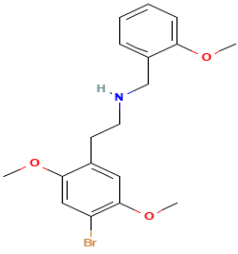
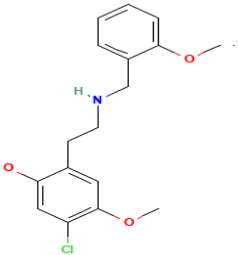
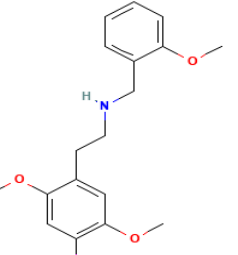
Кетамин је медицински анестетик који се користи у ветерини, као и код људи (136) (137) и педијатријској пракси (138). Арилцикло-алкиламин скелет производи халуциногене ефекате (139). Норкетамин је метаболит кетамина.

NPS које су предмет овог рада приказане су табеларно. Подаци су преузети углавном из извештаја Светске здравствене организације о овим једињењима (140), (141), (142), (143), (144), (145), (146), (147), (148), (149), (150), (151).

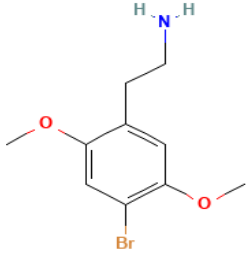
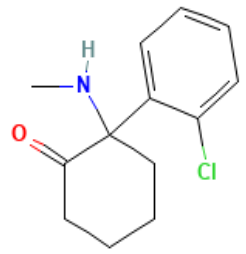
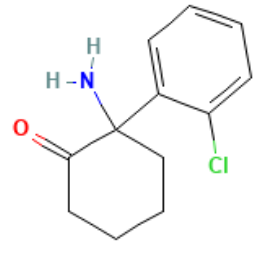
Табела 5: НПС у раду

Врста дроге	Хемијска структура формула и назив	Хемијске особине	Историја	Најчешће форме	Начин уношења	Нежељени ефекти	Регулатива
MDPV	 <p><chem>C16H21NO3</chem> 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-one</p>	<p>Молекулска маса: 275.35 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 229-231 °C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>MDPV HCl је бели кристални прах</p>	<p>Први пут је продаван на уличним тржишту дрога у Токију 2007.</p> <p>У Европи пријављен током 2008.</p>	Праш, таблете	Орално, инхалација/ушмркавање, ињекција	Халуцинације, психозе, самоповређивање, заблуде агресија, ефекти на срце и CNS	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
Метилон	 <p><chem>C11H13NO3</chem> 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)propan-1-one</p>	<p>Молекулска маса: 207.23 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 229-231 °C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>Метилон HCl је бели или светло обојени прах, растворан у води.</p>	<p>Први пут је продаван на уличним тржишту дрога у Токију 2007.</p> <p>У Европи пријављен током 2008.</p>	Праш, течност, таблете	Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање	Параноја, анксиозност, бруксизам, тахикардија, хипертензија, напетост и болови у мишићима	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
Мефедрон	 <p><chem>C11H15NO</chem> 2-(methylamino)-1-(4-methylphenyl)propan-1-one</p>	<p>Молекулска маса: 177.24 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 66,61 °C</p> <p>Тачка кључања: 269,51 °C</p> <p>Мефедрон база је жућкаста течност на собној температури.</p> <p>Мефедрон HCl је бели прах.</p>	<p>Синтетисан је 1929.</p> <p>Пријављен је на илегалном тржишту Европе 2007.</p> <p>Пријављен је и на илегалном тржишту САД и Аустралије.</p>	Праш, таблете, течност	Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање,	Халуцинације, психозе, презнојавање, језа, проширене венице, хипертермија, тахикардија, иритација слузокоже носа	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>

Табела 5: НПС у раду – наставак табеле

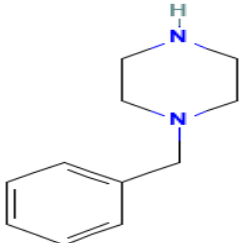
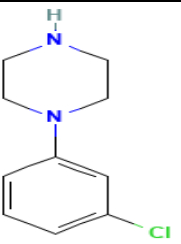
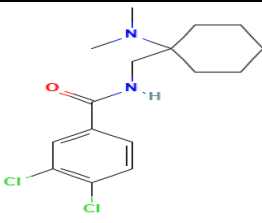
Врста дроге	Хемијска структура формула и назив	Хемијске особине	Историја	Најчешће форме	Начин уношења	Нежељени ефекти	Регулатива
25B-NBOMe	 <p><math>C_{18}H_{22}BrNO_3</math></p> <p>2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine</p>	<p>Молекулска маса: 380.28 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 156°C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>25B-NBOMe HCl је прах.</p>	<p>Продаван је путем интернета као „LSD”, или као легална алтернатива за LSD или као хемикалија за истраживање.</p>	<p>Течност, прах, таблете</p>	<p>Орално, инхалација/ушмркавање, ињекција</p>	<p>Интоксикацијавртголавица, главобоља, несаница, узнемиреност, смртни исходи услед повреда због интоксикације</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
25C-NBOMe	 <p><math>C_{18}H_{22}ClNO_3</math></p> <p>2-(4-chloro-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine</p>	<p>Молекулска маса: 335.8 g/mol</p> <p>Тачка топљења: непознато</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>25C-NBOMe HCl је прах</p>	<p>Продаван је путем интернета као „LSD”, или као легална алтернатива за LSD или као хемикалија за истраживање.</p>	<p>Течност, прах, таблете</p>	<p>Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање</p>	<p>Интоксикацијавртголавица, главобоља, несаница, узнемиреност, смртни исходи услед повреда због интоксикације</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
25I-NBOMe	 <p><math>C_{18}H_{22}INO_3</math></p> <p>2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine</p>	<p>Молекулска маса: 427.28 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 166°C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>25I-NBOMe HCl је прах.</p>	<p>Продаван је путем интернета као „LSD”, или као легална алтернатива за LSD или као хемикалија за истраживање.</p>	<p>Течност, прах, таблете</p>	<p>Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање,</p>	<p>Интоксикацијавртголавица, главобоља, несаница, узнемиреност, смртни исходи услед повреда због интоксикације</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>

Табела 5: НПС у раду – наставак табеле

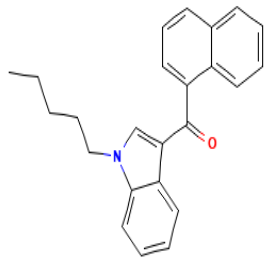
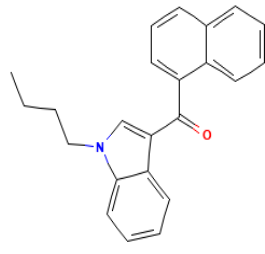
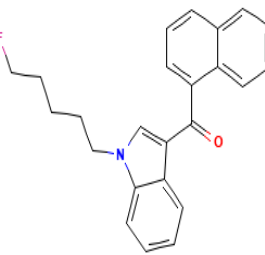
Врста дроге	Хемијска структура формула и назив	Хемијске особине	Историја	Најчешће форме	Начин уношења	Нежељени ефекти	Регулатива
2 С-В	 <p><chem>C10H14BrNO2</chem> 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine</p>	Молекулска маса: 260.13 g/mol		Течност, прах, таблете	Орално, инхалација/ушмркавање, ињекција	Напади панике, тешке психозе, стања делиријума, главобоља, убрзана циркулација и рад срца, повреде због благог анестетичког деловања.	Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971. На Листи је ПКС у РС
Кетамин	 <p><chem>C13H16ClNO</chem> 2-(2-chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexan-1-one</p>	Молекулска маса: 237.72 g/mol Тачка топљења: 92-93°C Бели кристални прах.	Регистрован је као лек у ветерини и анестетик у неким земљама. Пријављена је злоупотреба у порасту.	Течност, прах, таблете	Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање	Користи се као халуциноген. Ефекти слични фенциклидину.	Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971. На Листи је ПКС у РС
Норкетамин	 <p><chem>C12H14ClNO</chem> 2-amino-2-(2-chlorophenyl)cyclohexan-1-one</p>	Молекулска маса: 223.70 g/mol	Метаболит кетамина.	Метаболит кетамина.	Метаболит кетамина.	Метаболит кетамина.	Метаболит кетамина.



Табела 5: NPS у раду – наставак табеле

Врста дроге	Хемијска структура формула и назив	Хемијске особине	Историја	Најчешће форме	Начин уношења	Нежељени ефекти	Регулатива
BZP	 <p><math>C_{11}H_{16}N_2</math> 1-Benzylpiperazine</p>	<p>Молекулска маса: 176.26 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 17-20 °C</p> <p>Тачка кључања: 143-146 °C</p> <p>BZP база је жућкастозе лена корозивна течност.</p> <p>BZP HCl је бео прах.</p>	<p>Бележи се пораст злоупотребе у Европи, нарочито од 2007.</p>	<p>Прах таблете, капсуле</p>	<p>Орално, инхалација/ ушмркавање, ињекција</p>	<p>Убрзан пулс, повишен крвни притисак, проширене зенице, ефекти слични амфетамину.</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
mCPP	 <p><math>C_{10}H_{13}ClN_2</math> 1-(3-Chlorophenyl)piperazine</p>	<p>Молекулска маса: 196.67 g/mol</p> <p>Тачка топљења: непознато</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>прах</p>	<p>Злоупотреба пријављена средином 2000. у Европи али од тада и у другим земљама (САД нпр.)</p>	<p>Течност, прах таблете</p>	<p>Орално, ињекција, инхалација/ ушмркавање</p>	<p>Мучнина, халуцинације, главобоља, анксиозност</p>	<p>Нелегалан у неким земљама.</p> <p>На Листи је ПКС у РС .</p>
АН-7921	 <p><math>C_{16}H_{22}Cl_2N_2O</math> 3,4-dichloro-N-[[1-(dimethylamino)cyclohexyl]methyl]benzamide</p>	<p>Молекулска маса: 329.3 g/mol</p> <p>Тачка топљења: непознато</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>прах</p>	<p>На располагању је од 2012. путем трговине интернетом као хемикалија за истраживање, углавном у Европи</p>	<p>Прах течност</p>	<p>Орално, ињекција, инхалација/ ушмркавање</p>	<p>Респираторна депресија</p> <p>Ефекти слични морфину</p>	<p>Налази се у Групи I Конвенције о опојним дрогама из 1961., допуњене протоколом из 1972.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>

Табела 5: NPS у раду – наставак табеле

Врста дроге	Хемијска структура формула и назив	Хемијске особине	Историја	Најчешће форме	Начин уношења	Нежељени ефекти	Регулатива
JWH 018	 <p>C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone</p>	<p>Молекулска маса: 341.4 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 65-67°C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>Бела кристална супстанца.</p>	<p>Појавио се средином 2000. растворен у ацетону и попрскан на биљне мешавине које су продавале у тзв. паметним продавницама</p>	<p>Најчешће присутан у биљним мешавинама.</p> <p>течност прах таблете</p>	<p>Орално, инхалација/ушмркавање ињекција</p>	<p>Тахикардија, мучнина, диспнеја, визуелни поремећаји, халуцинације, стрепња, параноја, напади панике, психозе, заблуде, дезоријентација, конфузија, губитак свести</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
JWH 073	 <p>C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>NO (1-butylindol-3-yl)-naphthalen-1-ylmethanone</p>	<p>Молекулска маса: 327.4 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 99.8°C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>Бела кристална супстанца.</p>	<p>Продаје су путем интернета, најчешће као биљна мешавина.</p>	<p>Најчешће присутан у биљним мешавинама.</p> <p>Течност прах таблете</p>	<p>Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање</p>	<p>Канабиноми метички ефекти слични THC.</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>
AM-2201	 <p>C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>FNO [1-(5-fluoropentyl)indol-3-yl]-naphthalen-1-ylmethanone</p>	<p>Молекулска маса: 359.4 g/mol</p> <p>Тачка топљења: 93.7°C</p> <p>Тачка кључања: непознато</p> <p>Бела кристална супстанца, растворљива у етанолу (око 5 mg/ml)</p>	<p>Продаван је у Европи, Јапану, Русији и САД</p>	<p>Најчешће присутан у биљним мешавинама.</p> <p>Течност прах таблете</p>	<p>Орално, ињекција, инхалација/ушмркавање</p>	<p>Повраћање, анксиозност, узнемиреност, параноја, раздражљивост напади, тахикардија, самонанети повреде, халуцинације, тешкоће у концентрацији координацији, повишен крвни притисак и губитак свести</p>	<p>Налази се у Групи II Конвенције о Психотропним супстанцама из 1971.</p> <p>На Листи је ПКС у РС</p>

Табела 5: NPS у раду – наставак табеле

Врста дроге	Хемијска структура формула и назив	Хемијске особине	Историја	Најчешће форме	Начин уношења	Нежељени ефекти	Регулатива
ММВ СНМІСА	 <p><math>C_{22}H_{30}N_2O_3</math></p> <p>methyl (2S)-2-[[1-(cyclohexylmethyl)indole-3-carbonyl]amino]-3-methylbutanoate</p>	Молекулска маса: 370.49 g/mol	Продаван је путем интернета као биљна мешавина углавном	Најчешће присутан у биљним мешавинама.	Инхалација	Нису познати	DEA Schedule II  На Листи је ПКС у РС

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

#### 3.1. Мерни инструменти

##### 3.1.1. Гасни хроматографи са масеним и тандем масеним анализаторима

1. Гасни хроматограф са масеним спектрометром, GC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Конфигурација:

Гасни хроматограф - Agilent 6850 (Series II)

Јонски извор - EI

Масени спектрометар - Agilent 5975 B

Аутосемплер за аутоматско ињектовање течних узорака

Ињекциони мод: *split/splitless*

Капиларна колона - J&W DB-17 MS Capillary Column, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Софтверски програм: ChemStation (Agilent Technologies)

Хелијум, чистоће 5.0 – носећи гас

2. Гасни хроматограф са масеним спектрометром, GC-MS (Shimadzu, Kyoto, Јапан) – конфигурација:

Гасни хроматограф - Shimadzu GC-2010 Plus

Јонски извор - EI

Масени спектрометар - Shimadzu QP 2010 Ultra mass spectrometer

Аутосемплер за аутоматско ињектовање узорака - Shimadzu AOC-5000

Ињекциони мод: *split/splitless*

Капиларна колона - J&W DB-1 MS Capillary Column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Софтверски програм - LabSolution (Shimadzu)

Хелијум, чистоће 5.0 – носећи гас

3. Гасни хроматограф са тандем масеним спектрометром, GC-MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Конфигурација:

Гасни хроматограф - Agilent 7890

Јонски извор - EI

Масени спектрометар (трипл-квад) - Agilent, 7000 triple-quad mass spectrometer

Аутосемплер за аутоматско ињектовање узорака - АОС-5000

Ињекциони мод: *split/splitless*

Капиларна колона - J&W DB-5 MS Capillary Column, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Софтверски програм: Mass Hunter (Agilent Technologies)

Хелијум, чистоће 6.0 – носећи гас

Азот, чистоће 5.0 – колизионни гас

### 3.1.2. Течни хроматографи са тандем масеним и ТОФ анализаторима

1. Течни хроматографи са тандем масеним спектрометром - LC-MS/MS, (LCMS-8030 triple quadrupole mass spectrometer, Shimadzu, Kyoto, Japan)

Конфигурација:

Течни хроматограф - Nexera, Shimadzu, LC instrument

LC – модули: аутосемплер - SIL-30AC; дегазер - DGU-20A5R; пумпа - LC-30AD 2 јединице; пећница - СТО 30А; контролер - СВМ 30А, Nexera, Shimadzu

Масени спектрометар (трипл-квад) - LCMS-8030, Shimadzu triple quadrupole mass spectrometer

MS модули: јонски извор – ESI, АРСИ интерфејс

Софтверски програм: LabSolution (Shimadzu)

Генератор азота - Nitrogen Generator, Peak Scientific, UK

Груба пумпа - E2M28 (Edwards Limited, Crawley, UK)

Аргон, чистоће 5.0 – колизиони гас

Азот – гас за распршивање и сушење (nebulizing gas, drying gas), генерише га генератор азота

Аналитичка колона - Kinetex® 5µm C18 100Å, LCcolumn 100 mm × 6 mm, Phenomenex, USA

Аналитичка колона - XTerra MS C18 Column Reversed-Phase 3.5 µm Spherical Hybrid, 4.6 mm x 100 mm, Waters

2. Течни хроматографи са QTOF масеним спектрометром - LC-QTOF/MS, Agilent 6520 quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Конфигурација:

Течни хроматограф - Agilent 1290 Infinity LC instrument

LC – модули: дегазер, бинарна пумпа, аутосемплер, пећница са термостатираном колоном

Масени спектрометар, комбинација квадруполоа и масеног анализатора на бази времена прелета - Agilent 6520 quadrupole time-of-flight mass spectrometer

MS модули: јонски извор – ESI + Agilent Jet Stream, интерфејс

Генератор азота - Nitrogen Generator, Peak Scientific, UK

Груба пумпа - E2M28 (Edwards Limited, Crawley, UK)

Софтверски програм: Mass Hunter (Agilent Technologies)

Аналитичка колона - Zorbax Eclipse plus C18, 2.1 mm x 100 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies

### 3.2. Лабораторијски прибор

Електронска аналитичка вага, *Sartorius Werke GmbH*, Немачка

Ултразвучно купатило, DU-65, *Giorgio Vornac*, Италија

Вортекс мешалица, *Vortex-Genie2T*, Њујорк, САД

Упаривач, Hettich, Енглеска  
Систем за добијање дејонизоване, Purelab Classic, ELGA LabWater, High  
Wuscombe, Bucks, Енглеска  
Центрифуга, Technica, Немачка  
Микроцентрифуга, Eppendorf Centrifuge 5410  
Систем за чврст-течну екстракцију  
Шприц филтери, PTFE, 0.45  $\mu\text{m}$ , Ultrafree-MS, Millipore, Бедфорд, САД  
Аутоматске пипете и наставци за пипете  
Пластични шприцеви, 2 mL  
Стаклено посуђе, чаше, епрувете  
Колоне за чврсто течну екстракцију, StrataX-C, Phenomenex

### 3.3. Хемикалије и растварачи

Ацетонитрил, LC-MS grade, Carlo Erba Reagents, Chaussée du Vexin, France  
Метанол, LC-MS grade, Carlo Erba Reagents, Chaussée du Vexin, France  
Мравља киселина, p.a., Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД  
Етил-ацетат, HPLC grade, J.T. Baker, Девентер, Холандија  
Дихлорметан, GC grade, J.T. Baker, Девентер, Холандија  
Изопропанол, HPLC grade, J.T. Baker, Девентер, Холандија  
Амонијак, p.a., Зорка Шабац  
Хлороводонична киселина, p.a., Зорка Шабац  
Натријум-хидроксид, p.a., Зорка Шабац  
Натријум хидроген фосфат,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , p.a., Зорка, Шабац  
Натријум дихидроген фосфат,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , p.a., Зорка Шабац  
N, O-бис(триметилсилил)трифлуороацетамид (BSTFA) са 1% трихлорсилан  
(TMCS), Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД

### 3.3.2. Аналитички стандарди

Аналитички стандарди морфина, кодеина, 6-моноацетилморфина и њихових деутеризованих аналога морфина-D6 и 6-моноацетилморфина-D6 набављени су од произвођача Cerilliant, Sigma-Aldrich, Сент Луис, Мисури, САД. Аналитички стандарди мефедрона, метилона, MDPV, JWH-073, JWH-018, AM-2201, кетамина, норкетамина, 25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, mCPP, 2CB и BZP набављени су од произвођача Lipomed, USA & Canada, у оквиру међулабораторијске сардање са научним одељењем канцеларије за дрогу UNODC, Беч.

## 3.4. Узорци

### 3.4.1. Узорци биљног материјала

За потребе анализе на присуство синтетичких канабиноида коришћена су четири узорка биљног материјала код којих је постојала сумња да садрже психоактивне супстанце.

Један од узорака, суви биљни материјал (бренда који није приказан у раду) зеленкасте боје, анализиран је на лични захтев корисника у октобру 2017. године. Према информацијама које смо добили, купљен је у једној од тзв. паметних продавница “Smart Shops” у Београду, у оригиналом паковању (пвц кесица). На декларацији производа наводи се да је у питању освеживач простора уз упозорење да није за људску употребу. На етикети производа је наведен и садржај биљне материје од 3 g. У даљем тексту овај узорак ће се наводити као узорак биљног материјала анализиран на лични захтев корисника.

Остала три узорка биљног материјала достављена су по налогу тужилаштва под сумњом да се ради о илегалној дроги марихуани (прилог 4). Радило се о биљном материјалу, сувом, уситњеном, зеленкастобраон боје, без специфичног мириса, запакованом у мале пвц кесице, без ознаке. У даљем тексту наведени узорци су означени као узорци биљног материјала анализирани на захтев тужилаштва.



### 3.4.2. Узорци биолошког материјала

Анализирани су узорци ткива јетре узети у току 12 судскомедицинских обдукција извршених у току 2016. године у Институту за судску медицину у Београду. Одабир узорака извршен је на основу околности случаја (подаци добијени од стране полиције, родбине или судских органа) и позитивног прелиминарног теста у урину на присуство опијата (у случајевима у којима је урин био доступан). За један узорак је постојао податак да је особа била на метадонској терапији. Параметри као што су пол, старост, време протекло између настанка смртог исхода и обдукције, претходна обољења нису узимани у обзир.

Узорци ткива јетре су лабораторији достављани након саме обдукције у затвореним пластичним посудама. До анализе су чувани у замрзивачима на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Поред ткива јетре за токсиколошку анализу су достављане и телесне течности (крв, урин, течност стакластог тела) који су одмах анализирани за потребе доношења закључка о начину и узроку смрти а који нису предмет ове тезе. За узорак особе за коју смо имали податак да је била на метадонској терапији токсиколошка анализа није рађена, а узорак ткива јетре је одвојен за чување.

Узорци ткива јетре су независно од оних достављених за токсиколошку анализу достављани и патохистолошкој лабораторији где су подвргавани процедури фиксације формалином, дехидратацији алкохолем, складиштењу у парафинске калупе, да би се након сечења наносили на стаклене плочице и бојили, а затим фиксирани покровним стаклом за потребе патохистолошке анализе. По један део ткива након фиксирања формалином чуван је у замрзивачу заједно са узорцима ткива јетре достављаним токсиколошкој лабораторији. Узорци ових парова, без третирања формалином и третирану формалином, а чувани у замрзивачу на  $-20^{\circ}\text{C}$ , за потребе овог истраживања анализирани су након временске дистанце од 4-4,8 година.

За 8 случајева, од наведених 12, део ткива јетре је припремљен у хистолошкој лабораторији и смештен у парафинске калупе након чега су калупи преузети за потребе нашег истраживања. Овако припремљено ткиво анализирано је након 5,8-6 година. Узорци, случајеви анализираних ткива су обележени бројевима од 1-10.

За потребе квантитативне анализе опијата узорци говеђе јетре купљени су у супермакету ТС Меркатор у Београду. Коришћени су као матрикс у коме је додаван аналит.

За потребе анализе NPS у урину узорци су прикупљени од здравих добровољаца из лабораторије који према исказима не користе психоактивне супстанце.

Узорак косе који је приказан у раду примљен је на лични захтев корисника, а резултати узорка биолошког материјала и косе за један случај су били реални узорци рађени у токсиколошкој лабораторији Института за судску медицину у Београду.

### **3.5. Припрема основних и радних раствора аналитичких стандарда**

#### **3.5.1. Припрема радних раствора новодизајнираних дрога**

Одмеравано је по 5 mg стандарда мефедрона, метилона, MDPV, JWH-073, JWH-018, AM-2201, кетамина, норкетамина, 25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, mCPP, 2CB и BZP на аналитичкој ваги и растварано метанолом у нормалном суду од 5 mL. На тај начин је добијен основни раствор концентрације mg/mL (шток). Од њега је разблаживањем у метанолу направљен раствор од 0,1 mg/mL који је коришћен за прављење радних раствора концентрација 0,01 mg/mL, 0.001 mg/mL и 10 mg/mL.

За оптимизацију методе на LC-MS/MS-у коришћен је раствор од 0,1 mg/mL, а за спајковање узорака урина раствори 0,01 mg/mL, 0,001 mg/mL и 0,0001 mg/mL.

#### **3.5.2. Припрема радних раствора опијата за калибрациону криву**

Раствори стандарда 6-моноацетилморфина, морфина, и кодеина концентрације mg/mL разблажени су метанолом за потребе спајковања узорака ткива јетре у циљу прављена калибрационе криве. Направљена је смеша стандарда сва три аналита у концентрацијама од 0,01 µg/mL, 0,025 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL и 30 µg/mL. Одвојено су припремљени стандардни раствори деутеризованих интерних стандарда морфина-D6 и 6-моноацетилморфина-D6 у метанолу у концентрацији од 10 µg/mL.

### 3.6. Припрема узорака

#### 3.6.1. Припрема узорака биљног материјала

За квалитативну анализу узорак биљног материјала који је достављен на лични захтев корисника је најпре уситњен до облика праха (25 mg). Затим је екстрахован са 5 mL MeOH у ултразвучном купатилу у трајању од 30 минута. Након центрифугирања (5 мин. на 3.000 rpm, релативна центрифугална сила 2350,6) екстракт је филтриран кроз филтер од 0,45 µm. За анализе на GC-MS и ESI QTOF/MS екстракт је разблажен метанолом 10 пута а 100 пута за анализу на LC-MS/MS.

Узорци биљног материјала достављени на захтев тужилаштва припремљени су на горе описани начин, са разликом у количини узорка и запремини растварача. За ове узорке одмеравано је по 100 mg узорка. За екстракцију је коришћено по 3 mL MeOH. За анализу на GC-MS и GC-MS/MS екстракт је разблажен метанолом 10 пута.

#### 3.6.2. Припрема узорака биолошког материјала – ткива органа

Узорке ткива јетре који су чувани у замрзивачу, а који нису третираны формалином у даљем раду називаћемо свеже ткиво јетре, иако је у замрзивачу чувано, како је већ наведено између 4 до 4,8 година. Ткива која су извађена из раствора формалина (ткиво из формалина), чувана су у замрзивачу 7 дана мање у односу на свежа ткива јетре, колико је трајало њихово складиштење у раствору формалина на собној температури. Ткива у калупима су чувана дуже (3.4.3), на собној температури.

##### 3.6.2.1. Припрема узорака свежег ткива јетре и ткива из формалина

За анализу узорака свежег ткива јетре и ткива из формалина узорци су након одмрзавања на собној температури уситњени маказама за сечење ткива. Одмеравано је по 0,5 грама и пребацивано у центрифужне стаклене епрувете од 10 mL. Додато је по 25 µL деутеризованих интерних стандарда (IS, морфина-D6 и 6-МAM-D6). Затим је вршена преципитација протеина додавањем по 1 mL хладног ацетонитрила и вортексирањем у трајању од једног минута, након чега је додавано по 3 mL

фосфатног пуфера рН 6. Епрувете су затваране пластичним запушачима, након чега су узорци држани 30 min. у ултразвучном купатилу на собној температури.

Након хлађења, узорци су центрифугирани на 3000 обртаја 10 минута. Супернатант је пречишћен чврсто-течном екстракцијом. Процедура је била следећа: за кондиционирање Strata X-C кертрица (колоне) коришћено је по 2 mL метанола и фосфатног пуфера 0,1 mol рН 6. Затим је наносен узорак (супернатант). Колона је испирана са 2 mL 0,1 mol HCl и 2 mL метанола, након чега је сушена 5 минута, па поново испрана са по 1 mL метанола. Елуирање је вршено са 3 mL смеше дихлорметан/изопропанол/амонијак 80:20:2 v/v. Након упаравања у струји азота на грејном телу (температура 40°C) вршена је дериватизација са 50 µL BSTFA + 1%TMCS, 20 минута на 80°C. После хлађења деривати су пребацивани у инсерт вијале и ињектовани на GC-MS и/или GC-MS/MS.

### **3.6.2.2. Припрема узорака ткива јетре из калуца**

Ткиво је од парафина из парафинског блока (прилози 21 и 22) одвојено сечењем на танке листиће, дебљине 20 µm микротомом. Након мерења, 0,5 грама процедура за припрему узорака је била иста као и претходно описана (3.5.3.1) са разликом што није додаван ацетонитрил и време соникације узорка је продужено на 1 сат.

### **3.6.2.3. Припрема спајк узорака ткива за калибрациону криву**

Паралелно са узорцима свежих ткива јетре и ткива из формалина на исти начин је припремљено и 8 спајкованих узорака говеђе јетре који су служили за конструисање калибрационе криве. Пошто је маса ткива која је коришћена за анализу, као и за израду калибрационе криве била 0,5 грама у сваки узорак ткива који је коришћен за спајковање додавано је по 50 µL смеше стандарда морфина, кодеина и 6-моноацетилморфина (3.5.2.) да се добију концентрације од 0,001 µg/g, 0,0025 µg/g, 0,05 µg/g, 0,1 µg/g, 0,25 µg/g, 1 µg/g, 1,5 µg/g и 3 µg/g. Пре екстракције додавано је по 25 µL интерног стандарда, морфина-Д6 и 6-моноацетилморфина-Д6, тако да се добије концентрација од 0,5 µg/g у спајкованом ткиву.

Поред спајкованих ткива за калибрациону криву и реалних узорака ткива (свежих и из формалина) припремљен је и један бланк узорак и један узорак са додатим интерним стандардом.

Паралелно са узорцима ткива јетре из калуца припремљена су и три узорка спајкованих са смешом стандарда морфина, кодеина и 6-моноацетилморфина тако да концентрације буду 0,05 µg/g, 0,5 µg/g и 1,5 µg/g, и додатно један бланк узорак и један узорак са додатим интерним стандардом. Сви узорци су припремани на начин описан у поглављу 3.5.3.2.. Као матрикс за спајковање и бланк узорци коришћено је ткиво из калуца (негативно, прикупљано за друге анализе).

### **3.6.3. Припрема узорака за анализу NPS – урин**

Узорци којима је додата свака од испитиваних НПС анализирани су течно-течном екстракцијом. Направљена су три сета узорака појединачно за сваку NPS, тако да концентрација буде 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, и 1 µg/mL. Паралелно је за сваки концентрациони ниво направљен и бланк узорак.

Припрема узорака је модификована оној која се у нашој лабораторији користи. За течно течну екстракцију је коришћено 500 µL урина, додавано по 100 µL 0,1 mol NaOH и 1 mL етил ацетата. Смеша је вортексирана и центрифугирана 10 минута на 14000 обртаја. Супернатант је упарен, а онда реконституисан у 500 µL метанола.

## **3.7. Аналитички инструменти - оптимизација параметара метода**

### **3.7.1 GC-MS – анализа биљног материјала**

Екстракт биљног материјала добијен на лични захтев корисника анализиран је GC-MS инструментом фирме *Agilent Technologies*. Запремина ињектовања је била 1 µL а начин ињектовања без поделе узорка тзв. splitless mode. Услови раздвајања гасног хроматографа на капиларној колони J&W DB-17 MS ( 30m ×0.25mm × 0.25µm) били су: стартна температура 120°C са задржавањем од 1 min, а затим је температура подизана до 280°C брзином 20°C min<sup>-1</sup> ramp у току 20 min., тако да је укупно снимање узорка (run time) било 29 min. по узорку, са одложеним снимањем на

почетку од 5.0 min, тзв. *solvent delay*. Температура инлета била је 250°C а температура трансфер линије 300°C. Хелијум је коришћен као носећи гас при протоку од 1 mL min<sup>-1</sup> (услови 1).

Екстракт биљног материјала добијен на лични захтев корисника је анализиран и GC-MS инструментом фирме Shimadzu. Раздвајање је рађено на неполарној колони J&W DB-1 MS column (30m × 0.25mm i.d., 0.25 μm film thickness). Ињектовано је 1 μL узорка у splitless mode. Хелијум је коришћен као носећи гас, проток 0.73 mL min<sup>-1</sup>. Температуре ињектора, јонског извора и интерфејса су биле 250, 200 и 280°C. Иницијална температура колоне је била 200° C у трајању од 1 min, након чега је повећавана до 320°C брзином 20°C min<sup>-1</sup> у трајању од 15 min, тако да је ран трајао 22 min, са одлагањем снимања растварача од 4.0 min (услови 2).

На истом инструменту снимани су и узорци биљног материјала добијени по налогу тужилаштва али са измењеним температурним програмом. Иницијална температура колоне је била 120° C у трајању од 1 min, након чега је повећавана до 310°C брзином 30°C min<sup>-1</sup> у трајању од 7 min, тако да је ран трајао 15 min, са одлагањем снимања растварача од 4.0 min (услови 3).

Сва снимања су извођена у режиму пуног скенирања маса у опсегу од 40–550 amu. Јонизација је вршена при 70 eV у јонском извору EI.

### 3.7.2. LC-QTOF/MS – анализа биљног материјала

За анализу тачне молекулске масе и елементарног састава молекула анализа је рађена масеним спектрометром на бази времена прелета куплована са квадруполним масеним анализатором LC-MS/QTOF са ESI јонизационим интерфејсом у комбинацији са течним хроматографом 1290 Infinity LC instrument. Течни хроматограф је коришћен без колоне за раздвајање на амбијенталној температури. Мобилна фаза се састојала од (50:50 v/v) компоненте А: 0.1% HCOOH и компоненте В: ACN при изократском протоку од 0.2 mL min<sup>-1</sup>. Ран је трајао 2.00 min. Запремина ињектовања је била 0.1 μL. Анализа је рађена у позитивном моду MS-positive ESI mode. Услови електроспреја су били: волтажа на капилари 3,500 V, волтажа на

фрагментатору 70 V, гас за сушење, температура 350°C, проток 12 Lmin<sup>-1</sup>, гас за распршивање, притисак 45 psi, температура 375°C. Опсег скенирања је подешен између m/z 100 и 1,500 при брзини од 1.0 спектар s<sup>-1</sup> за сваки скан скенирања. Калибрација маса на QTOF/MS рађена је током анализе константном инфузијом раствора референтних маса у јонски извор (протоновани референтни јон [M + X]<sup>+</sup> = 922,0098 је коришћен за позитивни режим). Прикупљање и евалуација података обављени су коришћењем софтвера Масс Хунтер: модул за аквизицију (Acq) B.05.01 и модул за квалитативну анализу (Qual) B.06.00.

### 3.7.3. LC- MS/MS – оптимизација методе – ММВ-СНМІСА

LC-MS/MS је такође коришћен за потврду (идентификацију) и развој нове MRM методе. Коришћени је Shimadzu LC-MS-8030 троструки квадруполни масени спектрометар (Схимадзу, Кјото, Јапан) (Shimadzu, Kyoto, Japan) опремљен интерфејсом са двоструким извором јона за електроспреј или хемијску јонизацију под атмосферским притиском у комбинацији са UPLC системом састављеним од аутосамплера SIL-30AC, DGU-20A5R, контролера CBM-20A, бинарне пумпе LC-30 AD и пећнице STO-30AC за термостатирање колоне. Раздвајање је постигнуто коришћењем Kinetex® 5µm C18 100Å, LC колоне (100mm × 6mm), на температури од 40°C. Брзина протока је била 0.6 mL min<sup>-1</sup>, а запремина ињектовања је подешена на 5µL. Одабрана мобилна фаза је била 0.1% v/v of FA у води (компонента А) и MeOH (компонента Б) при изократској брзини протока (20% А) и (80% Б). Време рада је било 8 минута (услови 3). MS услови снимања су били исти као и они описани у тексту који следи (услов 4).

Да би се развила нова MRM метода, спроведена је аутоматизована оптимизација параметара MRM директним убризгавањем анализата (биљног MeOH екстракта) без колоне (енг. Flow Injection Analysis, FIA) помоћу софтверског пакета који је део функција LabSolutions LCMS контролног софтвера, верзије 5 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Узорак је ињектован шест пута ради оптимизације параметара који су подразумевали: проналажење прекурсор јона m/z, фино подешавање прекурсор јона m/z, подешавање енергије судара (CE), одабир продукт јона m/z, фино подешавање

продукт јона  $m/z$  на три волатажна канала, прелаза и подешавање напона на шипкама квадрупола Q1/Q3. FIA услови су били мобилна фаза А: 0,1% HCOOH, Б: MeOH; изократски 80% Б, проток мобилне фазе  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , време анализе 2,0 min и запремина ињектовања  $5 \text{ }\mu\text{L}$  (убризгавање у петљу). MS услови: ESI, позитиван режим, температура интерфејса линије за десолватацију и топлотни блок сваки  $230^\circ\text{C}$ , проток гаса за распршивање  $2,2 \text{ L min}^{-1}$ , и гас за сушење  $15 \text{ L min}^{-1}$  (услови 4). MRM прелази добијени оптимизацијом су коришћени за даље циљане анализе, за процену екстракције приноси и процена одговора инструмента коришћењем ACN и MeOH у комбинацији са 0,1% HCOOH као мобилних фаза.

#### **3.7.4. GC- MS/MS – оптимизација методе – синтетички канабиноид JWH-018**

На основу снимљеног GC-MS масеног спектра JWH-018 одабрани су најинтензивнији фрагменти као полазни  $m/z$  јони за њихову даљу фрагментацију у колизионој ћелији и одабир специфичне реакције која ће дати најбољи сигнал анализита. Одабрани  $m/z$  јони су селектовани у првом квадруполу (Q1), фрагментисани у колизионој ћелији (q) на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV, а настали специфични јони (продукт јони) праћени су у другом квадруполу (Q2). На основу приноса јонских маса  $m/z$  извршен је одабир прекурсор јона, продукт јона и CE за одговарајући прекурсор.

Радни услови GC-MS/MS: ињектор: splitless мод, температура  $250^\circ\text{C}$ , запремина ињектовања  $1 \text{ }\mu\text{L}$ ; колона: температурни програм, почетна температура  $120^\circ\text{C}$ , одржавање 1 min, повећање температуре за  $20^\circ\text{C min}^{-1}$  до  $280^\circ\text{C}$ , одржавање 4 min; укупно време анализе 15 min. Температура интерфејса  $300^\circ\text{C}$ . Носећи гас He. Јонизациона метода EI на 70 eV; опсег маса 40–550 amu, одложено снимање (solvent delay) 5 min. Снимање у MRM моду такође је извођено под наведеним хроматографским условима.

#### **3.7.5. LC-MS/MS – оптимизација методе – одабране новодизајниране дроге**

За развијање нове методе LC-MS/MS методе за токсиколошки скрининг 15 новодизајнираних психоактивних супстанци спроведена је аутоматска оптимизација



MRM параметара директним убризгавањем аналитичких стандарда 0,1 mg/L, без колоне, на већ описани начин (поглавље 3.7.3.). Коришћен је софтверски пакет LabSolutions LCMS верзија 5.

Симултано су ињектовани аналитички стандарди мефедрона, MDPV, метилона, 25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 2C-B, АН-7921, JWH-018, JWH-073, AM-2201, BZP, mCPP, кетамина и норкетамина по шест пута (услови 4, поглавље 3.7.3.). Раздвајање је постигнуто коришћењем аналитичке колоне XTerra MS C18 Column Reversed-Phase 3.5  $\mu\text{m}$  Spherical Hybrid, 4.6 mm x 100 mm, на температури од 40°C. Брзина протока је била 0.4 mL min<sup>-1</sup>, а запремина ињектовања је подешена на 10  $\mu\text{L}$ . Одабрана мобилна фаза је била 0.1% v/v HCOOH у води (компонента А) и MeOH (компонента Б) при изократској брзини протока (20% А) и (80% Б). Време рада је било 5 минута (услови 5). MS услови снимања су били исти као и они претходно описани (услови 4).

### 3.7.6. GC-MS – анализа метаболита хероина у ткиву јетре

Снимљени су масени спектри дериватизованих (TMS) аналога деутеризованих стандарда 6-моноацетилморфина-D6 и морфина-D6 најпре одвојено а затим заједно са дериватизованим стандардима 6-моноацетилморфина, морфина и кодеина у Scan/SIM и SIM режиму рада. Одабрани су најинтензивнији јони за праћење у SIM моду. Подешено је ретенционо време у односу на хроматографско раздвајање анализата. Концентрација снимљених анализата била је 1  $\mu\text{g/mL}$ . 100  $\mu\text{L}$  стандарда концентрације 10  $\mu\text{g/mL}$  је упарено у струји азота и дериватизовано са 50  $\mu\text{L}$  BSTFA + 1% TMCS у затвореној епрувети 20 min на 80°C. Након хлађења дериват је пренет у инсерт вијалу и ињектован у GC-MS.

Радни услови GC-MS-а (конфигурација описана у одељку 3.1.1. под тачком 1, Agilent): ињектор: splitless мод, температура 250°C, запремина ињектовања 2  $\mu\text{L}$ ; колона: температурни програм, почетна температура 120°C, одржавање 1 min, повећање температуре за 20°C min<sup>-1</sup> до 280°C, одржавање 5min; укупно време анализе 17 min. Температура интерфејса 300°C. Носећи гас He. Јонизациона метода EI на 70 eV; опсег маса 40–550 amu, одложено снимање (solvent delay) 5 min.

### 3.7.7. GC- MS/MS – анализа метаболита хероина у ткиву јетре

На основу снимљених масених спектра стандарда (1 µg/mL), TMS аналога 6-моноацетилморфина, морфина, кодеина, 6-моноацетилморфина-D6 и морфина-D6 у SCAN режиму рада одабрани су најинтензивнији јони анализата потребни за извођење експеримената за добијање селектованих реакција за њихово праћење методом GC-MS/MS. Снимљена је смеша стандарда морфина, кодеина и 6-моноацетилморфина на различитим СЕ: 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV. Деутеризовани IS снимљени су одвојено појединачно на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV. Одабрани m/z јони су селектовани у првом квадруполу (Q1), фрагментисани у колизионој ћелији (q) на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV, а настали специфични јони (продукт јони) праћени у другом квадруполу (Q2). На основу приноса јонских маса m/z извршен је одабир прекурсор јона, продукт јона и СЕ за одговарајући прекурсор. Одабране реакције за праћење анализата коришћене су за снимање реалних узорака. Радни услови описани у поглављу 3.7.4..

### 3.7.8. LC-QTOF/MS – токсиколошки скрининг

Радни услови за ESI QTOF/MS-а дати су у табели 6.

За хроматографско раздвајање коришћена су два градијентна програма.

1. Коришћен за токсиколошки скрининг биолошког материјала - косе  
мобилна фаза А: 1% HCOOH, В: ACN  
проток 0,4 mL/min  
градијент: 0 min 5% В, 1,5 min линеарно до 40% В, 5,5 min линеарно до 60 %В, линеарно 95% В до 11.0 min, враћено на 5% В, еквилибрација 3 min.
2. Коришћен за анализу NPS:  
мобилна фаза А: 1% HCOOH, В: ACN  
проток 0,6 mL/min  
градијент: 0 min 1% В, 20 min линеарно до 80% В, враћено на 1 %В до 25 min, еквилибрација 5 min

**Табела 6:** Аквизициони параметри за методе MS/MS

Аквизициони мод: AutoMS <sup>2</sup>		Аквизициони мод: AutoMS <sup>2</sup>	
Метода 1		Метода 2	
MS мин опсег (m/z)	50	50	
MS макс опсег (m/z)	1000	1000	
MS брзина скенирања (spectra/sec)	3.00	3.00	
MS/MS брзина скенирања (spectra/sec)	3.00	3.00	
Ширина MS/MS	Medium (~4 amu)	Medium (~4 amu)	
Фиксне колизионе енергије		10.00, 20.00, 30.00, 40.00	
Колизиона енергија преко нагиба			
наелектрисање	нагиб	нагиб	
All	6	4	
Одабир прекурсора			
Макс прекурсора по циклусу	2	2	
Праг(Abs)	200	200	
Праг (Rel)(%)	0.010	0.010	
Изотопски модел	Најчешћи	Најчешћи	
Одабир прекурсора	Преко abundance	Преко abundance	
Опсези m/z		Опсези m/z	
почетна	крајња	почетна	крајња
50	130	50	130
600	1000	600	1000
Наелектрисање одабрано		Наелектрисање одабрано	
2		2	
1		1	
Parameter		Parameter	
Gas Temp (°C)	320	320	
Gas Flow (l/min)	8	8	
Nebulizer (psig)	35	35	
Parameter		Parameter	
VCap	2500	2500	
Fragmentor	150	150	
Skimmer1	65	65	
OctopoleRFPeak	750	750	

### 3.8. Конформациона анализа

Структура нове психоактивне супстанце ММВ-СНМІСА је нацртана у Maestro v. 12.7 који ради под Schrodinger 2021-1 Suite (Schrodinger, Сједињене Америчке Државе). Потом је извршена минимизација коришћењем AMBER\* у СНCl<sub>3</sub> са скраћеним Њутновим коњугованим градијентом и 10000 итерација. Тако минимизирана структура је онда стављена на конформациону анализу коришћењем програма MacroModel под Schrodinger 2021-1 Suite (Schrodinger, Њујорк, Сједињене Америчке Државе). Монте Карло вишеструки минимум је коришћен са 10000 итерација, и све структуре су сачуване унутар 21 kJ mol<sup>-1</sup>.

Конформациона анализа за познате психоактивне супстанце (мефедрон, АН-7921, 25В-НВОМе, 25С-НВОМе, 25І-НВОМе, ВЗР, АМ-2201, МDPV, метилон, ЈWH-018, и 2С-В) је најпре започета њиховим цртањем. Коришћен је програм MacroModel, Schrodinger 2021-1 2016-1 и MMFFs у води и хлороформу. Нацтране структуре су најпре минимизирани у 10000 корака, а онда стављене на конформациону анализу. За неvezивне van der Waals -ове силе узет је лимит од 8.0 Å, и све структуре унутар 5 ккал/мол од глобалног минимума су сачуване. Сви други параметри су подешени у складу са нашим ранијим истраживањима (152).

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Резултати рада су приказани према анализима који су анализирани. Укључују приказ примене једне или више инструменталних техника, као и поступак оптимизације аналитичких параметара у циљу идентификације анализата у оним случајевима у којима су ови експерименти рађени.

### 4.1. Идентификација синтетичких канабиноида у биљном материјалу

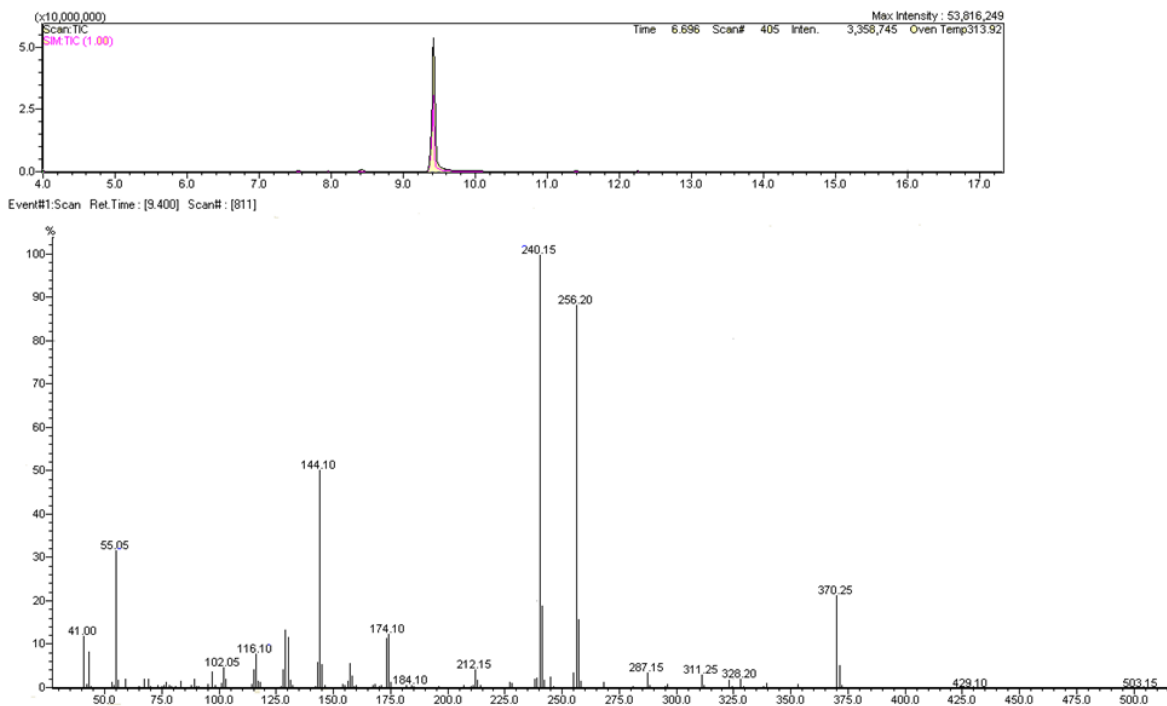
У наредном делу су приказани резултати поступка идентификације синтетичких канабиноида у биљном материјалу (поглавље 3.4.1.) са и без аналитичког стандарда комбинацијом метода GC-MS, LC-QTOF/MS, LC-MS/MS или GC-MS/MS. Такође је приказана и оптимизација инструменталних параметара за праћење селектованих реакција за синтетичке канабиноиде; MMB-СНМІСА методом LC-MS/MS и JWH-018 методом GC-MS/MS.

#### 4.1.1. MMB-СНМІСА – GC-MS резултати

У поступку токсиколошког скрининга метанолни екстракт (поглавље 3.6.1.) биљног материјала сумњивог на присуство психоактивних супстанци, а достављеног на лични захтев корисника је прво анализиран методом GC-MS (под условима описаним под 1, поглавље 3.7.1.). За раздвајање је коришћена капиларна колона DB-17MS. На ретенционом времену (енг. Retencion Time, RT) RT = 20.896 издвојио се хроматографски пик који није био симетричан али је добијени масени спектар указао на присуство молекулског јона  $m/z$  370 и карактеристичне фрагменте  $m/z$  240, 256, 144 и 55. На основу постојећих база података није било могуће идентификовати хроматографски раздвојено једињење поређењем са већ снимљеним масеним спектром (енг. match spectra library).

Исти екстракт је анализиран на другом GC-MS инструменту под претходно описаним условима (услови 2, поглавље 3.7.1.). Добијен је веома чист хроматограм тј. издвојено је само једно једињење (молекулске масе  $m/z$  370,25) са примесама у

траговима. На слици 20 је приказан добијени укупни јонски хроматограм (енг. Total Ion Chromatogram, TIC), снимљен у режиму Scan/SIM. За раздвајање је коришћена неполарна капиларна колона DB-1MS. Симетричан хроматографски пик се појавио на  $RT = 9,40$  мин.

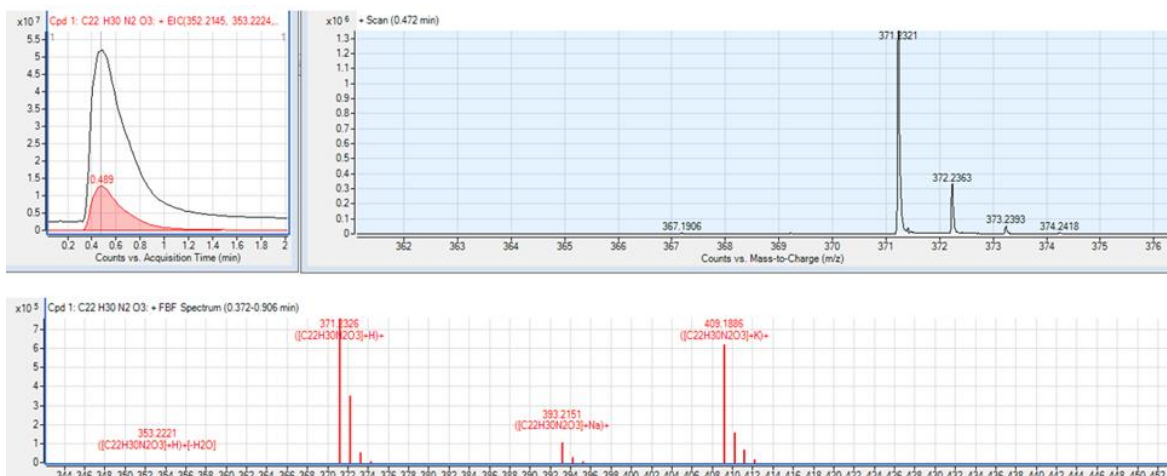


**Слика 20:** EI GC-MS TIC Scan/SIM, масени спектар, DB-1MS колона за раздвајање

На основу овог резултата види се да је за хроматографско раздвајање овог једињења боље користити неполарне колоне и вишу почетну температуру.

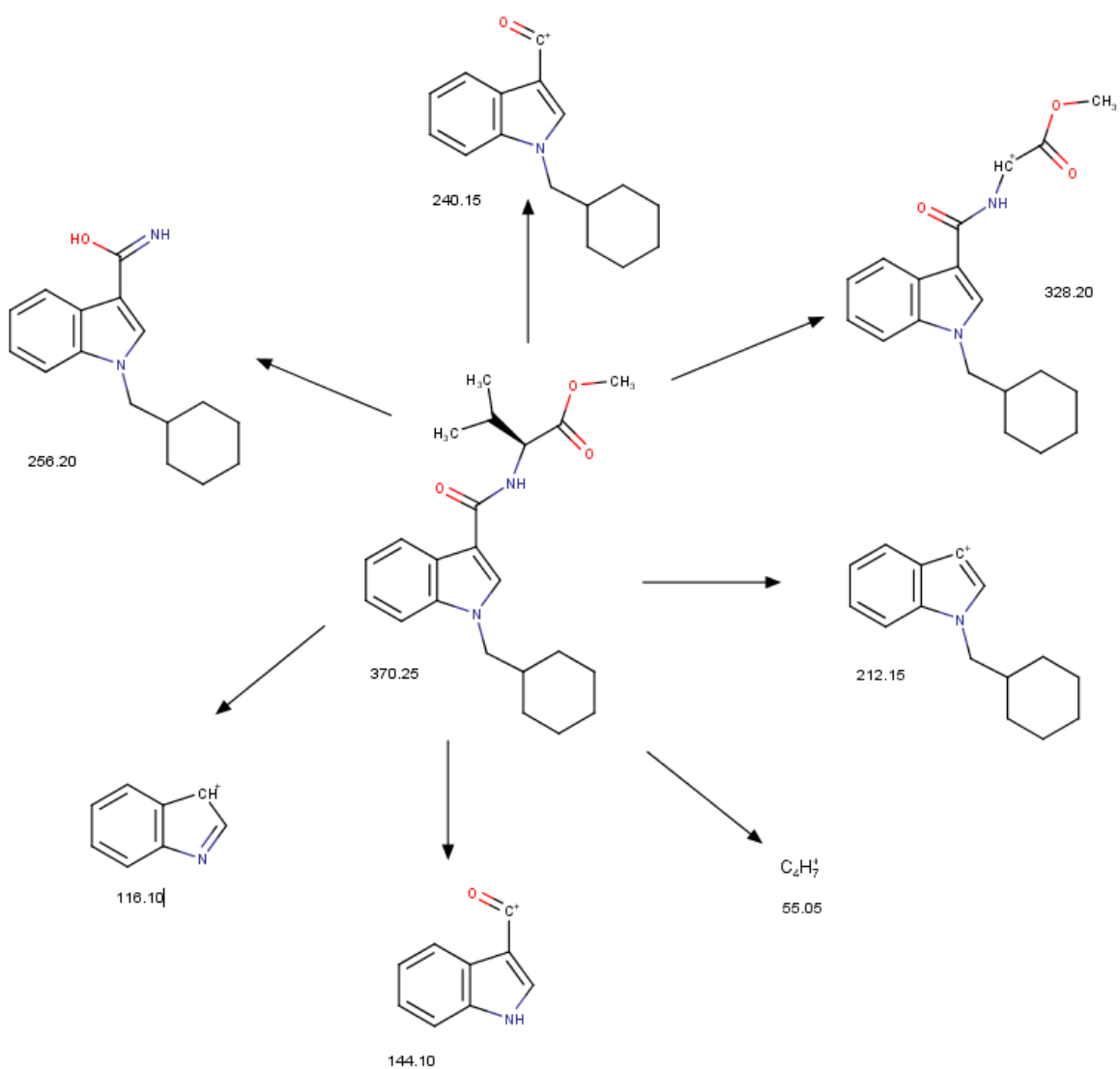
#### 4.1.2. LC-QTOF/MS – резултати

Метанолни екстракт је анализиран и на ESI LC-QTOF/MS, директном инфузијом без колоне. Добијена је тачна маса 370,2256 Da, Diff (ppm) -0,76, а претрагом помоћу алатке Find by formula и препоручена формула  $C_{22}H_{30}N_2O_3$ . У масеном спектру уочавају се и адукти формиран са Na и K ( $[C_{22}H_{30}N_2O_3] + Na$ )<sup>+</sup> и ( $[C_{22}H_{30}N_2O_3] + K$ )<sup>+</sup>. Добијен је и податак о изотопској расподели за једињење ове формуле  $m/z$  371,2321, 372,2363, 373,2393 и 374,2418, као и изотопска расподела формираних адуката са Na и K (слика 21).



Слика 21: LC-QTOF/MS масени спектар

Претрагом путем интернета на основу препоручене формуле и тачне масе једињења коју смо добили анализом на QTOF/MS-у пронашли смо масени спектар снимљен методом GC-MS (153), (154) који је одговарао масеном спектру који смо ми добили са молекулским јоном  $m/z$  370, фрагментима  $m/z$  240, 256, 144 и 55 и њиховим одговарајућим односом. На основу ових података као и карактеристичне фрагментације (слика 22) дошли смо до закључка да се ради о синтетичком канабиноиду ММВ-СНМІСА (АМВ-СНМІСА) или метил N-[1-(циклохексилметил)-1H-индол-3-карбонил]-L-валинат). Арираккан и сарадници (86) су такође дали образац фрагментације ММВ-СНМІСА али је у нашем раду он допуњен за све фрагменте добијене у масеном спектру. Одређене су и структуре фрагментних јона  $m/z$  328.20, 256.20, 240.15, 212.15, 144.10, 116.10, и 55.05. Фрагментни јон  $m/z$  256.20 је добијен Меклафертијевим (енг. McLafferty) преуређивањем из структуре  $m/z$  370.25 (слика 22).

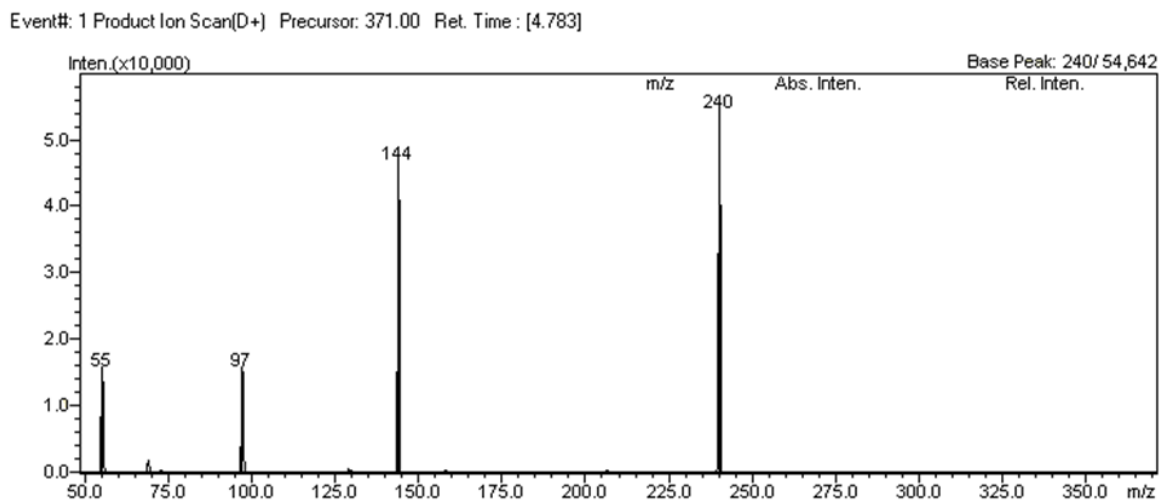


Слика 22: Фрагментациони пут синтетичког канабиноида ММВ-СНМІСА

#### 4.1.3. LC- MS/MS – резултати оптимизације методе

Затим смо развијали методу за циљану анализу ММВ-СНМІСЕ на LC-MS/MS како бисмо и овом техником могли да идентификујемо наведени синтетички канабиноид. За то је коришћен већ поменути метанолни екстракт (3.6.1.). Најпре је снимљен Q3 Scan за потврду протонваног молекулског јона ММВ-СНМІСЕ  $m/z$  371. У моду Product Scan снимљени су продукт јони за  $m/z$  371. Добијени масени спектар продукт јона 240, 144, 97 и 55 приказан је на слици 23.



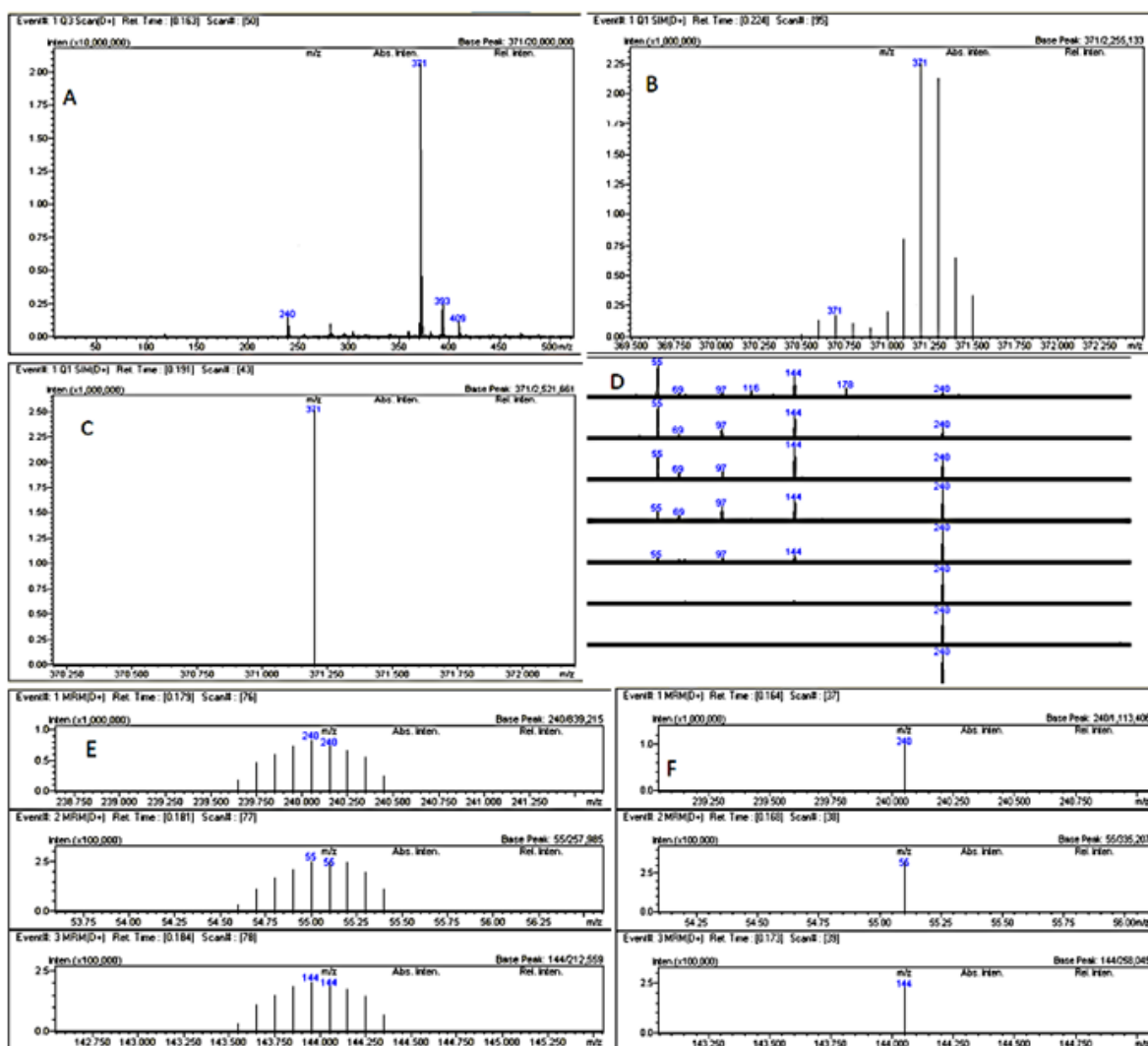


Слика 23: ESI LC-MS/MS, Product Ion Scan масени спектар

Како нисмо располагали аналитичким стандардом за ово једињење нисмо у почетку користили могућност програма LabSolutions LCMS control software за аутоматску селекцију MRM транзиција и подешавање одговарајућих CE. Одабрали смо најинтензивније m/z продукт јоне за MRM прелазе: m/z 371>240 и 371>144, односно специфичне реакције фрагментације настале након судара са колизионим гасом аргоном у колизионој ћелији инструмента при дифолтној вредности CE од -35 V.

Упоредили смо добијени одговор анализата употребом две различите мобилне фазе MeOH/HCOOH 0.1% и ACN/HCOOH 0.1%. Утврдили смо да се добија бољи одговор када се као мобилна фаза користи комбинација MeOH/HCOOH 0.1%.

Пошто смо на GC-MS-у добили прилично чист хроматограм тј. издвојено је само једно једињење m/z 371,25 дошли смо на идеју да добијени метанолни екстракт употребимо за одабир специфичних реакција фрагментације (MRM транзиција), колизионих енергија и волтажа помоћу програма за оптимизацију ових параметара, а који је део софтвера LabSolutions. Масени спектри који су добијени у поступку оптимизације параметара методе приказани су на слици 24.



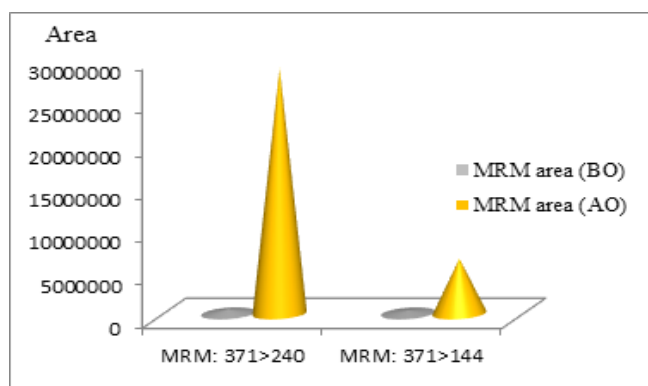
Слика 24: ESI LC-MS/MS, Оптимизација методе: А) Одабир  $m/z$  прекурсор јона, В) Подешавање  $m/z$  прекурсор јона, С) Подешавање енергија судара Collision energy adjustment, D) Одабир  $m/z$  продукт јона, Е) Подешавање  $m/z$  продукт јона, F) Подешавање  $m/z$  продукт јона на три линије прелаза.

Збирни резултат оптимизације MRM параметара методе дат је на слици 25.

Ch	Precursor $m/z$	Product $m/z$	Dwell Time [msec]	Q1 Pre Bias [V]	CE	Q3 Pre Bias [V]	$m/z$	Rel Inten.
Ch1	371.20	240.05	100.0	-26.0	-20.00	-30.0	1 371.20>240.0	100
Ch2	371.20	55.10	100.0	-26.0	-45.00	-22.0	2 371.20>55.10	32
Ch3	371.20	144.05	100.0	-26.0	-45.00	-17.0	3 371.20>144.0	22

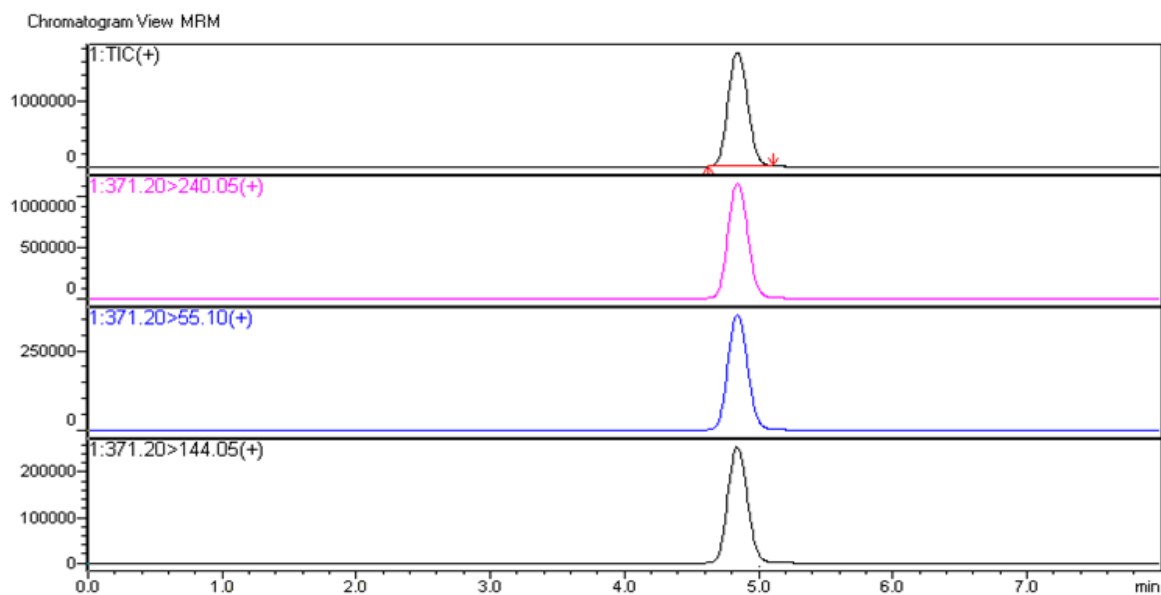
Слика 25: MRM инструментални параметри и релативни интензитети добијени након оптимизације

Уочили смо да је одговор анализата интензивнији након оптимизације инструменталних параметара. Упоредили смо га са одговором добијеним пре оптимизације коришћењем мобилне фазе МеОН/НСООН 0.1%. Резултати поређења су приказани на слици 26.



**Слика 26:** Површина испод хроматографског пика за ММВ-СНМІСА пре (ВО) и после оптимизације (АО) за MRM  $m/z$  371>240 и  $m/z$  371>144 коришћењем МеОН/0.1% НСООН као мобилне фазе.

Снимљени узорак након подешавања инструменталних параметара и одабира мобилне фазе приказан је на слици 27.

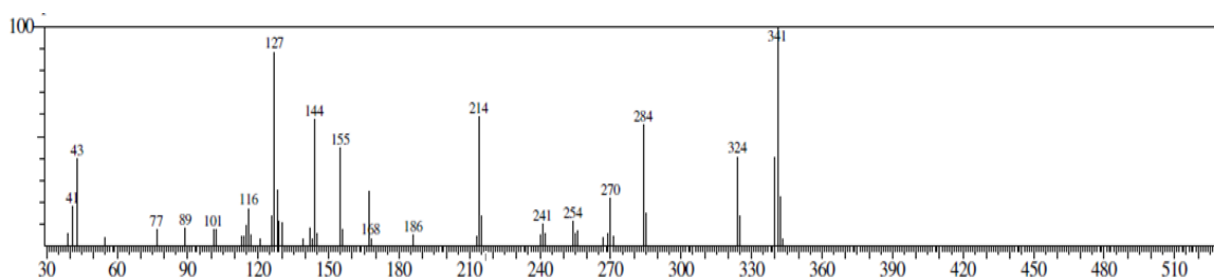


**Слика 27:** ММВ-СНМІСА, MRM хроматограм, LC-MS/MS

На тај начин су подешени услови за циљану анализу ММВ-СНМІСЕ методом LC-MS/MS.

#### 4.1.4. JWH-018 - GC-MS резултати

Масени спектар аналитичког стандарда JWH-018 (1 mg/L у метанолу) снимљен методом GC-MS приказан је на слици 28. За раздвајање је коришћена капиларна колона DB-1MS (RT = 10.04 min). Услови снимања су приказани у одељку 3.7.1., као услови 3.

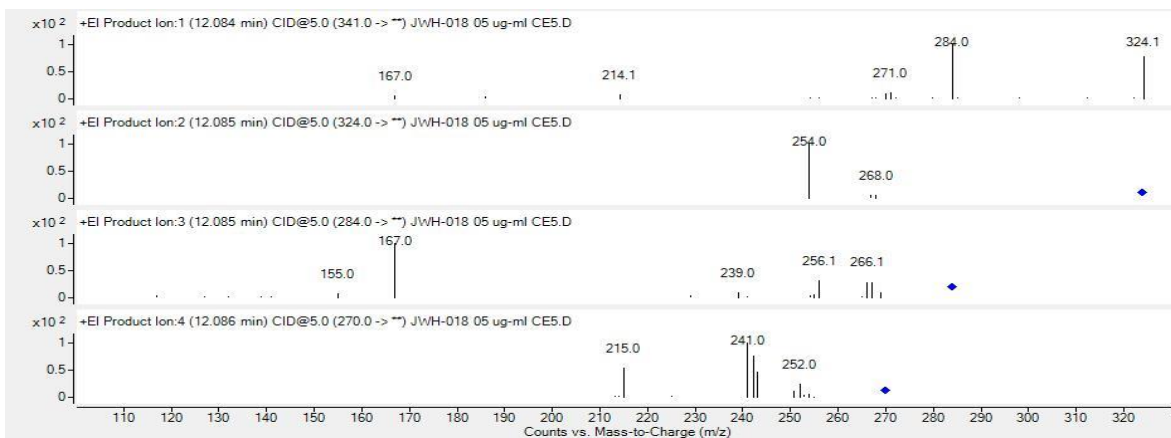


Слика 28: EI GC-MS масени спектар аналитичког стандарда JWH-018

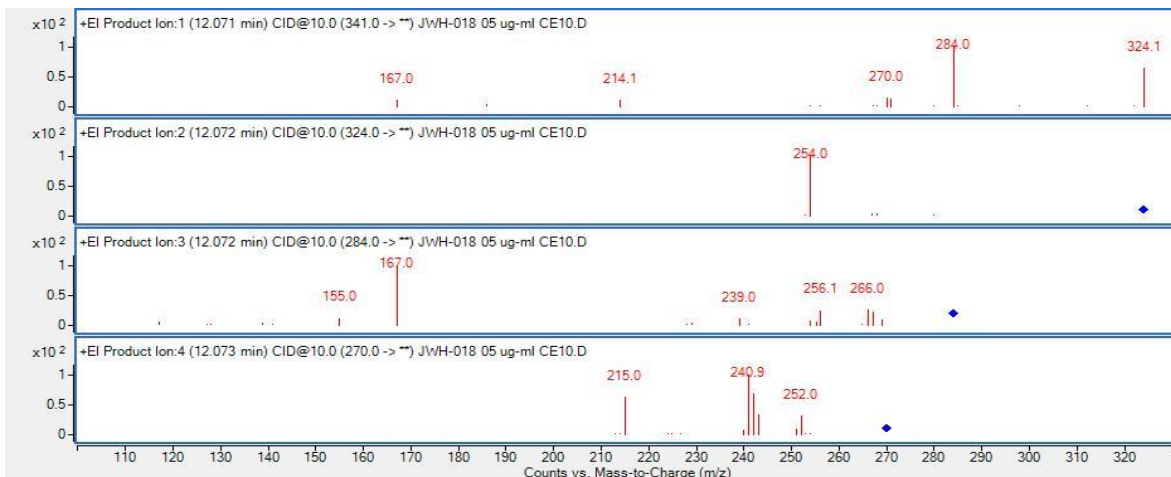
#### 4.1.5. GC-MS/MS – Селекција прекурсор и продукт јона синтетског канабиноида JWH-018

За развој GC-MS/MS методе за праћење специфичних реакција фрагментације (MRM методе) одабрани су  $m/z$  јони 341, 324, 284 и 270 који су селектовани у првом квадруполу (Q1), фрагментисани у колизионој ћелији (q) на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV, а настали специфични јони (продукт јони) праћени су у другом квадруполу (Q2). На основу приноса јонских маса  $m/z$  извршен је одабир прекурсор јона, продукт јона и SE за одговарајући прекурсор.

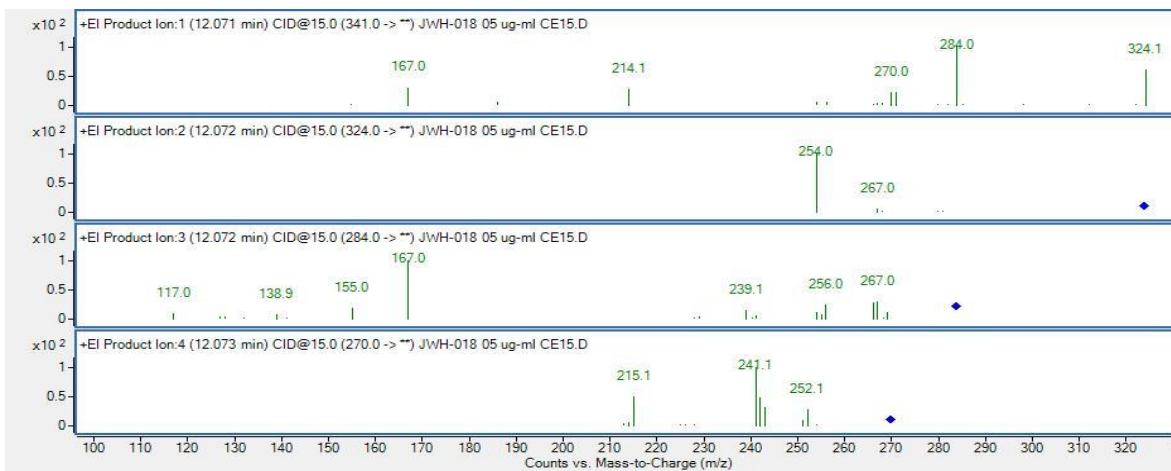
Поступак одабира прекурсор јона и продукт јона као и одговарајућих SE за JWH-018 објашњен је у наредном делу. На сликама 29-34 приказани су производи фрагментације (продукт јони) одабраних  $m/z$  јони 341, 324, 284 и 270 снимљених на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV.



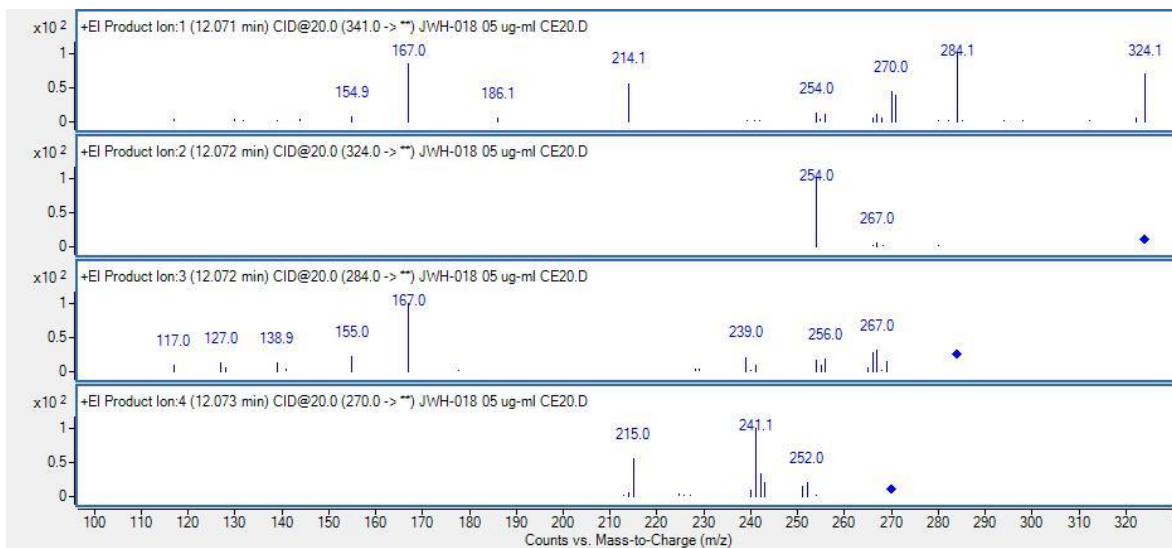
Слика 29: Продукт јони m/z 341, 324, 284 и 270 на 5eV (JWH-18)



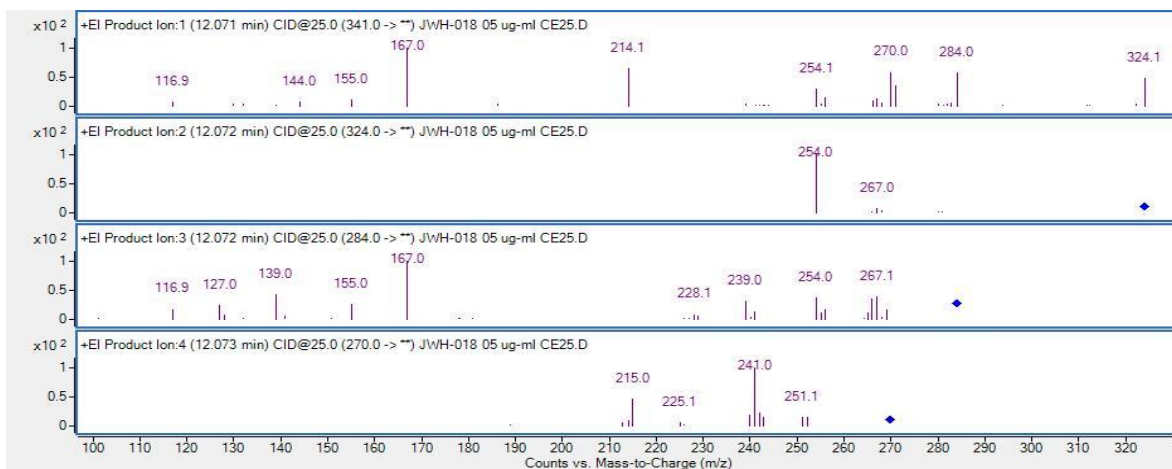
Слика 30: Продукт јони m/z 341, 324, 284 и 270 на 10 eV (JWH-18)



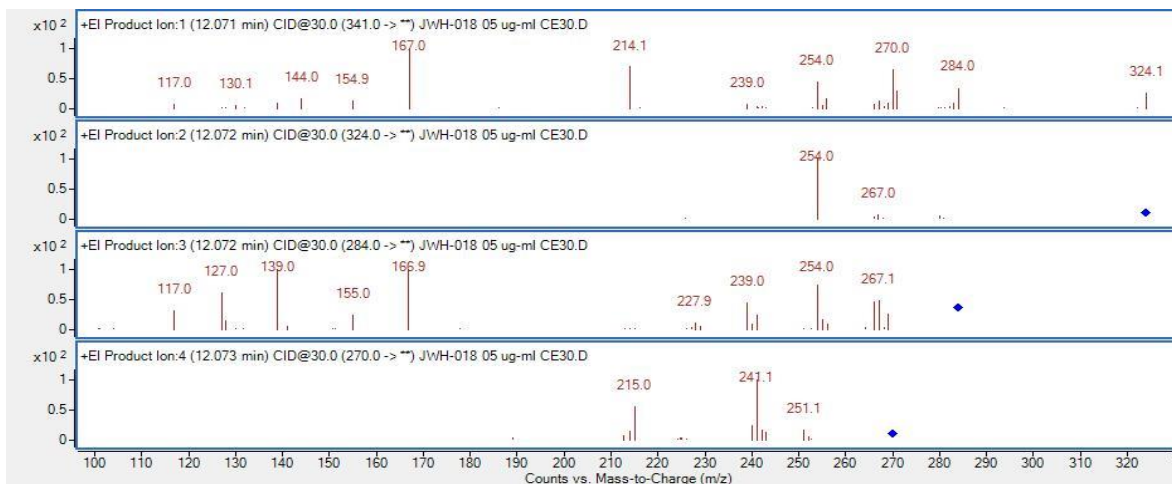
Слика 31: Продукт јони m/z 341, 324, 284 и 270 на 15 eV (JWH-18)



Слика 32: Продукт јони m/z 341, 324, 284 и 270 на 20 eV (JWH-18)



Слика 33: Продукт јони m/z 341, 324, 284 и 270 на 25 eV (JWH-18)



Слика 34: Продукт јони  $m/z$  341, 324, 284 и 270 на 30 eV (JWH-18)

Из добијених масених спектра уочава се очекивано већа фрагментација на вишим енергијама судара у колизионој ћелији. Табеларно су приказане масе издвојених фрагмената за јон  $m/z$  341 (табела 7).

Табела 7: Фрагменти  $m/z$  341 настали на CE 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV

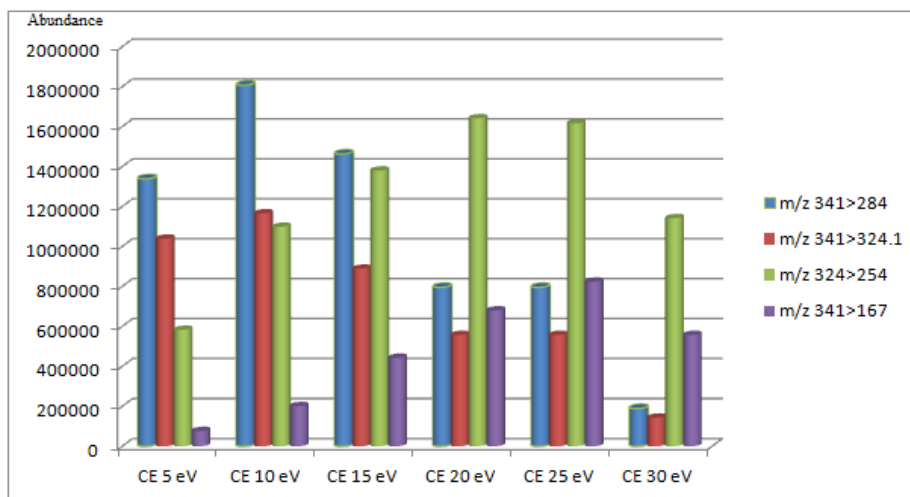
CE 5 eV $m/z$ 341	CE 10 eV $m/z$ 341	CE 15 eV $m/z$ 341	CE 20 eV $m/z$ 341	CE 25 eV $m/z$ 341	CE 30 eV $m/z$ 341
<b><math>m/z</math></b>	<b><math>m/z</math></b>	<b><math>m/z</math></b>	<b><math>m/z</math></b>	<b><math>m/z</math></b>	<b><math>m/z</math></b>
167	167	167	155	116.9	117
214.1	214.1	214.1	167	144	130.1
270	270	270	186.1	155	138.9
271	271	271	214.1	167	144
284	284	284	254	214.1	154.9
324.1	324.1	324.1	256	254.1	167
			266.1	256.1	214.1
			267	266.1	239

CE 5 eV m/z 341	CE 10 eV m/z 341	CE 15 eV m/z 341	CE 20 eV m/z 341	CE 25 eV m/z 341	CE 30 eV m/z 341
			268	267	254
			270	268.1	255
			271	270	256
			284.1	271	266
			322.1	282.9	267.1
			324.1	284	269.1
				324.1	270
					270.9
					283
					284
					324.1

Из добијених масених спектра се такође уочава да су најинтензивнији фрагменти настали прелазом јона  $m/z$  341 у јоне  $m/z$  284,  $m/z$  324.1 и  $m/z$  167 (на вишим CE). Такође висок принос (abundance) имамо и за јона  $m/z$  254 насталог фрагментацијом  $m/z$  324 па је и он узет у обзир приликом разматрања одабира прекурсор јона.

Приноси најинтензивних јонских маса добијених фрагментацијом  $m/z$  341 и  $m/z$  324 јона су графички приказани (слика 35).



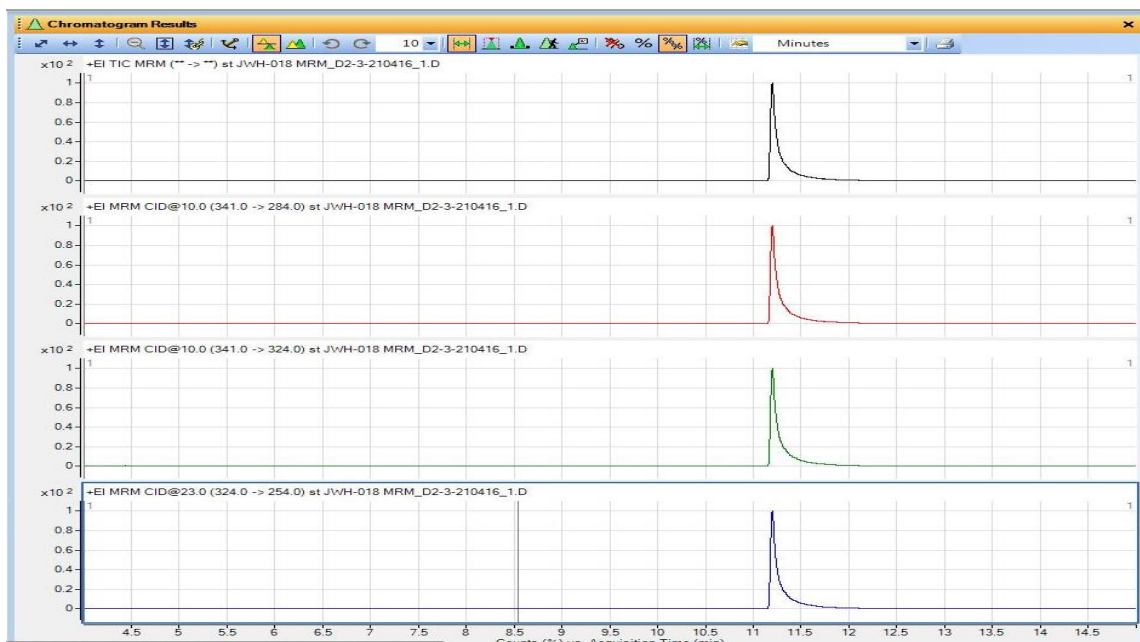


**Слика 35:** Графички приказ обилности јона насталих фрагментацијом на различитим CE

Из датог графика се види да се највећи принос  $m/z$  јона добија за транзиције  $m/z$  341>284, 341>324 и 324>254 на вредности CE од 10 eV, На вишим CE добија се фрагмент 341>167 али има нижи принос од свих анализираних прелаза.

Како се на вредностима CE између 20 и 25 eV добијају високи приноси за прелаз  $m/z$  324>254 накнадним снимањем MRM реакција на CE између 20 и 25 eV (20, 22, 23 и 25 eV) утврђено је да се највећи принос добија када је CE 23 eV. На тај начин су одабрани прекурсор јони, продукт јони и CE за MRM методу за идентификацију и одређивање JWH 018.

Селектоване су три специфичне реакције прелаза јона 341>324, 341>284 и 324>254 (CE 10, 10 и 23 eV) у MRM моду (*Multiple Reaction Monitoring*) за идентификацију и квантитативну анализу JWH 018. На слици 36 приказан је стандардни раствор JWH-18 100 mg/L снимљен у дефинисаном MRM моду и постављеним хроматографским условима.



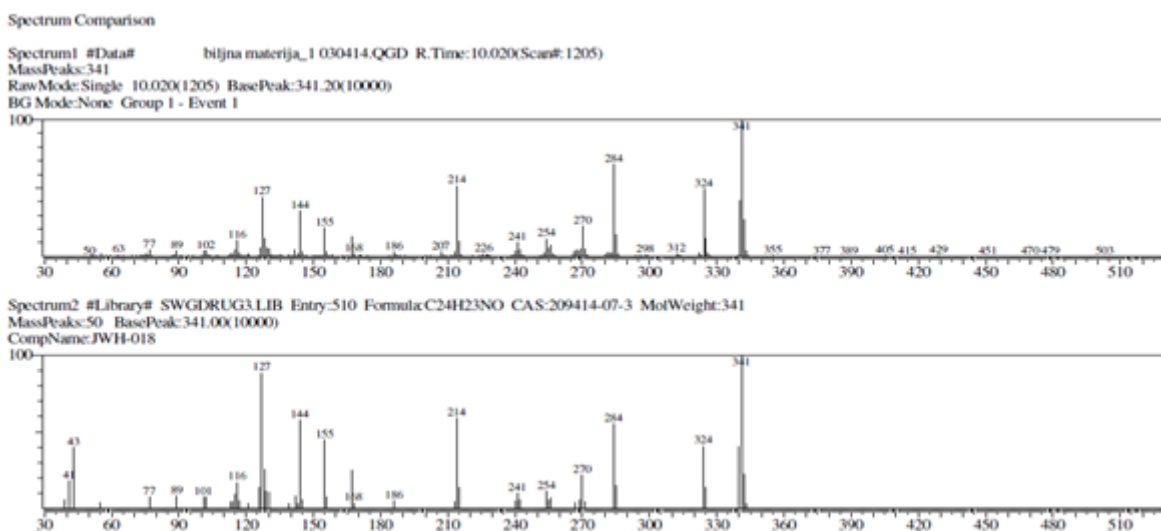
Слика 36: Одабране MRM транзиције – стандард JWH-18 100 mg/L

#### 4.1.6. Примена методе на реалним узорцима - приказ случаја

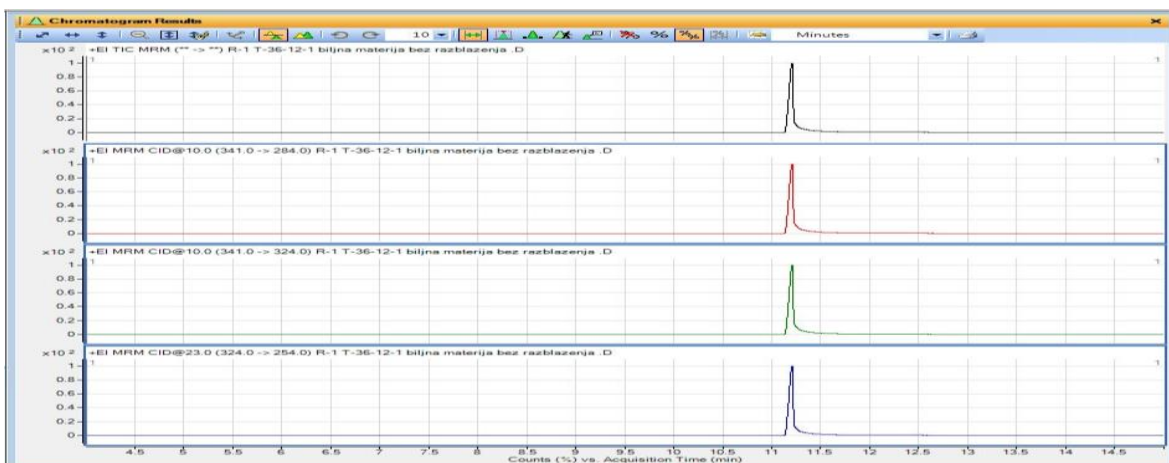
Постављеном GC-MS/MS методом анализирана су три узорка биљног материјала која су била предмет вештачења по налогу тужилаштва. Узорци су дотављени на анализу са захтевом да се уради анализа на присуство ТХЦ-а, активног принципа биљке канабис, због сумње да се ради о њеном илегалном производу марихуани.

Постојећим токсиколошким скринингом није утврђено присуство ТХЦ-а али ни JWH-018 који тада није ни био на Листи психоактивних контролисаних супстанци у Републици Србији. У првом скринингу узорци су анализирани на поларнијој колони DB17 MS, температурни програм је био другачији (услови 1, поглавље 3.7.1), није дошло ни до издвајања хроматографског пика, а у бази података није било овог једињења тако да није ни идентификовано. Неколико година касније уследио је нови захтев да се поново уради анализа на присуство психоактивних супстанци. Тада је JWH-018 већ био под контролом, тј. налазио се на Листи психоактивних контролисаних супстанци. У међувремену је апдејтована библиотека са

новодизајнираним дрогама, а проширене су и информације о појави нових дрога на тржишту. Анализа је поново рађена, такође методом GC-MS, сада на неполарној колони под другим хроматографским условима (услови 3, одељак 3.7.1.). Поређењем снимљеног EI Full SCAN масеног спектра узорка биљног материјала са базом података SWDRUG утврђено је да се у свим узорцима налази JWH-018, слика 37. Исти узорци су поново припремљени и анализирани новом методом тандем масене спектрометрије. На слици 37 је приказан масени спектар идентификованог синтетичког канабиноида JWH-018 у једном од узорака биљног материјала. Постављена нова метода је на овај начин потврђена на реалним узорцима.



Слика 37: EI GC-MS масени спектар JWH-18 у узорку биљног материјала



**Слика 38:** JWH-018 у узорку биљног материјала анализаног описаном методом након одабира одговарајућих MRM транзиција и CE

Овај случај указује на комплексност проблема у аналитици новодизајнираних дрога. У рутинском раду токсиколошке лабораторије се у великој мери ослањају на базе података масених спектра у доступним библиотекама ради идентификације или бар сумње на постојање неког токсиколошки важног једињења. Уколико су хроматографски услови неодговарајући, и додатно у бази података не постоји једињење за поређење, а уз то је и захтев суда усмерен на сасвим друго једињење лако може доћи до пропуста у идентификацији једињења од значаја које је заправо присутно у узорку. Уз то недостатак аналитичких стандарда је још једна отежавајућа реалност. Без провере методе скрининга аналитичким стандардом испитиваног једињења, или претходног искуства о могућностима идентификације под одређеним хроматографским условима аналитичар не може дати одговор на питање да ли је неко једињење могуће идентификовати или не. Добро је да лабораторија, уколико за то постоје могућности има снимљене масене спектре на различитим инструментима и под различитим хроматографским условима да би у случају сумње могла да бар двема методама потврди или одбаци сумњу на постојање једињења од токсиколошког значаја.

Наведене методе GC-MS и GC-MS/MS су погодне за анализу синтетичког канабиноида JWH-018 у биљном материјалу.

## 4.2. Одабране новодизајниране дроге - LC- MS/MS резултати

Развијена је метода за токсиколошки скрининг 16 новодизајнираних психоактивних молекула тј. оних који се у новије време налазе на илегалном тржишту дрога. Спроведен је поступак оптимизације за праћење по три селектоване реакције фрагментације, симултано за једињења из групе синтетичких катинона (мефедрон, MDPV, метилон), фенетиламина (25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 2C-B), синтетичких опиоида (АН-7921), синтетичких канабиноида (JWH-018, JWH-073, AM-2201), пиперазина (BZP, mCPP) и арилциклохексиламина (кетамин, норкетамин). Оптимизација је урађена на начин описан у поглављу 4.1.3. где је аналит био синтетички канабиноид ММВ-СНМІСА.

### 4.2.1. LC- MS/MS – резултати селекције прекурсор и продукт јона одабраних новодизајнираних психоактивних једињења

За свако једињење снимљен је Q1 и Q3 scan у позитивном и негативном моду да би се проверило који вид ESI јонизације је потребно применити. У позитивном моду сва једињења су дала боље одговоре тако да је одабран позитиван режим рада. Такође је на овај начин проверено и које јонске врсте настају у поступку јонизације. Сва једињења су дала протоноване молекуле  $M+H^+$ . Снимљени Q1 и Q3 scan масени спектри свих 15 једињења дати су у прилогу (прилог 5 до 19). Резултати одабраних параметара за праћење аналита, снимљених у по шест ранова за сваки аналит приказани су у табели 8. Оптимизованој методи која обухвата потребне параметре за масену анализу свих 15 једињења прикључен је и синтетички канабиноид ММВ-СНМІСА чија је оптимизација претходно описана (4.1.3.). На тај начин смо добили MRM реакције за праћење, тј. идентификацију и квантитативну анализу 16 новодизајнираних молекула из различитих хемијских група.

Табела 8: Одабране транзиције MRM и CE за NPS

Назив једињења	RT (min)	Прекурсор јон (m/z)	Продукт јон (m/z)	Релативни интензитет транзиција	Dwell time (msec)	Q1 (pre bias)	CE (V)	Q2 (pre bias)
Мефедрон	2.889	177.75	160.10	100	100	-30	-15	-18
			145.0	71	100	-30	-20	-17
			144.05	34	100	-30	-35	-30
АН-7921	3.636	330.05	285.05	100	100	-13	-20	-22
			46.15	98	100	-13	-25	-19
			172.85	69	100	-13	-30	-19
25B-NBOMe	2.652	381.80	121.10	100	100	-30	-20	-26
			91.10	61	100	-30	-50	-19
			93.15	7	100	-30	-40	-20
25C-NBOMe	2.740	337.05	121.0	100	100	-28	-20	-26
			122.10	75	100	-28	-20	-27
			91.10	61	100	-28	-45	-19
25I-NBOMe	2.663	427.80	120.90	100	100	-30	-25	-26
			91.05	55	100	-30	-50	-20
			93.05	5	100	-30	-40	-20
BZP	2.750	176.75	91.10	100	100	-30	-25	-20
			65.10	18	100	-30	-50	-26
			85.10	11	100	-30	-15	-19
JWH-018	3.909	342.15	154.95	100	100	-30	-25	-12
			127.05	76	100	-30	-45	-26
			214.0	15	100	-30	-25	-24
AM-2201	3.584	360.15	155.05	100	100	-14	-30	-18
			127.0	79	100	-14	-50	-26
			232.0	13	100	-14	-30	-30
MDPV	3.498	275.85	126.10	100	100	-30	-30	-27
			135.0	63	100	-30	-30	-28
			175.0	49	100	-30	-25	-21
Метилон	2.853	207.75	160.0	100	100	-30	-20	-19
			132.05	45	100	-30	-30	-15
			190.05	42	100	-30	-15	-15
JWH-073	3.765	327.90	154.95	100	100	-30	-25	-18
			127.0	79	100	-30	-50	-25
			200.05	15	100	-30	-25	-240

Табела 8: Одабране транзиције MRM и CE за NPS – наставак табеле

Назив једињења	RT (min)	Прекурсор јон (m/z)	Продукт јон (m/z)	Релативни интензитет јона	Dwell time (msec)	Q1 (pre bias)	CE (V)	Q2 (pre bias)
mCPP	3.523	197.15	154.0	100	100	-30	-20	-18
			119.10	62	100	-30	-25	-25
			118.10	47	100	-30	-35	-14
2 CB	2.127	261.05	243.90	100	100	-18	-15	-19
			228.85	27	100	-18	-25	-24
			213.90	10	100	-18	-35	-25
Кетамин	3.533	238.20	125	100	100	-30	-30	-25
			207	32	100	-30	-15	-16
			179	26	100	-30	-20	-20
Норкетамин	3.538	224.20	125	100	100	-30	-25	-26
			207	79	100	-30	-10	-16
			179.05	32	100	-30	-15	-14
ММВ СНМІСА	3.795	371.20	240.05	100	100	-26	-20	-30
			53.10	32	100	-26	-45	-22
			144.05	22	100	-26	-45	-17

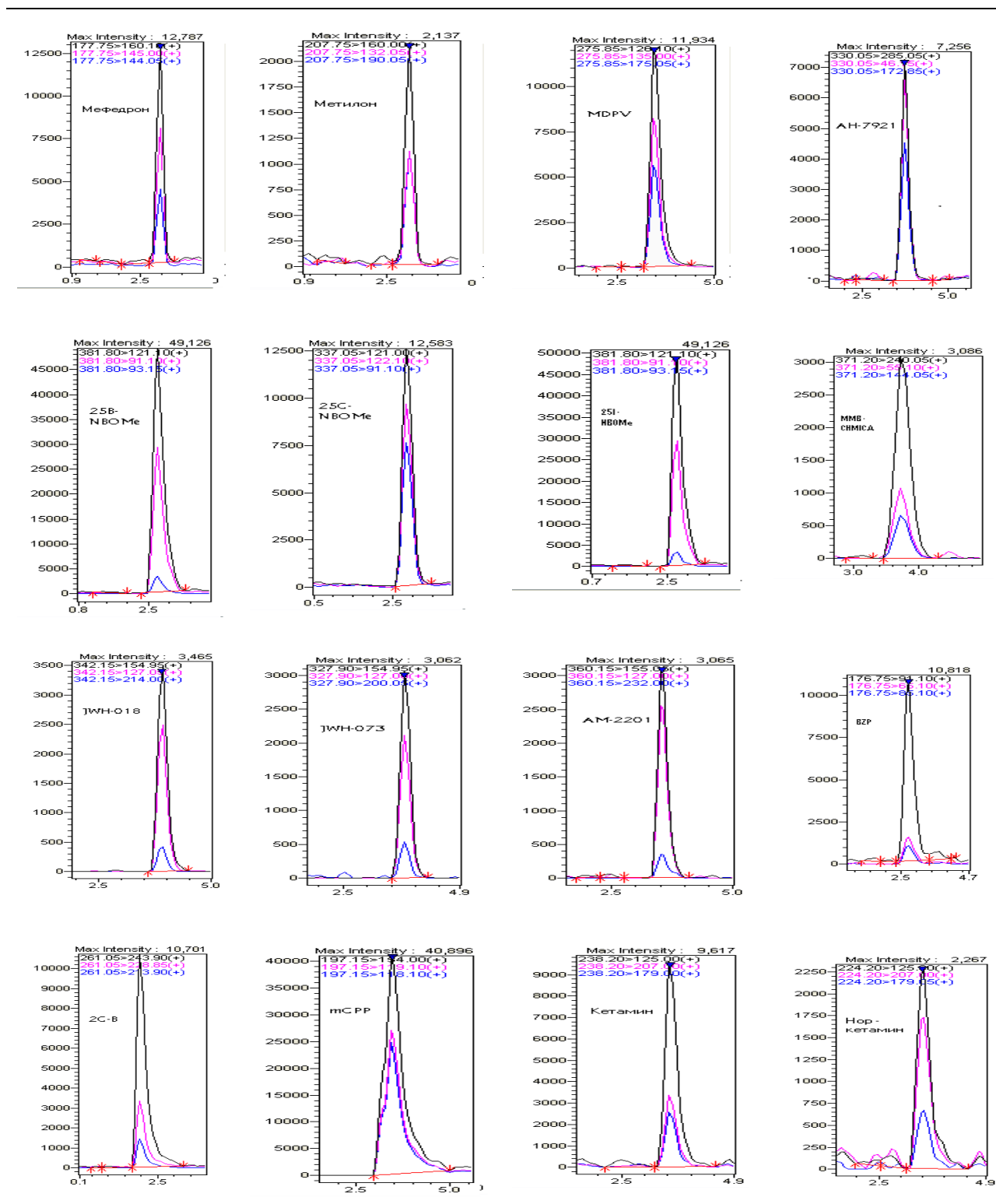
Релативни интензитет транзиција дат је на концентрационом нивоу од 0.1 mg/L.

За хроматографско раздвајање испробане су две различите колоне. Раздвајање је било добро и на колони Kinetex® и колони XTerra MS. Испробани су и различити градијентни програми са комбинацијом мобилних фаза MeOH/HCOOH 0.1% и ACN/HCOOH 0.1%. Као и у случају хроматографског раздвајања претходно анализираниог синтетичког канабиноида ММВ-СНМІСЕ, комбинација MeOH/HCOOH 0.1% је дала боље одговоре анализата. У методама LC/MS/MS које се користе за анализу психоактивних супстанци, било класичних или новодизајнираних често се користе испарљиви амонијачни пуфери (амонијум фомијат или ацетат) (155). Ми смо их избегли због додатних корака потребног филтрирања мобилне фазе. Такође је чешћа појава да се колона запуши када се користе раствори пуфера. На крају смо одабрали изократски програм и колону XTerra MS (услови 5, поглавље 3.7.5.).

#### **4.2.2. Примена методе LC- MS/MS на реалним узорцима**

Масени хроматограми одабраних MRM прелаза оптерећених урина новодизајнираним дрогама, концентрација 0,1 mg/L приказани су на слици 39. На основу релативних интензитета јона, датих у табели 8, свака од анализираних NPS задовољава критеријуме идентификације на концентрационом нивоу од 0,01 mg/L што значи да је метода одговарајућа за токсиколошки скрининг наведених једињења.

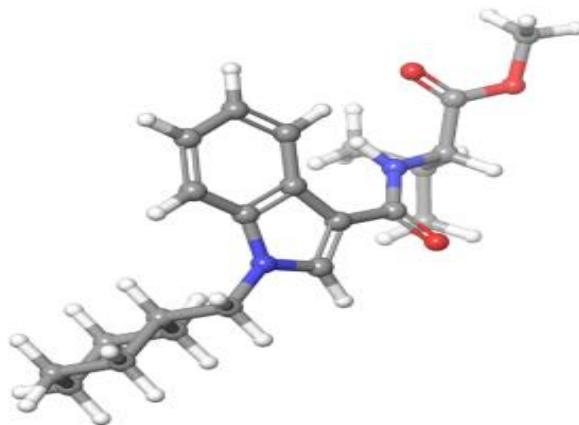




Слика 39: Масени хроматограми одабраних MRM прелаза оптерећених урина новодизајнираним дрогама, концентрација 0.1 mg/L

### 4.2.3. Резултати конформационе анализе NPS

Глобални минимум за нову психоактивну супстанцу ММВ-СНМІСА је нађен пет пута међу 10000 структура. Има енергију једнаку  $-102.27$  кЈ мол $^{-1}$ . Структура показује конформацију столице за циклохексански прстен, и два прстена са незасићеним везама који су у равни (слика 40).



**Слика 40:** Структура глобалног минимума за ММВ-СНМІСА добијена помоћу програма Мацромодел.

Хлороформ као растварач узет је са разлогом зато што је раније утврђено да је најчешће узимана диелектрична константа за протеин 4, унутар протеина према најскоријем истраживању 6-7 (156), и унутар нуклеинских киселина 2 (157). Стога, а и из разлога што се ради о ригидном молекулу, добијена конформација се може сматрати са високим степеном поузданости биоактивном конформацијом и узети у даља компјутерска истраживања везивања датог молекула за одговарајуће рецепторе коришћењем молекулског докинга (158).

По први пут смо показали и просторни изглед групе познатих новодизајнираних психоактивних супстанци (мефедрон, АН-7921, 25В-НВОМе, 25С-НВОМе, 25І-НВОМе, ВЗР, АМ-2201, МDPV, метилон, ЈWH-018, и 2С-В), који су релативно једноставни и мали молекули. У том случају конформациона анализа је поуздано оруђе за предвиђање биолошки активних конформација (прилог 20) (159).

Конформациону анализу смо такође користили за предвиђање физичко-хемијских особина изабраних илегалних дрога (160). Раније је компјутерско моделовање коришћено за објашњавање интеракција између неких психоактивних супстанци (супституисаних катинона и бензофурана) и транспортера означавајући главне аминокиселине у везивним џеповима транспортера које утичу на афинитет дрога (161). Слично томе, молекулски докинг је коришћен за предвиђање интеракција селектованих синтетичких катинона са комплексом SAP97 PDZ2 са 5-HT<sub>2A</sub> рецепторским пептидом (162). Такође, три QСАР модела су развијена за предвиђање афинитета лиганата за  $\mu$ -опиоидни рецептор (163). DFT калкулације су показане као ефикасно оруђе за предвиђање инфрацрвених и Раманских спектра новосинтетисаних катинона (164).

### 4.3. Анализа метаболита хероина у ткиву јетре

Одвајање анализата од интереса из биолошког матрикса представља прву фазу аналитичког процеса. Метода чврсто течне екстракције је успешно примењена на анализу ткива јетре. Резултати ће бити приказани у наредним поглављима.

#### 4.3.1. GC-MS - резултати

За потребе овог рада и анализу опијата 6-моноацетилморфина, морфина и кодеина у узорцима ткива јетре постојећа GC-MS метода је модификована, скраћивањем времена анализе и увођењем истовременог праћења деутеризованих интерних стандарда. Употреба деутеризованих интерних стандарда се препоручује у масеној спектрометрији. Деутеризовани аналог додаје се узорку пре почетка екстракције и „трпи“ исте услове као и сам аналит, како у поступку припреме узорка тако и у току инструменталне анализе па је њихово укључивање корисно, а у последње време и обавезујуће приликом квантитативне анализе.

У табели 9 приказани су селектовани јони праћени у Scan/SIM и SIM режиму рада. У Scan/SIM моду врши се наизменично скенирање свих јонских маса  $m/z$  и

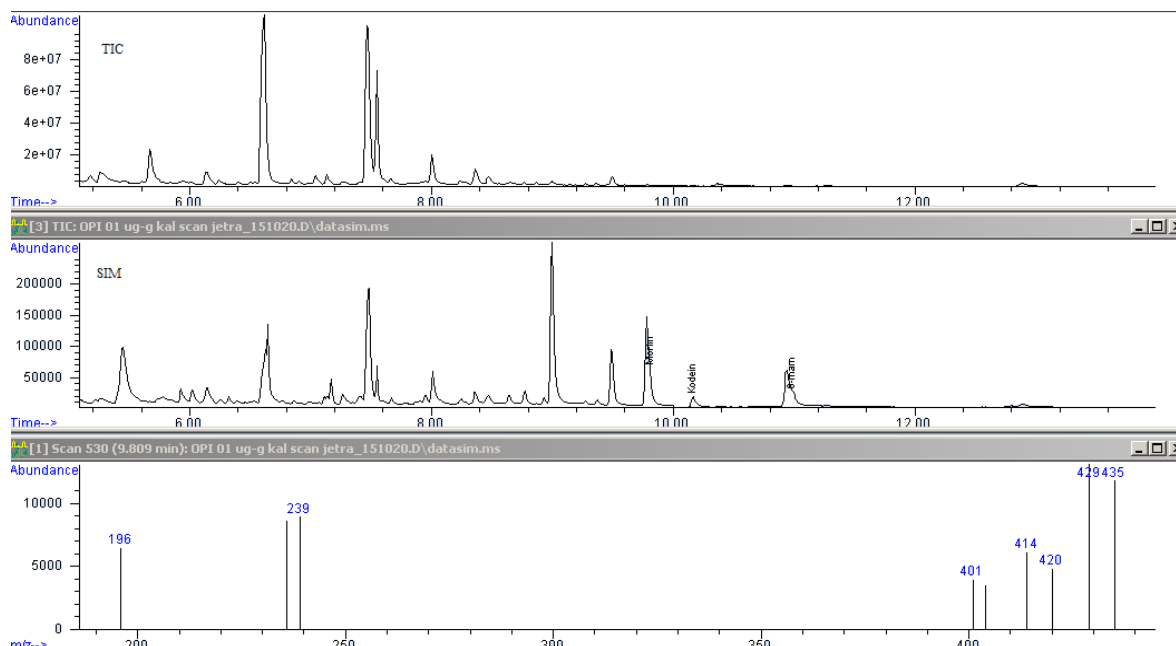
селектованих  $m/z$  у задатом опсегу праћења (опсег ретенционог времена) док се у SIM режиму рада прате само селектовани  $m/z$  јони.

**Табела 9:** Селектовани јони опијата и IS праћени у Scan/SIM и SIM моду

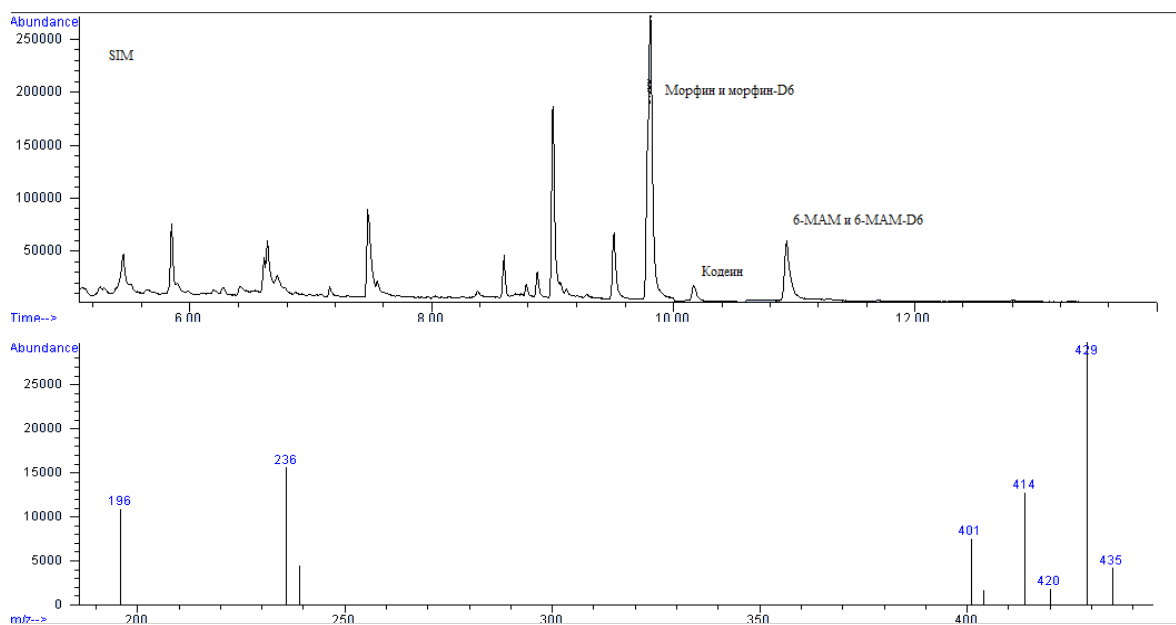
Назив једињења	RT (min)	SIM (m/z) јони	Релативни интензитет јона	Тип јона
6-мам - TMS	11.047	399	100	Target
		340	54.8	Q1
		287	24.9	Q2
		204	11.10	Q3
6-мам-D6 - TMS	10.992	405	100	Target
		343	56.9	Q1
		290	26.3	Q2
Морфин - 2TMS	9.84	429	100	Target
		414	44.5	Q1
		401	25.8	Q2
		236	44.0	Q3
Морфин-D6 -2TMS	9.82	435	100	Target
		420	43	Q1
		404	31.5	Q2
		239	57.9	Q3
Кодеин -TMS	10.20	371	100	Target
		234	24.5	Q1
		196	28.8	Q2
		178	33.2	Q3

Сматра се да је у SIM моду за идентификацију довољно доказати тзв. циљани јон и два потврдна јона с тим да се ретенционо време поклапа са ретенционим временом стандарда, и да релативни однос потврдних јона (квалификатора, енг. qualifier, Q) не одступа више од 20%.

На слици 41 је приказан узорак ткива свеже јетре, спајкован опијатима концентрације 0,1  $\mu\text{g/g}$  снимљен у Scan/SIM моду. На слици 42 је приказан реалан узорак ткива свеже јетре анализиран у SIM моду (узорак број 6, поглавље 4.3.2).



Слика 41: Scan/SIM. Јетра спајк, морфин, кодеин, 6-МММ са IS, 0,1  $\mu\text{g/g}$



Слика 42: SIM. Јетра, свежа, реални узорак, број 6

Овом методом анализирано је шест парова свежје јетре и јетре из формалина (3.6.2.1). У узорцима свежје јетре идентификовани су морфин и/или кодеин. У узорцима јетре из формалина ови аналити нису детектовани. Резултати добијени овом методом и методом GC-MS/MS приказани су у поглављу (4.3.3.).

### 4.3.2. GC-MS/MS - резултати

За потребе успостављања методе за праћење одређених (више) реакција фрагментације у тзв. MRM режиму рада одабраних опијата изведен је исти поступак као и онај описан у поглављу 4.1.5.. На основу снимљених масених спектра TMS деривата 6-моноацетилморфина, морфина и кодеина и деутеризованих IS 6-моноацетилморфина-D6 и морфина-D6 одабрани су следећи  $m/z$  јони: 399 за 6-моноацетилморфин, 429 за морфин, 371 за кодеин, 405 за 6-моноацетилморфин-D6 и 435 за морфин-D6. Наведени  $m/z$  јони селектовани су у првом квадруполу (Q1), фрагментисани у колизионој ћелији (q) на 5, 10, 15, 20, 25 и 30 eV; настали специфични јони фрагмената (продукт јони) праћени су у другом квадруполу (Q2). На основу приноса јонских маса  $m/z$  насталих фрагмената извршен је одабир прекурсор јона, продукт јона и CE за одговарајући прекурсор.

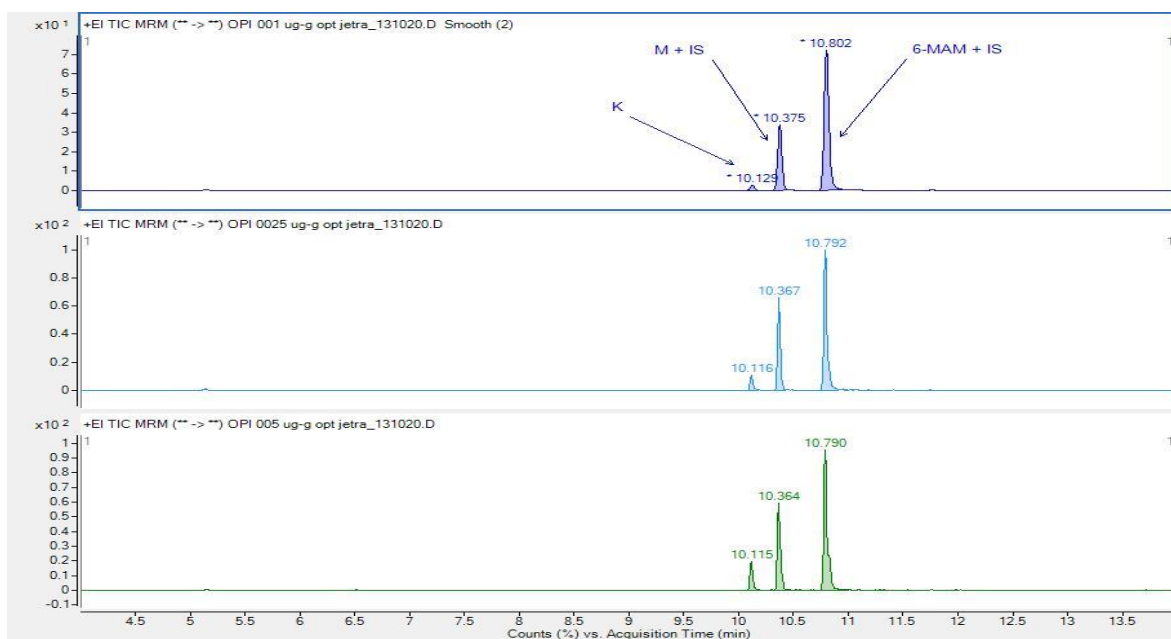
Одабране специфичне реакције фрагментација, са прекурсор, продукт јонима и одговарајућим колизионим енергијама приказане су у табели 10. За деутеризоване IS препорука је да се прати једна специфична реакција фрагментације, тако да је из тог разлога одабрана једна транзиција (прелаз).

**Табела 10:** Одабране транзиције MRM и CE – опиоиди са IS

Назив једињења	RT (min)	MRM ( $m/z$ )	Релативни интензитет јона	CE (V)
6-мам - TMS	10.828	399>204	100	10
		399>287	49.8	17
		399>340	40.6	13
6-мам-D6 - TMS	10.794	405>290		20
Морфин - 2TMS	10.39	429>287	100	23
		429>220	64.3	23
		429>234	59.7	23
Морфин-D6 -2TMS	10.366	435>293		21
Кодеин -TMS	10.123	371>234	100	17
		371>229	98.3	15
		371>178	58.9	15

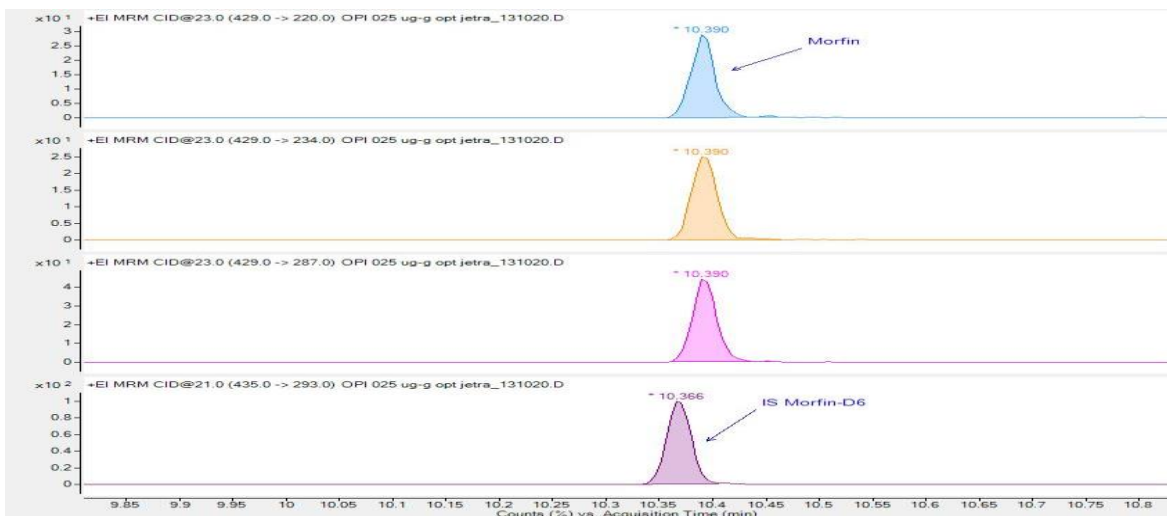
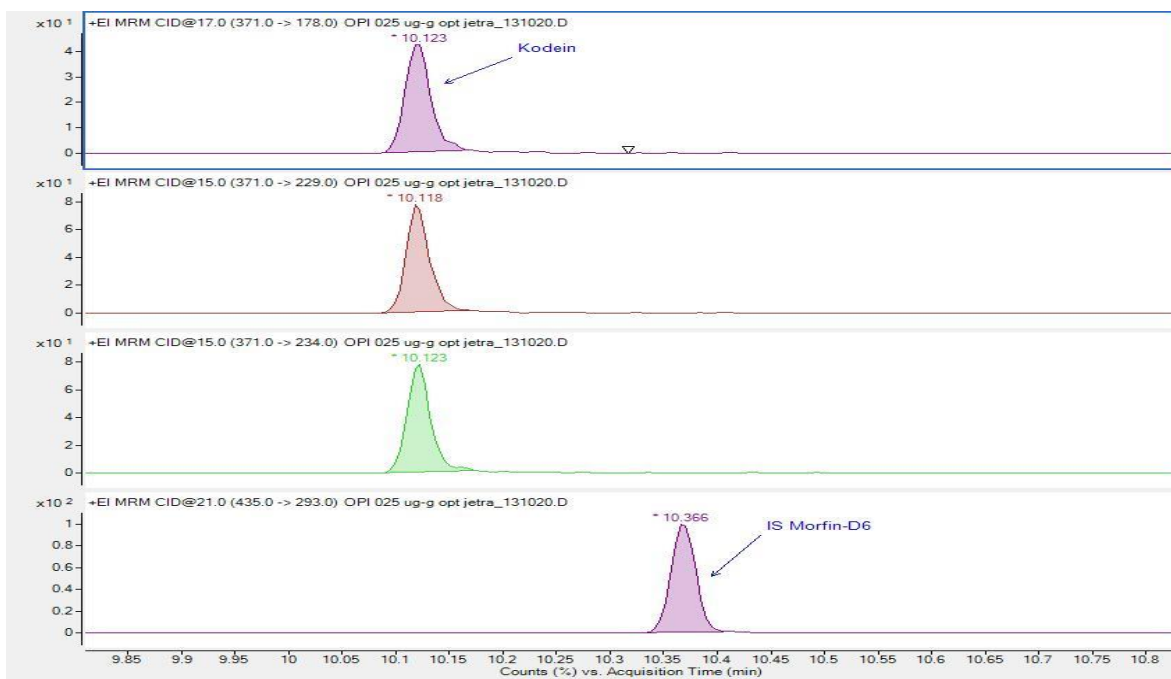
Метода са селектованим MRM за морфин, кодеин и 6-моноацетилморфин се након њеног успостављања 2015. године користи у рутинском раду у токсиколошкој лабораторији Института за судску медицину за идентификацију селектованих опиоида у свим биолошким течностима крви, урину, течности стакластог тела, као и коси. Деутеризовани IS су уведени за квантитативну анализу у ткиву јетре.

Укупни јонски хроматограм, TIC за три тачке калибрационе криве приказан је на слици 43.

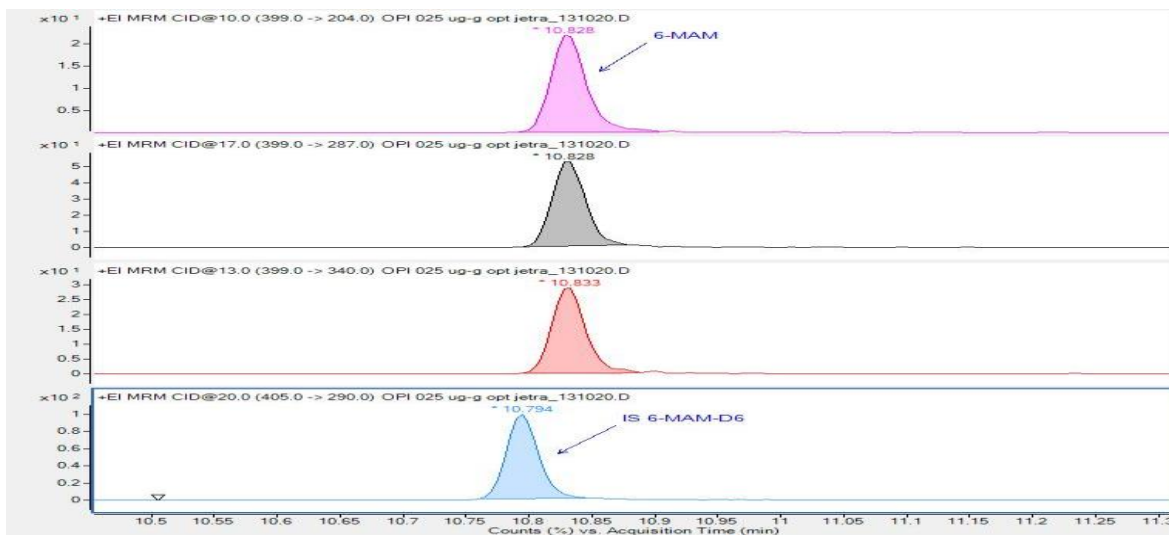


**Слика 43:** TIC – MRM, јетра спајк, морфин, кодеин и 6-МAM са IS, 0,01 $\mu\text{g/g}$ , 0,025 $\mu\text{g/g}$  и 0,05 $\mu\text{g/g}$

На сликама 44, 45 и 46 на којима су приказане MRM транзиције за морфин, кодеин и 6-МAM одвојено, види се да су пикови лепо раздвојени од деутеризованих интерних стандарда.

Слика 44: MRM - Морфин 0,025  $\mu\text{g/g}$  са IS, јетра спајкСлика 45: MRM - Кодеин 0,025  $\mu\text{g/g}$  са IS, јетра спајк

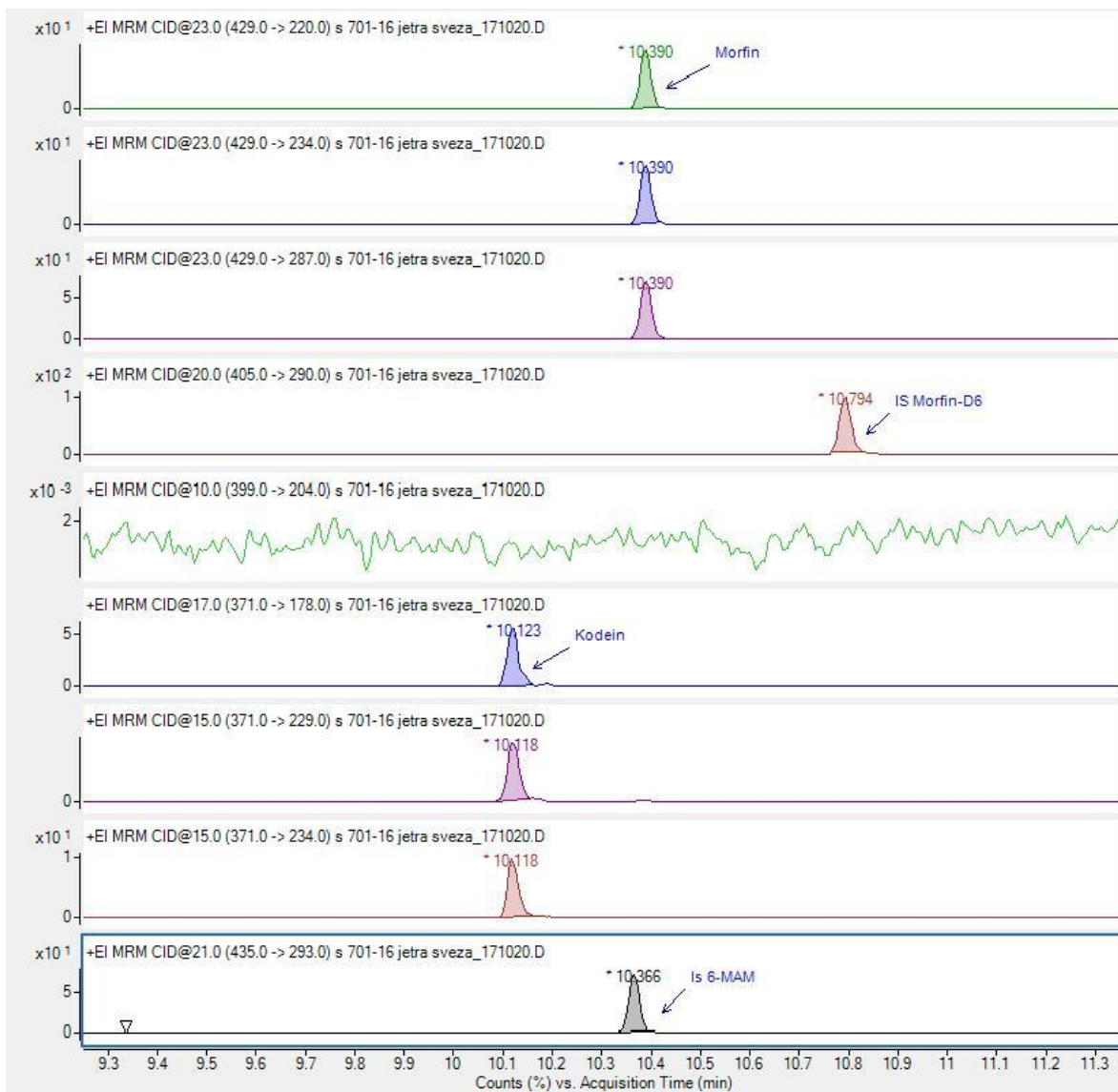




Слика 46: MRM – 6-МАМ 0,025  $\mu\text{g/g}$  са IS, јетра спајк

Збирни приказ MRM за сва три анализата дат је у прилогу 23.

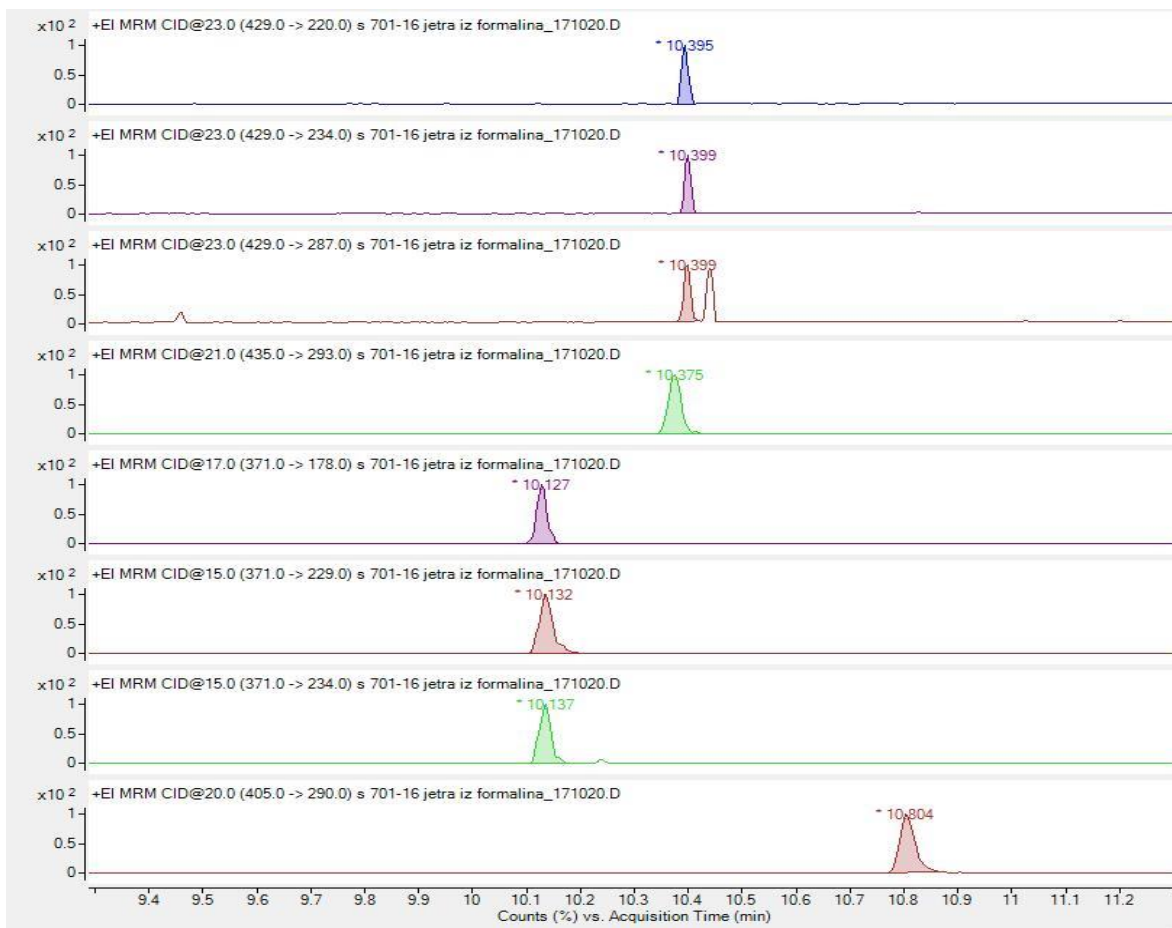
На слици 47 приказан је MRM хроматограм реалног узорка свеже јетре, узорак 4.



Слика 47: MRM хроматограм реалног узорка свеже јетре, узорак 4

Визуелним прегледом овог хроматограма закључујемо да је позитиван на присуство морфина и кодеина, али да у овом узорку нема 6-МAM зато што на прелазу који му одговара, нема хроматографског пика.

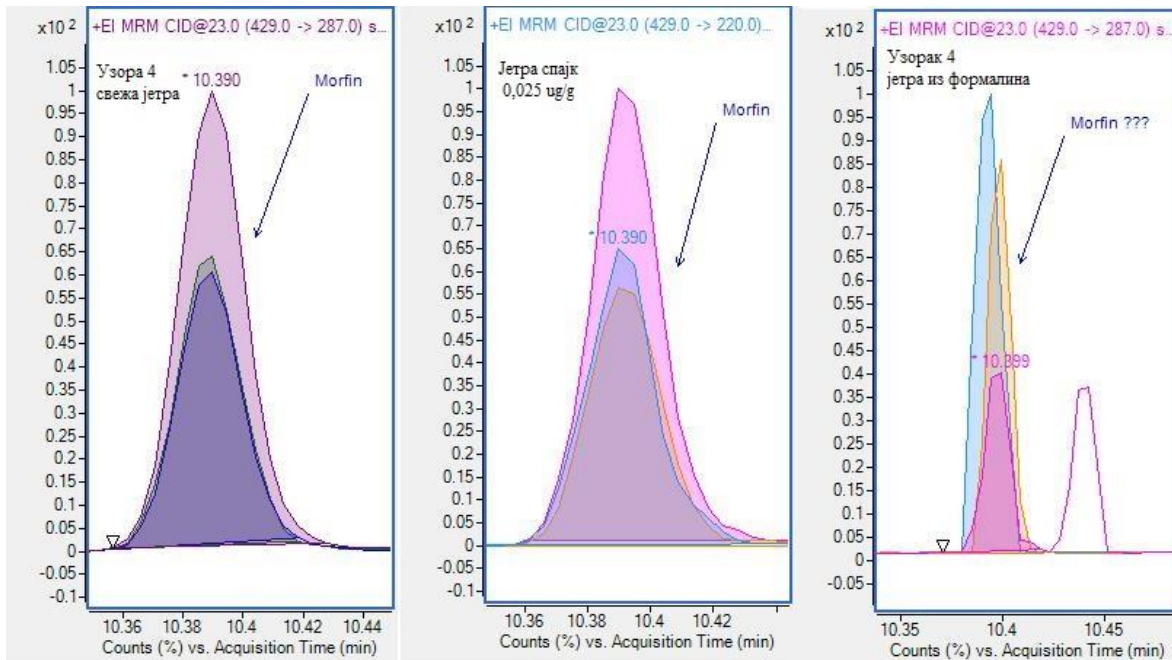
На слици 48 је приказан узорак истог случаја, број 4 али након фиксирања формалином и чувања у замрзивачу. За морфин се уочавају три хроматографска пика тако да би се визуелним прегледом могло рећи да у овом узорку има морфина и кодеина.



Слика 48: MRM хроматограм реалног узорка свеже јетре из формалина, узорак 4

Међутим преклапањем ових MRM прелаза (слика 49) за морфин, који су у ствари селектоване реакције фрагментације и поређењем са снимљеним спајкованим стандардом уочавамо да њихов однос није исти и да бисмо морали са одређеном сигурношћу да потврдимо или одбацимо овај резултат. Овај сликовит приказ је дат због тога што аналитичари у пракси често имају дилему да ли је једињење недвосмислено идентификовано или не. Међутим потврда идентитета требало би да буде објективна и поуздана, и да не зависи од субјективног тумачења аналитичара (165). За то нам служе, између осталог и дефинисани релативни односи јона које смо поставили приликом успостављања методе, табела 10. И визуелно се уочава да однос селектованих реакција не одговара односу прелаза за аналитички стандард тако да не бисмо смели да тврдимо да се у овом узорку налази морфин пре провере

испуњености критеријума за идентификацију на основу односа MRM-ова (у оквиру 20%).

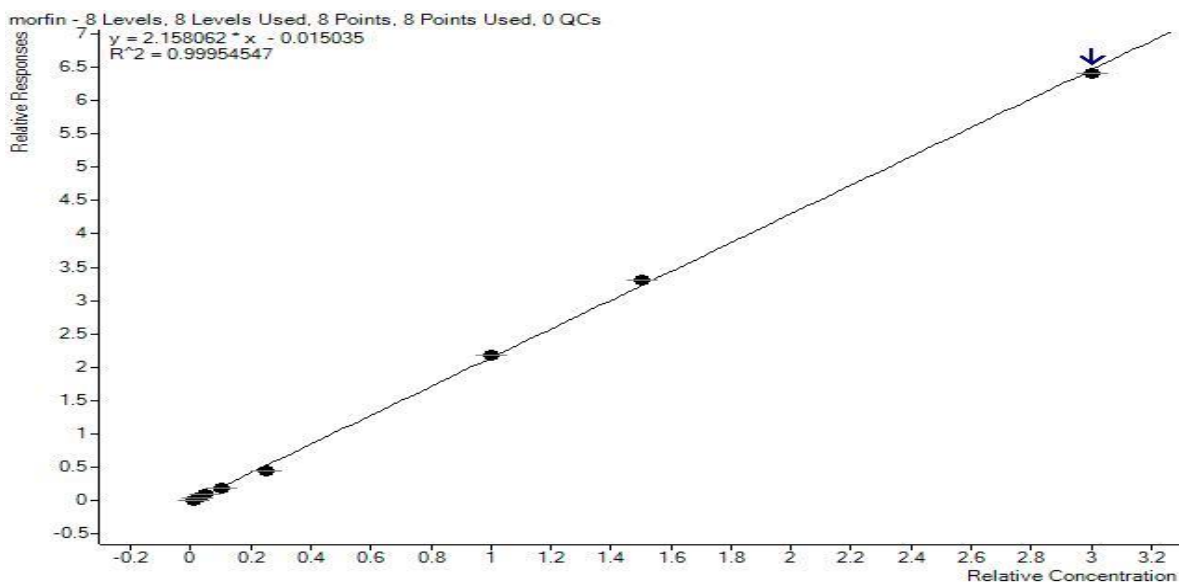


**Слика 49:** Преклопљени хроматограми MRM прелаза за морфин, узорак 4 из формалина, свежа јетре и спајкованог ткива јетре 0,025 $\mu$ g/g

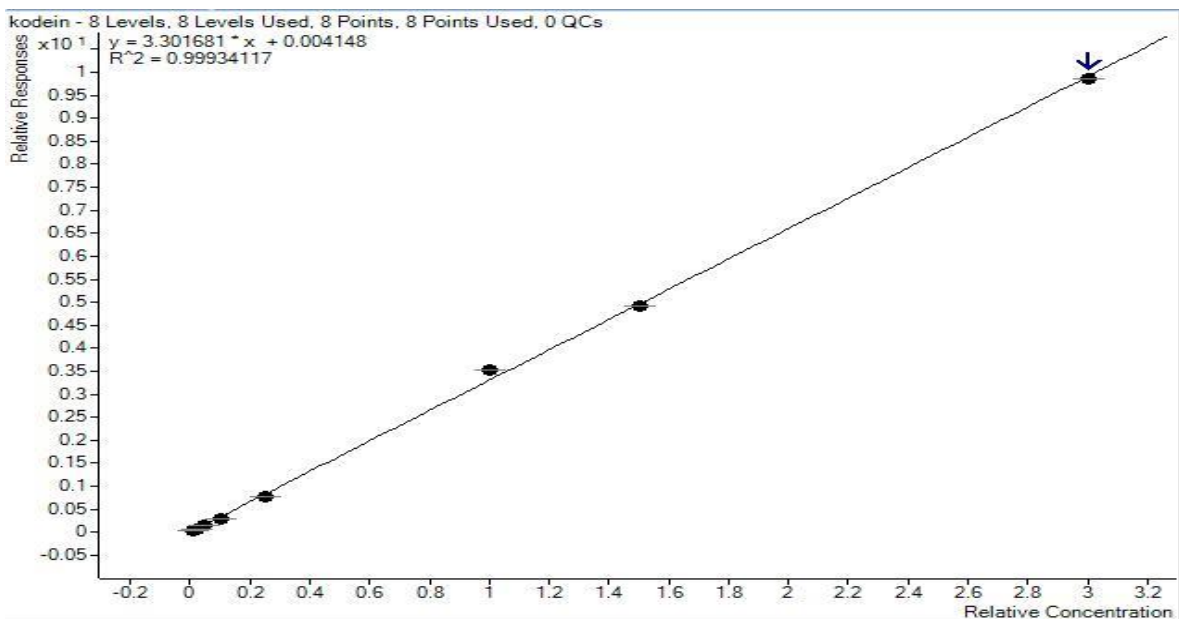
Критеријуме за идентификацију у масеној спектрометрији дала је Европска унија у области ветерине (43). Успостављени су и критеријуми бодовања изражени као тзв. идентификационе тачке (IP) који се приписују коришћеним техникама у поступку идентификације и сабирају како би се кроз број добијених информација обезбедила поуздана и објективна идентификација одређене супстанце (табеле 2 и 3). Смернице за критеријуме идентификације постоје и у области антидопинг контроле које је дала светска анти-допинг агенција (WADA) (44) (45).

На основу табеле 2 закључујемо да с обзиром на примењену технику и релативни интензитет јона >50% наши критеријум за релативни однос јона за морфин и кодеин треба да буду дозвољено одступање од  $\pm 20\%$  а за 6-МAM  $\pm 25\%$  што смо и прихватили као критеријум за идентификацију. Ове вредности за релативни однос јона смо укључили и приликом израде калибрационе криве за сваки аналит.

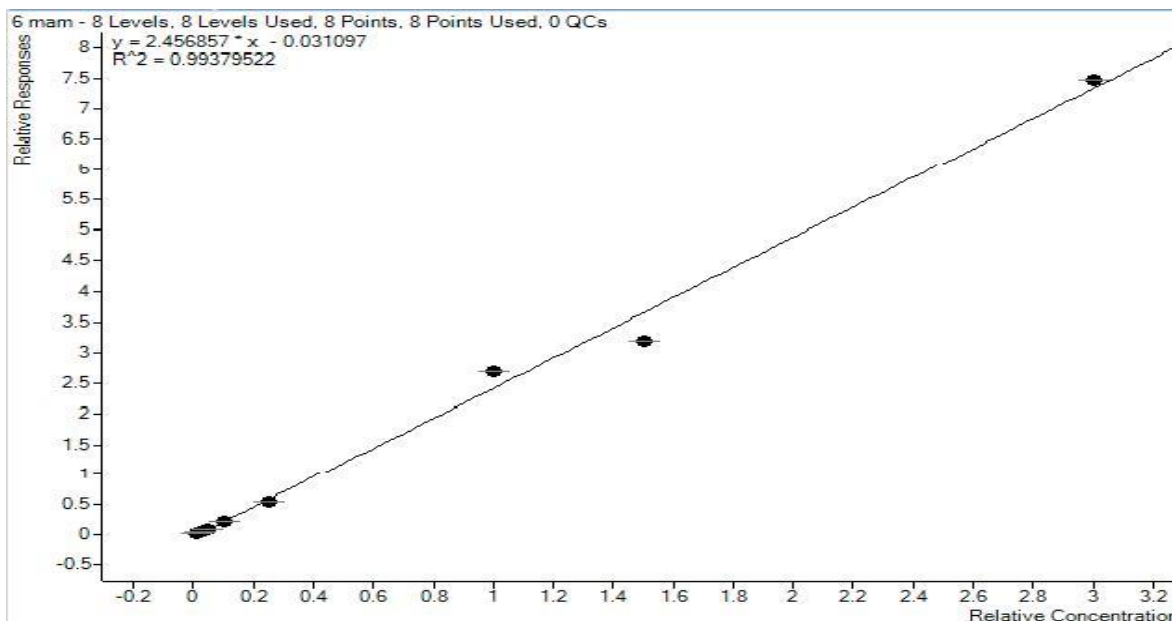
На основу конструисаних калибрационих кривих, слика 50, 51 и 52 израчунали смо концентрације у ткивима јетре које су биле предмет анализе.



**Слика 50:** Калибрациона крива за морфин из спајкованих узорака јетре.  
Концентрације 0,01  $\mu\text{g/g}$ , 0,025  $\mu\text{g/g}$ , 0,05  $\mu\text{g/g}$ , 0,1  $\mu\text{g/g}$ , 0,25  $\mu\text{g/g}$ , 1  $\mu\text{g/g}$ , 1,5  $\mu\text{g/g}$  и 3  $\mu\text{g/g}$



**Слика 51:** Калибрациона крива за кодеин из спајкованих узорака јетре.  
Концентрације 0,01  $\mu\text{g/g}$ , 0,025  $\mu\text{g/g}$ , 0,05  $\mu\text{g/g}$ , 0,1  $\mu\text{g/g}$ , 0,25  $\mu\text{g/g}$ , 1  $\mu\text{g/g}$ , 1,5  $\mu\text{g/g}$  и 3  $\mu\text{g/g}$



**Слика 52:** Калибрациона крива за 6-моноацетилморфин из спајкованих узорака јетре. Концентрације 0,01  $\mu\text{g/g}$ , 0,025  $\mu\text{g/g}$ , 0,05  $\mu\text{g/g}$ , 0,1  $\mu\text{g/g}$ , 0,25  $\mu\text{g/g}$ , 1  $\mu\text{g/g}$ , 1,5  $\mu\text{g/g}$  и 3  $\mu\text{g/g}$

Добијени резултати су приказани у табели 11.

**Табела 11:** Концентрације 6-МММ, морфина и кодеина у јетри без третирања формалином, јетри из формалина и јетри из парафинског калуца

случај	Јетра свежа				Јетра из формалина			Јетра из калуца		
	6-мам	морфин	кодеин	м/к	6-мам	морфин	кодеин	6-мам	морфин	кодеин
1	nd	0,9149	0,4534	>1	nd	nd	nd	nd	0,0231	nd
2	nd	0,5070	0,0297	>1	nd	nd	0,0131	nd	0,0084*	nd
3	nd	0,1145	0,0144	>1	nd	nd	nd	nd	na	nd
4	nd	0,4468	0,0409	>1	nd	nd	nd	nd	0,0015*	nd
5	nd	0,4758	0,0212	>1	nd	nd	nd	nd	0,0012*	nd
6	nd	0,6699	0,0730	>1	nd	0,0126	0,0338	nd	0,0073*	nd
7	nd	0,1674	nd		nd	nd	nd	nd	0,0031*	nd
8	nd	0,1940	0,2473	<1	nd	nd	nd	nd	0,0022*	nd
9	nd	0,3006	0,1658	>1	nd	nd	nd	nd	na	nd
10	nd	0,8265	0,098	>1	nd	0,0208	0,0292	nd	na	nd
11	nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	na	na	na		na	na	na	na	0,0044*	nd

nd – није детектовано (not detected)

na – није анализирано (not analyzed)

\* - резултати нису у опсегу калибрационе криве

м/к – однос концентрација морфина и кодеина

У свим узорцима осим узорка број 11 токсиколошким анализама је претходно идентификован 6-моноацетилморфин у биолошким течностима као маркер злоупотребе хероина. За узорак број 11 смо имали податак да се особа налази на метадонској терапији и за овај случај немамо потврду да је особа узимала хероин пошто је узорак ткива јетре био једини који је достављен лабораторији на чување. За њега је урађена и анализа на присуство метадона који је идентификован у ткиву свеже јетре али не и у ткивима из формалина и ткиву јетре из калупа. Пошто претходним анализама није потврђен унос хероина овај узорак ћемо изузети приликом коментара добијених резултата наведених у табели 11.

У свим анализираним узорцима тзв. свежег ткива јетре хероинских зависника идентификован је морфин. Концентрације су се кретале од 0,11-0,91  $\mu\text{g/g}$ . Кодеин је идентификован у свим узорцима свежег ткива, осим једног; концентрације од 0,01-0,45  $\mu\text{g/g}$ . Само у случају број 8 однос концентрација морфина и кодеина био је у корист кодеина.

У узорцима ткива јетре из формалина од анализираних десет узорака само у два узорка је идентификован морфин; концентрације од 0,01-0,02  $\mu\text{g/g}$ , док је кодеин идентификован у три узорка. На основу ових резултата види се да је дошло до значајне или потпуне деградације морфина. Концентрација морфина смањила за 98,1% односно 97,5% у два узорка (узорци 6 и 10) у којима је детектован. Ова деградација се може приписати претходном третирању раствором формалина, али и дугогодишњем складиштењу.

Концентрација кодеина се у три узорка у којима је кодеин идентификован смањила за око 2-3 пута. Ово би могло да нас наведе на закључак да је кодеин стабилнији у овим узорцима од морфина. Међутим у седам анализираних узорака кодеин није детектован. Све ово нас наводи на закључак да узорак ткива јетре који је третиран формалином и чуван у замрзивачу дуже време није одговарајући за анализу опијата.



Само у једном узорку ткива јетре из калуца, измерена концентрација морфина је била у опсегу мерења (0,01-3  $\mu\text{g/g}$ ); узорак број 1, концентрација 0,0231  $\mu\text{g/g}$ , што је 2,5% од концентрације измерене у свежем ткиву јетре.

У седам од осам анализираних узорака ткива јетре из калуца потврђених хероинских зависника морфин је идентификован према критеријумима Европске уније (43) узимајући у обзир поклапање ретенционог времена анализата, постојање минимум две специфичне реакције фрагментације (MRM), релативно одступање интензитета њихових  $m/z$  јона у оквиру дозвољених 20% и броја додељених идентификационих тачака. Према критеријумима које је дала Европска унија за тандем масену спектрометрију ниске резолуције 1 бод се додељује прекурсор јону а 1.5 продукт јону за специфичну реакцију фрагментације. Критеријум је задовољен уколико постоје 4 IP. У области токсикологије постоји нацрт стандарда који се тиче критеријума за идентификацију (47) у коме је критеријум за идентификацију испуњен са 4 IP а бодовање је 2 IP за једну специфичну реакцију фрагментације (прекурсор + продукт јон).

Зарађене идентификационе тачке за узорке јетре из калуца према важећем критеријуму Европске уније приказане су у табели број 12.

**Табела 12:** Резултати анализираних узорака ткива јетре из калуца са добијеним релативним интензитетима јона и додељеним идентификационим тачкама

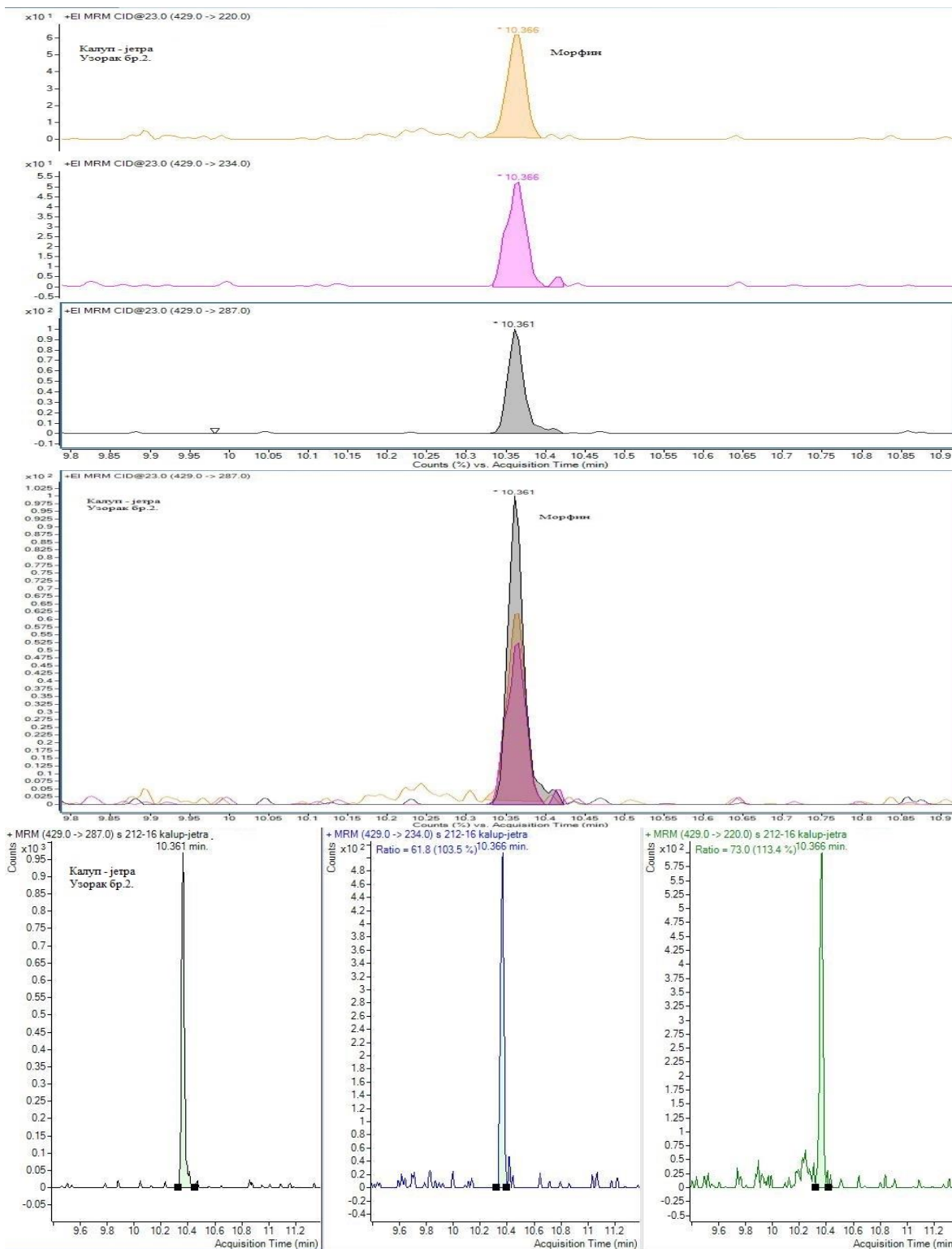
Назив једињења	MRM (m/z)	Релативни интензитет јона std. спајк	Релативни интензитет јона јетра калуп	Релативни интензитет (%)	IP	IP укупно
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 1	429>220	64.3	67.1	104.3	2.5	7.5
	429>234	59.7	58.5	98	2.5	
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 2	429>220	64.3	73.0	113.4	2.5	7.5
	429>234	59.7	61.8	103.5	2.5	
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 4	429>220	64.3	85.07	132.3		5
	429>234	59.7	62.6	104.9	2.5	



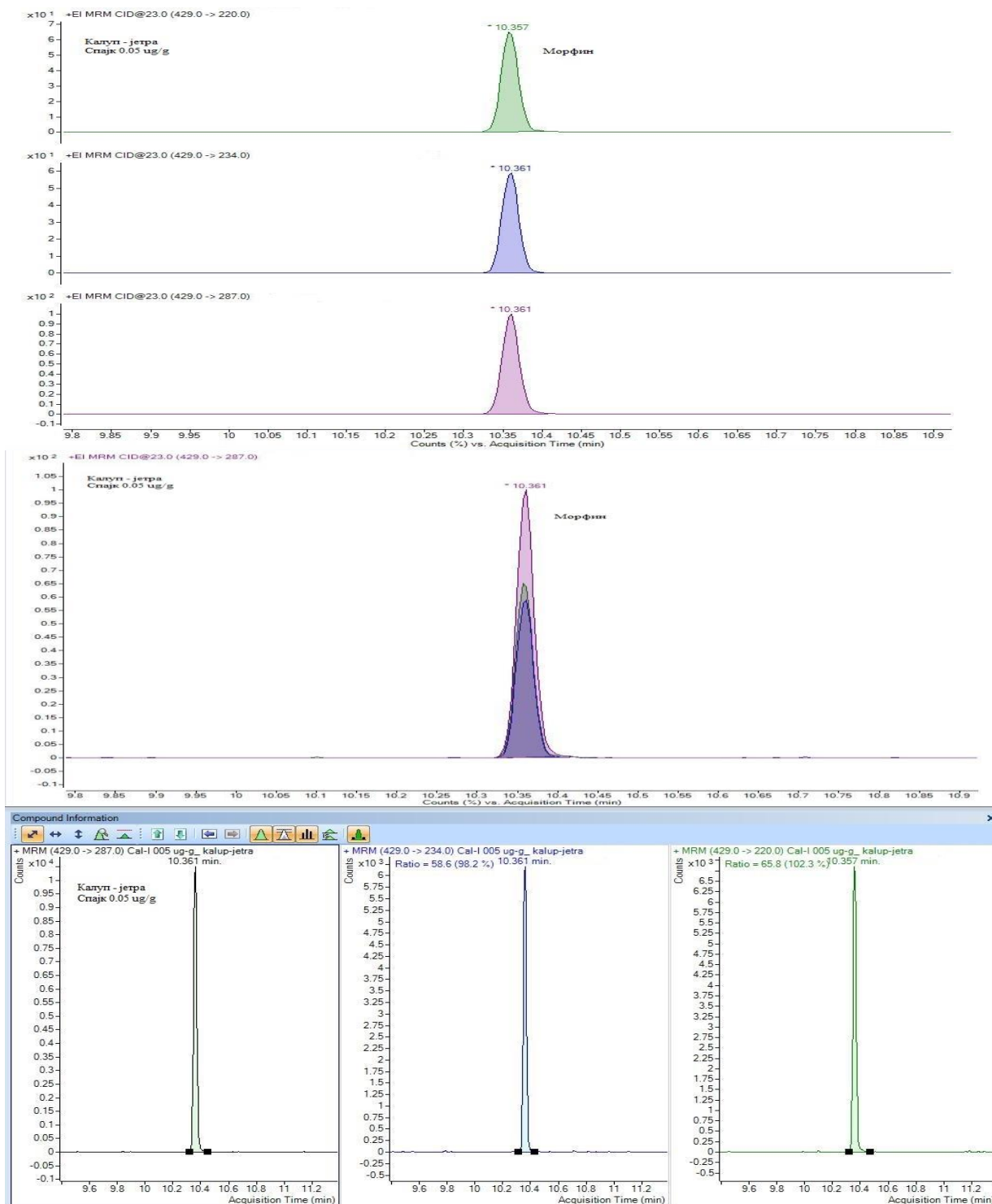
Назив једињења	MRM (m/z)	Релативни интензитет јона std. спајк	Релативни интензитет јона јетра калуп	Релативни интензитет (%)	IP	IP укупно
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2,5	
Случај 5	429>220	64.3	64.0	99.5	2.5	5
	429>234	59.7	74.7	125.2		
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 6	429>220	64.3	64.8	100.7	2.5	7.5
	429>234	59.7	58.6	98.1	2.5	
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 7	429>220	64.3	46.3	72.0		5
	429>234	59.7	62.9	105.4	2.5	
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 8	429>220	64.3	45.2	70.3		2.5
	429>234	59.7	37.6	62.9		
Морфин - 2TMS	429>287	100	100	-	-	
Случај 11	429>220	64.3	-	-		-
	429>234	59.7	-	-		
Морфин - 2TMS	429>287	100	100		2.5	
Случај 12	429>220	64.3	59.9	93.1	2.5	7.5
	429>234	59.7	66.1	110.8	2.5	

Релативни интензитети јона задовољавали су критеријуме за три специфичне реакције прелаза (7.5 IP) за четири узорка. За три узорка (5 IP) релативни интензитети јона били су у дозвољеним границама за две специфичне реакције прелаза.

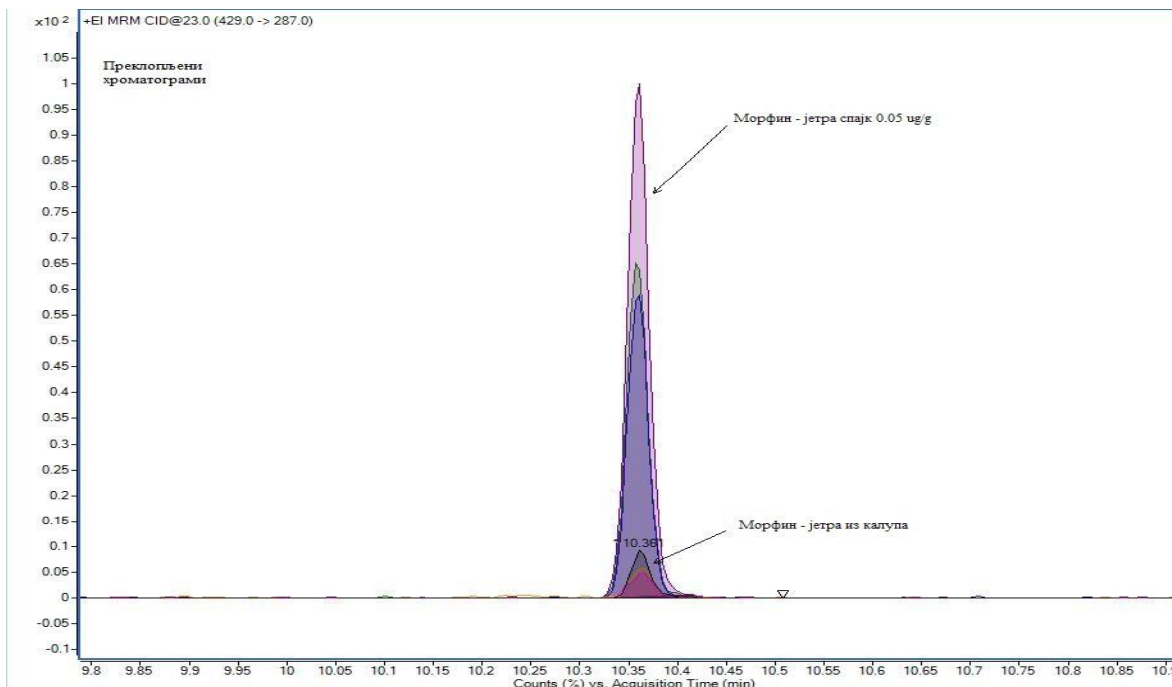
На сликама 53 и 54 приказани су хроматограми специфичних реакција прелаза за морфин из узорка ткива јетре из калупа са приказаним релативним интензитетима m/z јона за узорак број 2 и јетру спајковану опијатима концентрације 0,05 µg/g, а њихови преклопљени хроматограми на слици 55. Хроматограми са подацима о релативним интензитетима јона за остале узорке из ткива јетре као и бланк узорка спајкованог са IS дати су у прилозима од 24 до 32.



Слика 53: MRM хроматограм морфина добијен из јетре из калупа за узорак бр. 2, са приказаним релативним интензитетима  $m/z$  јона



**Слика 54:** MRM хроматограм морфина добијен из оптерећеног бланк узорка јетре из калуца, концентрације 0,05  $\mu\text{g/g}$  за зорак бр. 2, са релативним интензитетима  $m/z$  јона



**Слика 55:** MRM преклопљени хроматограми морфина узорка 2 и оптерећеног бланк узорка јетре из калуца, концентрације 0,05 µg/g

За узорак број 11, особа на метадонској терапији није био задовољен критеријум покалапања ретенционог времена као ни постојања специфичних реакција прелаза. За узорак број 8 није задовољен критеријум релативних интензитета јона (2.5 IP).

Уочава се да су концентрације у свезим ткивима јетре за три узорка која су задовољила критеријуме за три MRM-а за морфин (узорци 1, 2 и 6) биле више од 0,5 µg/g. За узорак број 12 који је такође задовољио критеријум за три MRM-а узорак свеже јетре није анализиран. Међутим увидом у токсиколошки налаз биолошких течности за овај случај уочава се да је концентрација морфина била висока у крви, а нарочито у урину, више од 5 µg/mL.

У узорку број 8 морфин није детектован у ткиву из калуца. То би се могло објаснити нижом концентрацијом у свежем ткиву јетре од 0,194 µg/g као и чињеницом да је смањење концентрације морфина било више од 97% у јетри из калуца у односу на свеже ткиво јетре. Овај закључак је изведен на основу поређења концентрација у свежој јетри и јетри из формалина, као и концентрација у узорку

број 1 у коме је концентрација била мерљива. Токсиколошки налаз морфина указује на то да су концентрације морфина и у крви и у урину биле високе.

Општи закључак би био да идентификација морфина у парафинском калупу указује на то да су концентрације у свежој јетри биле високе. Према нашем истраживању у случајевима када је идентификација потврђена са три MRM-а концентрације су биле више од 0,5 µg/g. Иако не постоји директна корелација између концентрација морфина у крви и концентрација у јетри генерално важи правило да су високе концентрације у ткиву јетре праћене и високим концентрацијама у крви. У осам узорака у којима је морфин идентификован у ткиву из калупа и однос морфина и кодеина >1 у свежој јетри указује на злоупотребу хероина.

Поред тога ако узмемо у обзир временску дистанцу од узорковања и анализе од око 5 година можемо закључити да су морфин и кодеин стабилни у дужем временском периоду ако се чувају у замрзивачу. Нисмо наишли на студије које су се бавиле стабилношћу наведених анализата у овако дугом временском периоду. Са судскомедицинског аспекта ово је значајан податак о употребљивости ткива јетре након дугогодишњег складиштења на -20°C.

Према подацима из доступне литературе ткиво из парафинског калупа до сада није анализирано за потребе токсиколошке анализе. До сада су се научници бавили углавном одређивањем концентрација морфина у ткиву јетре из формалина и раствору формалина у коме се ткиво јетре фиксира. Утврђено је да је и поред велике агресивности формалина морфин стабилан у раствору формалина у периоду од 12 недеља (23). Према истраживању Singolinija и сарадника концентрације морфина су биле duplo више у раствору формалина у односу на ткиво јетре које је у њему фиксирано. То нама помаже једним делом у објашњењу ниских концентрација у ткиву јетре из калупа у поређењу са концентрацијама у свежем ткиву јетре. Поред формалина ткиво јетре пролази и кроз друге хемијске третмане пре складиштења у парафинске блокове. Неколико пута се обавља поступак дехидратације 95% и апсолутним етанолом. Морфин је растворан у алкохолу па се његов велики део изгуби у овом поступку третирања ткива. Након формалдехида и алкохола ткиво јетре се складишти у парафинске блокове.

Приликом припреме узорка ткива из калупа испробали смо неколико начина да одвојимо ткиво из парафина. Један од начина је био да парафински блок загрејемо и механички одвојимо ткиво из калупа. Затим смо га сецкали маказама за сечење (прилог 22). Процедура екстракције је била слична оној коју је користио Cingolini (23) с тим што смо ми користили раствор фосфатног пуфера 0,1 mol, pH 6 и SPE колоне на принципу јаке катјонске измене. Са фосфатним пуфером 0,1 mol, pH 6 имамо искуства у лабораторији за екстракцију опијата из других матрикса па смо се из тог разлога одлучили да га употребимо. Проблем је био парафин. Покушали смо да га се ослободимо на начин како се то ради у хистопатолошкој лабораторији депарафинизацијом. Додавали смо ксилол, вортексирали, одбацивали супернатант, па то исто радили са 96% и апсолутним етанолом па водом. Ослободили смо се парафина али и морфина. Онда смо покушавали са задржавањем супернатанта, ни то није успело. После низа неуспешних покушаја исекли смо ткиво микротомом (прилог 22) чиме смо повећали додирну површину ткива јетре и механички одстрањивали парафин. Нисмо додавали ацетонитрил зато што се додатко органских растварача направи емулзија са парафином. Танке листиће ткива јетре држали смо дуже у ултразвучном купатилу и овај начин припреме је показао резултате (3.6.2.2).

#### 4.3.3. Поређење метода GC-MS и GC-MS/MS

Резултати анализа шест узорака свежег ткива јетре методама GC-MS и GC-MS/MS приказани су у табели 13. Добијени резултати су упоредиви. Међутим примећује се да је метода GC-MS мање осетљива за анализу кодеина. Али и поред тога је прихватљива за анализу ткива јетре хероинских зависника с обзиром да је у овом случају морфин циљани аналит.

**Табела 13:** Резултати добијени методима GC-MS/MS и GC-MS

случај	Јетра свежа (µg/g)			
	морфин		кодеин	
	GC-MS/MS	GC-MS	GC-MS/MS	GC-MS
4	0,4468	0,41	0,0409	nd
5	0,4758	0,42	0,0212	nd
6	0,6699	0,63	0,0730	0,05
7	0,1674	0,08	nd	nd
9	0,3006	0,22	0,1658	0,18
10	0,8265	0,82	0,098	0,09

На основу добијених резултата GC-MS и GC-MS/MS закључујемо да су резултати добијени и једном и другом методом упоредиви. Међутим метода GC-MS/MS је осетљивија што је и очекивано.

#### 4.4. LC-QTOF/MS - резултати

Циљ експеримената који су описани у тексту који следи је био подешавање радних услова за анализу у MS и Auto MS/MS режиму рада, и успостављање хроматографских услова за раздвајање одабраних NPS (3.7.8 хроматографски услови под 2, аквизиција 1 и 2). Коришћена је смеша стандарда NPS у метанолу, концентрације 1  $\mu\text{g/mL}$ , која је садржала супстанце наведене у табели 14.

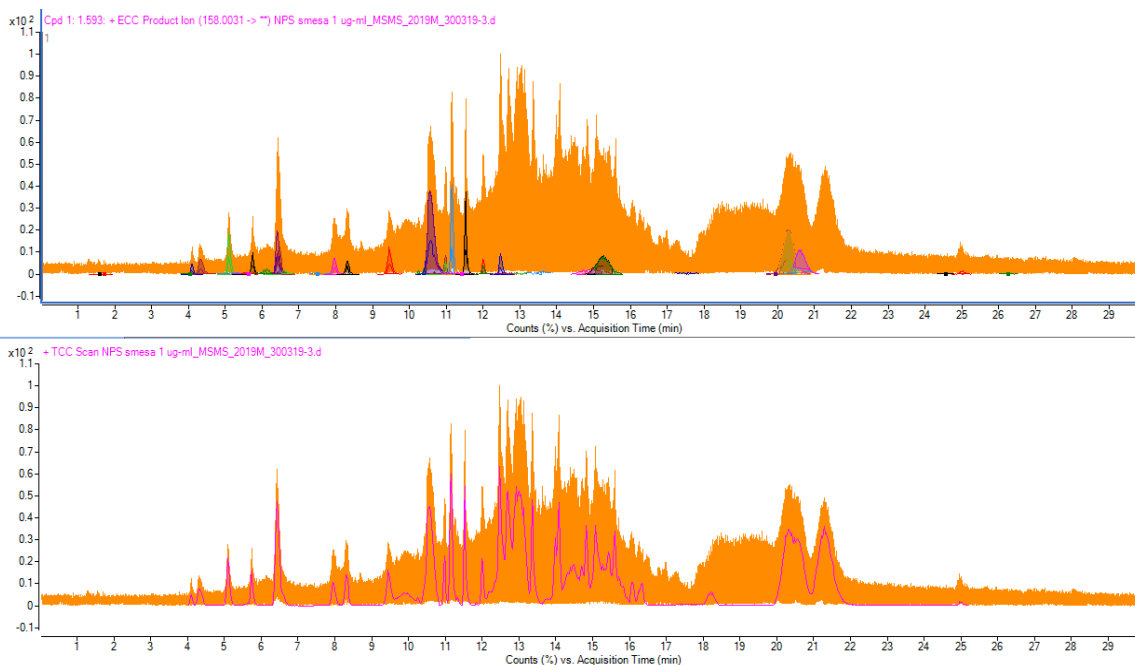
Квадрупол као масени анализатор је повезан са анализатором масе на бази времена прелетања (слика 11). Ова конфигурација омогућава снимање тачних маса анализата на више начина. То су тзв. MS, MS/MS (Auto MS/MS) и циљани MS/MS (Targeted MS/MS).

У MS режиму рада квадрупол и колизиона ћелија служе за фокусирање јона према TOF-у. Не долази до фрагментације. Овај режим рада је најосетљивији, зато што се комплетно време мерења користи за добијање MS спектра квазимолекуларног јона који генерише јонски извор. Као резултат се добија тачна маса молекула, на четири децимале на основу које се може генерисати молекулска формула једињења. У овом режиму рада снимљен је узорак биљног материјала без хроматографске колоне који је приказан у поглављу 4.1.2..

У циљаном режиму рада MS/MS, врши се одабир прекурсор јона који се издвајају у квадруполу, након чега се низом реакција које се одвијају у колизионој ћелији сударом са инертним гасом добијају јони настали његовом фрагментацијом тзв. продукт јони, а онда детектују након раздвајања у ТОФ-у као масеном анализатору. Овај режим рада није коришћен за анализу.

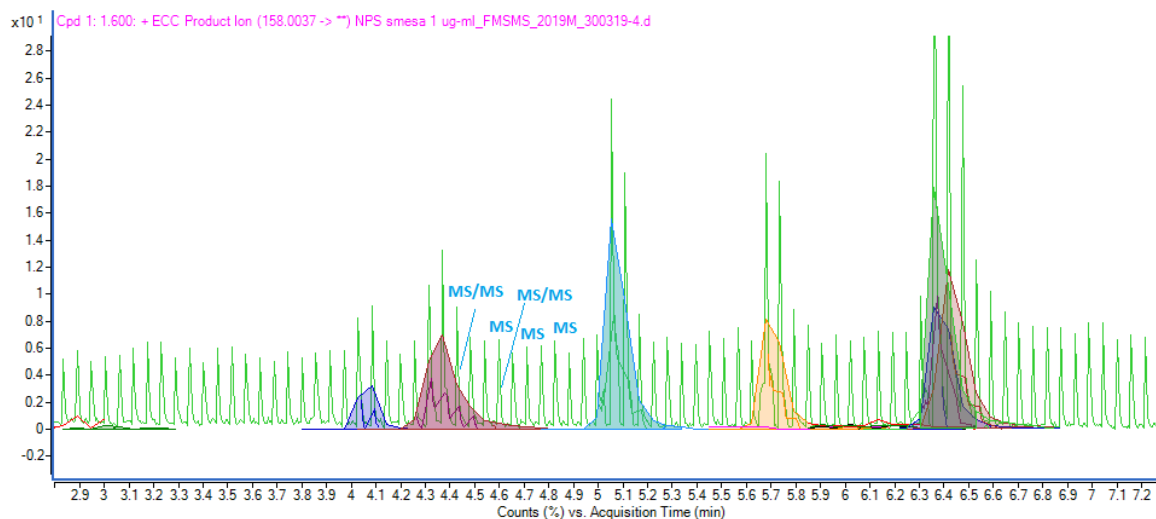
Auto MS/MS режим рада је комбинација MS и MS/MS. Експерименти MS и MS/MS се одвијају у временски задатим циклусима који трају неколико делова секунде. У једном циклусу се снима MS а у неколико наредних MS/MS (54). Енергије судара у колизионој ћелији може да генерише сам инструмент на основу молекулске

масе једињења а могуће их је и прецизно дефинисати методом пре почетка снимања узорака. Наши експерименти са одабраним новодизајнираним дрогама извођени су у овом режиму рада. Он није најосетљивији али је најинформативнији. Принцип мерења у Auto MS/MS режиму рада објашњен је кроз примере хроматограма смеше стандарда NPS, слике 56 и 57.



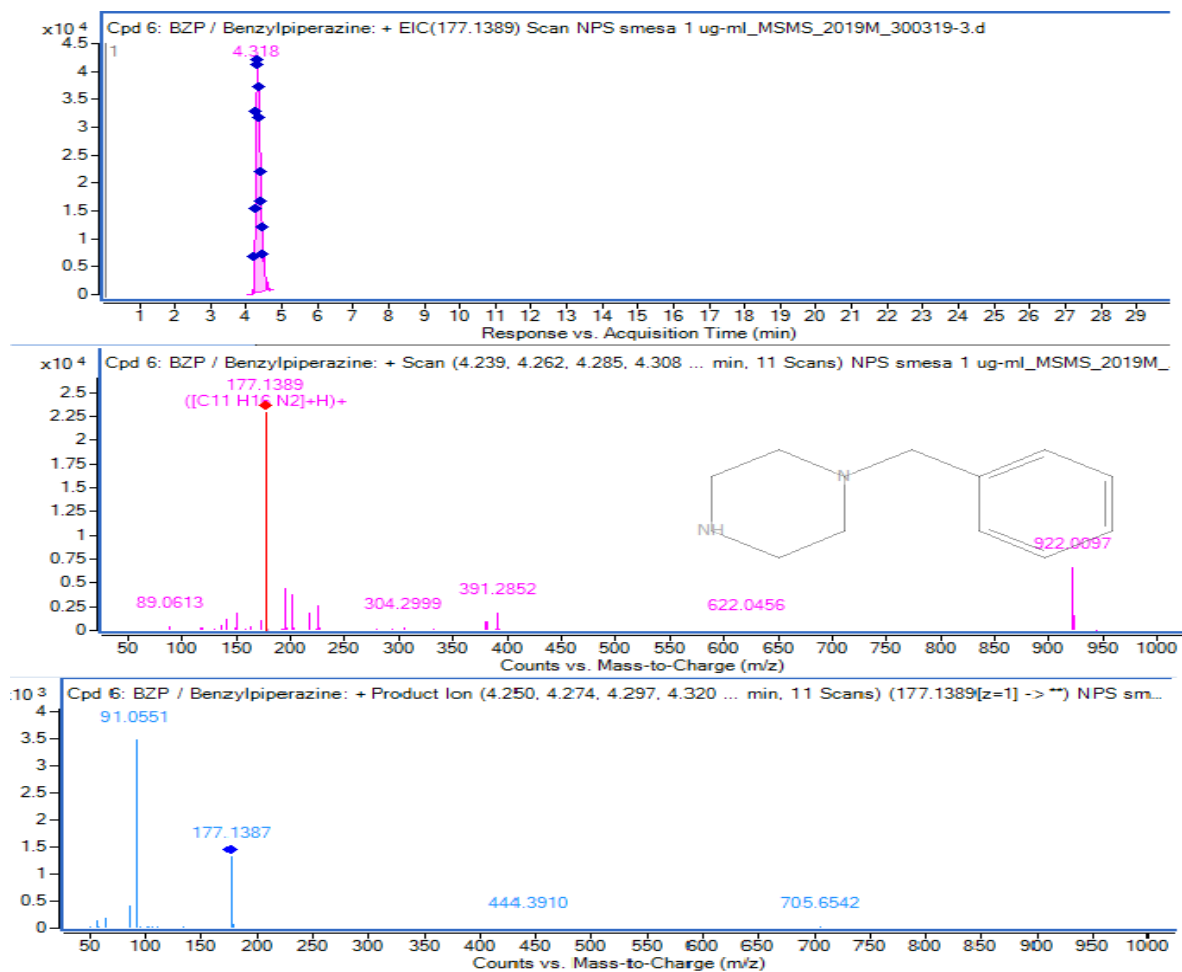
**Слика 56:** Укупни јонски хроматограм – ТИС смеше стандарда одабраних NPS, концентрације 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , са екстрахованим MS/MS и MS јонима



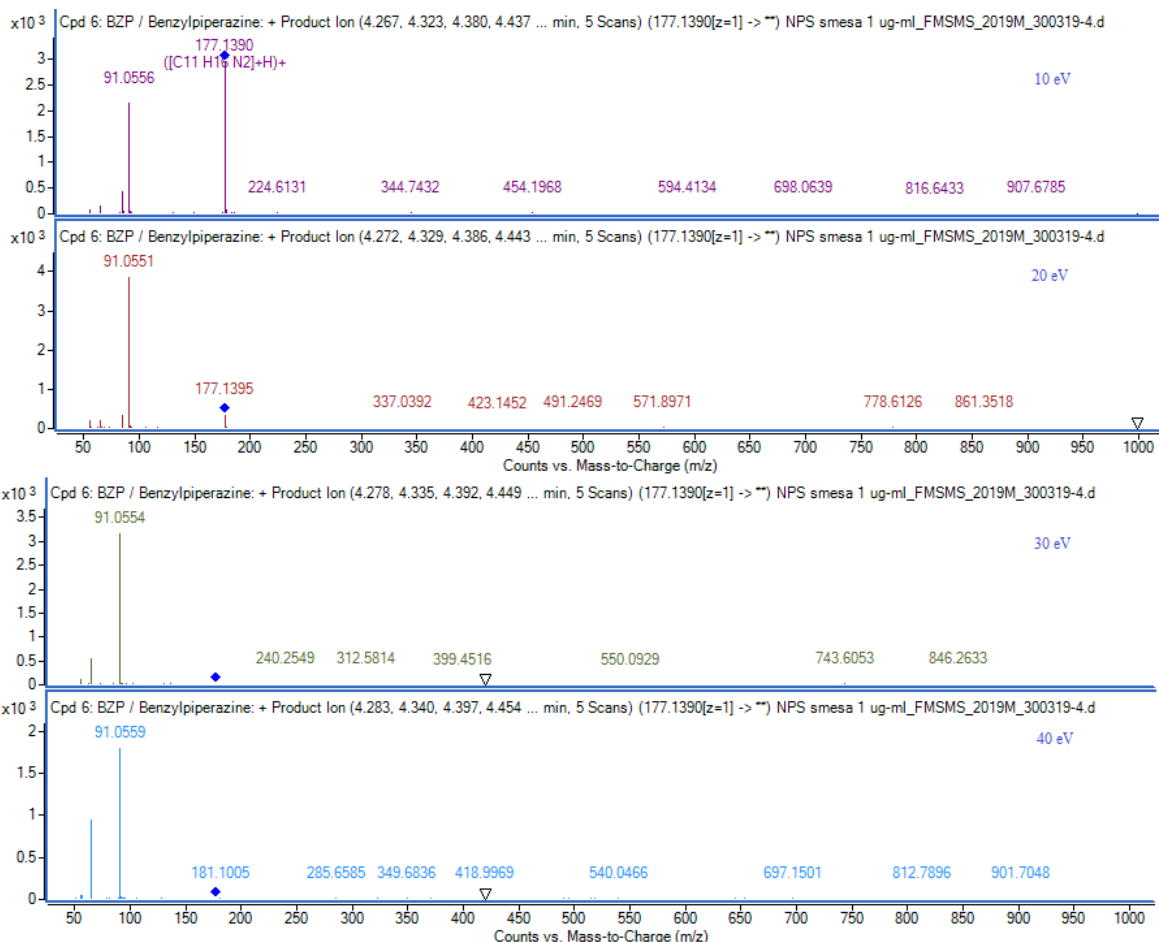


**Слика 57:** Увећан ТИС смеше стандарда одабраних NPS, од 2,5 до 7,5 min. са екстрахованим MS/MS и MS јонима где врхови представљају MS циклус снимања а делови између циклус MS/MS

У циклусу MS снимања скенирају се квазимолекулски јони (протоновани, јони адукта) генерисани у јонском извору тако да се добија тачна маса протонаног молекула са карактеристичном изотопском расподелом која се софтверски преводи у тачну масу молекула. У циклусу MS/MS скенирају се настали продукт јони након судара са инертним гасом у колизионој ћелији. Као резултат се добија укупни јонски хроматограм из кога се могу добити подаци о тачној маси молекула (MS scan) и његовој фрагментацији (MS/MS product scan) снимањем само једног рана (слика 56). На слици 58 су приказани хроматограм и масени спектри BZP, новодизајниране дроге из групе пиперазина снимљеног у Auto MS/MS режиму рада, при генерисању колизионе енергије на основу молекулске масе и на 10, 20, 30 и 40 eV.



Слика 58: BZP из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, SE су генерисане на основу молекулске масе



**Слика 59:** BZP из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, при CE од 10 eV, 20 eV, 30 eV и 40 eV

У прилозима су дати снимљени хроматограми и масени спектри за неке од новодизајнираних дрога које су биле предмет анализе (табела 14).

У табели 14 су приказани неки од важних података добијени применом методе LC-MS/QTOF за анализиране NPS. Иако је ретенционо време (RT) параметар карактеристичан уопште за хроматографију добро је да су пикови раздвојени због дужег времена које је на располагању за MS и MS/MS експерименте. Моноизотопска маса је у овом случају референтна маса која је експериментално одређена и служи за поређење са добијеном тачном масом анализата. Пошто се мери тачна маса јонске врсте која је у нашем случају протонована, добијена маса се преводи у тачну масу

аналита (у табели добијена тачна маса). Једињењу се може доделити добијена маса уколико је разлика између добијене и моноизотопске масе  $\pm 5$  ppm. Термин доделити је због тога што постоји велики број једињења која имају исту молекулску масу али различиту композицију, елементарни састав (изобаре).

**Табела 14:** LC-MS/QTOF – резултати добијени за смешу NPS

Једињење	RT. (min.)	Формула Моноизотопска маса	[M+H] <sup>+</sup> маса	Добијена тачна маса	Diff (ppm)	Diff (mDa)	
Мефедрон	6.407	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO	177.1154	178.1229	177.1156	1.62	0.29
25B-NBOMe	20.633	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> BrNO <sub>3</sub>	379.0783	382.0848	379.0794	2.75	1.04
25I-NBOMe	8.205	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> INO <sub>3</sub>	427.0644	428.0723	427.0651	1.61	0.69
2C-B	8.297	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> BrNO <sub>2</sub>	259.0208	260.0286	259.0212	1.39	0.36
AM-2201	10.972	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> FNO	359.1685	360.1754	359.1681	-1.18	-0.43
Метилон	5.092	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	207.0895	208.0973	207.09	2.24	0.46
BZP	4.308	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	176.1314	177.139	176.1317	2.25	0.4
JWH-018	11.53	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> NO	341.178	342.1862	341.1791	2.4	1.16
JWH-073	11.157	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> NO	327.1623	328.1703	327.163	2.12	0.69
Кетамин	6.476	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> ClNO	237.092	238.1	237.0927	2.67	0.63
MDPV	6.499	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	275.1521	276.1603	275.1529	2.81	0.77
Норкетамин	5.738	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> ClNO	223.0764	224.0841	223.0768	1.97	0.44
Прегабалин	4.101	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	159.1259	160.1335	159.1262	1.93	0.31

#### 4.4.1. Примена методе LC-QTOF/MS на реалним узорцима

Реални узорци биолошких течности који су били предмет токсиколошке анализе су углавном снимани методом описаном у поглављу 3.7.8 под 1, фрматографски услови 1 и аквизиција 2. Због уштеде у времену ишло се са бржим постизањем већег удела органског растварача, за 1,5 min. 40 % ацетонитрила, а до 5,5 минута и 60% ацетонитрила када се готово сва једињења од значаја раздвајају на колони. Од успостављања радних услова за методу опште непознатог токсиколошког скрининга у Auto MS/MS моду она се рутински користи у токсиколошкој лабораторији Института за судску медицину за анализу узорака од токсиколошког значаја. Предност ове методе је у томе што није неопходно да се једињења апсолутно хроматографски раздвоје због тога што велика резолуција масе >10000 омогућава разликовање блиских маса па самим тим и њихову детекцију. Поред тога омогућава

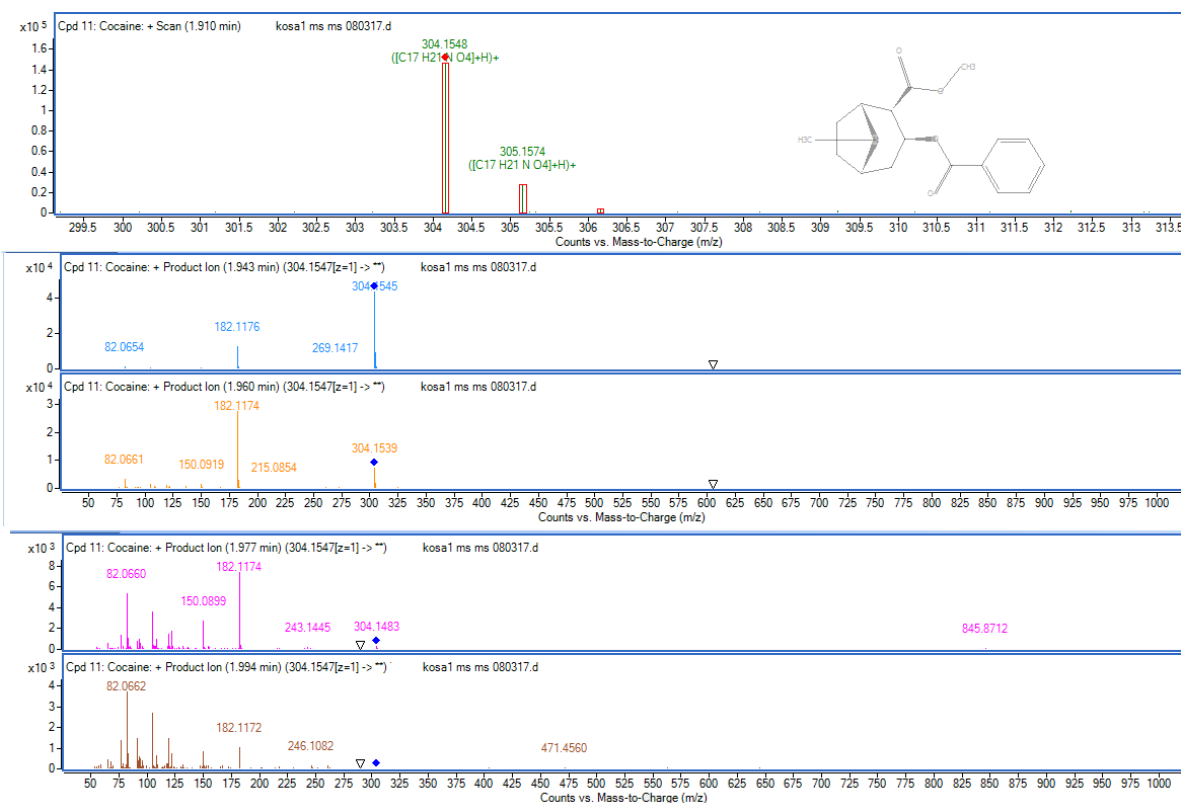
велики број информација о једињењу, тачну молекулску масу, молекулску формулу, изотопску расподелу као и тачне масе фрагмената специфичних за једињење. Постојање базе података библиотеке PCDL (personal compound database library) са више од 2500 (54) снимљених MS/MS спектра од токсиколошког значаја на три колизионе енергије 10, 20 и 40eV олакшава идентификацију непознатих једињења.

Као пример успешне употребе LC-MS/QTOF методе наводимо три случаја. У једном се радило о особи која је због симптома које је испољавала и сумње на предозирање хероином боравила у болници месец дана након чега је преминула. За време боравка у болници примала је терапију која нама није била позната. Након смрти је урађена обдукција и материјал достављен лабораторији на анализу. Достављене су телесне течности: крв, течност стакластог тела и коса. Анализом на LC-MS/QTOF-у у Auto MS/MS моду идентификовали смо у крви: триметоприм, сулфаметоксазол, флуконазол, норверапамил, диазепам, нордиазепам; у течности стакластог тела: триметоприм, сулфаметоксазол, флуконазол, норверапамил, нордиазепам; у коси: метадон, ЕДДП (метаболит метадона), мидазолам, лидокаин, ампирон, норамидопирин, триметоприм, метронидазол, флуконазол, никотин. Касније смо добили информацију да је лекове мидазолам, лидокаин, ампирон, триметоприм, метронидазол, флуконазол, сулфаметоксазол, верапамил и диазепам особа добијала у циљу лечења.

Идентификација ових лекова у коси је могућа због дугог периода који је особа провела у болници. Како коса на месечном нивоу расте око 1-1,5 cm и период узимања лекова се уклапа у добијени налаз. Налаз никотина указује на то да је особа била пушач а присуство метадона и његовог метаболита да се највероватније радило о хероинском зависнику на метадонској терапији. Хероин нисмо детектовали у узорку косе што би се могло објаснити тиме да га особа није ни унела у организам. Симптоме сличне предозирању хероином могла је да има и као последицу превелике дозе метадона. Идентификација овако широке палете лекова у телесним течностима а посебно у коси у којој су концентрације налазе у количинама реда нанограма и пикограма говори у прилог осетљивости примењене методе. Идентификација је извршена поређењем са базом података.

Други случај односи се на анализу узорка косе достављене на лични захтев. Анализом узорка косе идентификовани су кокаин и кокаетилен, једињење које се добија када се кокаин уноси у организам заједно са етил-алкохолом и силденафил. Масени спектри снимљени у MS моду налазе се у прилогу (прилог 42)

Трећи случај такође се односи на анализу узорка косе у коме је идентификован кокаин у MS/MS моду (слика 60).



**Слика 60:** Кокаин у узоку косе, MS scan – тачна маса протонизованог молекула, молекулска формула и изотопска расподела; MS/MS спектар - продукт јони на 10, 20, 30 и 40 eV

## 5. ЗАКЉУЧАК

- Предложена припрема узорака за анализу 6-моноацетилморфина, морфина и кодеина чврсто-течном екстракцијом је успешно примењена на реалним узорцима свежег ткива јетре, ткива јетре фиксираног у формалину и ткива јетре из парафинског калупа. За анализу је потребно само 0,5 g ткива јетре. Ткиво јетре из парафинског калупа, које се иначе користи за потребе хистопатолошке анализе први пут је успешно употребљено као алтернативни узорак за потребе токсиколошке анализе код хероинских зависника. Показало се да је сечење ткива јетре из калупа микротоном боље од загревања калупа и његовог механичког одвајања од парафина.
- Предложена метода GC-MS је прихватљива за анализу свежег ткива јетре хероинских зависника али не и за анализу ткива јетре из калупа због слабије осетљивости у односу на методу GC-MS/MS.
- За анализу опијата на GC-MS/MS-у експериментално одређене по три специфичне реакције фрагментације за 6-моноацетилморфин, морфин и кодеин и по једна за интерне стандарде, деутеризоване аналоге 6-моноацетилморфин-D6 и морфин-D6, успешно су коришћене за идентификацију и квантитативну анализу наведених анализата у свежем ткиву јетре, јетри фиксираној формалином и ткиву јетре из парафинског калупа.
- Узорци ткива јетре могу се користити за анализу морфина и кодеина код хероинских зависника и до пет година, након скалдиштења на -20°C.
- Узорци ткива јетре из парафинских калупа могу се користити за анализу морфина и кодеина код хероинских зависника и до шест година.
- Добијени резултати у свежем ткиву јетре и ткиву јетре из парафинских калупа указују на то да се у поступцима хемијског третирања формалином и

алкохолом ради фиксирања и дехидратације ткива изгуби и до 97,5% морфина и да су то главни разлози ниских концентрација морфина у ткиву јетре из парафинских калуца у односу на свеже ткиво јетре. С обзиром на то чак и идентификација морфина у ткиву јетре из калуца сугерише да је концентрација у свежој јетри била висока, а посредно и концентрација у крви.

- Идентификација у масеној спектрометрији коришћењем тзв. идентификационих тачака је корисно средство за аналитичку потврду добијеног резултата. Идентификација са више идентификационих тачака је боља и поузданија. За потребе токсиколошке анализе наша препорука је коришћење три специфичне реакције фрагментације у масеној спектрометрији ниске резолуције.
- Оптимизована метода за циљану анализу синтетичког канабиноида JWH-018 на GC-MS/MS-у са експериментално утврђеним прекурс и продукт јонима и колизионим енергијама може се користити за идентификацију овог анализата у биљном материјалу.
- Развијена је метода за токсиколошки скрининг 16 новодизајнираних психоактивних молекула тј. оних који се у новије време налазе на илегалном тржишту дрога на LC-MS/MS-у. Спроведен је поступак оптимизације за праћење по три селектоване реакције фрагментације, за једињења из групе синтетичких катинаона (мефедрон, MDPV, метилон), фенетиламина (25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, 2C-B), синтетичких опиоида (АН-7921), синтетичких канабиноида (JWH-018, JWH-073, AM-2201, ММВ-СНМІСА), пиперазина (BZP, mCPP) и арилциклохексиламина (кетамин, норкетамин). Метода је примењена на узорцима урина. Сви наведени анализи се могу екстраховати течно-течном базном екстракцијом.



- Комбинацијом савремених инструменталних метода масене спектрометрије могуће је извршити идентификацију непознатог једињења описаног у литератури и у случајевима када лабораторија нема аналитички стандард и базу података снимљених спектра. Кључну улогу у овој врсти токсиколошког скрининга има анализа на QTOF-у којом се добија тачна маса једињења и предложена молекулска формула. Комбинацијом са подацима о специфичној фрагментацији једињења која се добија снимањем методом EI GC-MS могуће је идентификовати непознато једињење. Ова врста идентификације се често назива идентификацијом једињења које је описано у литератури али непознато аналитичару. На овај начин је идентификован синтетички канабиноид ММВ-СНМІСА у биљном материјалу. Ово једињење је први пут идентификовано на територији Републике Србије и након пријаве путем специјалних образаца стављено на Листу психоактивних контролисаних супстанци у Републици Србији.
- Оптимизована је метода за циљану анализу ММВ-СНМІСЕ на LC-MS/MS-у помоћу екстракта из биљног материјала са илегалног тржишта дрога. Селектоване су три специфичне реакције фрагментације и њихов релативни однос јона  $m/z$ , одабране одговарајуће колизионе енергије, волтаже као и мобилна фаза и услови за њено хроматографско раздвајање. Комбинација MeOH/0,1% HCOOH као мобилна фаза дала је бољи одговор у односу на ACN/0,1% HCOOH.
- Конформациона анализа у хлороформу за нову психоактивну супстанцу ММВ-СНМІСА је дала највероватнију биоактивну конформацију и даље се може користити за молекулски докинг који може дати увид у интеракције ове психоактивне супстанце са рецепторима. Исто важи и за резултате конформационе анализе новодизајнираних психоактивних супстанци мефедрон, АН-7921, 25В-NBOMe, 25С- NBOMe, 25I-NBOMe, ВЗР, АМ-2201, МDPV, метилон, ЈWH-018, и 2С-В.

- Разрађен је поступак коришћења LC-QTOF/MS-a за опште непознати токсиколошки скрининг. Постављени су инструментални параметри за извођење MS и Auto MS/MS експеримената и испробани на постмортем узорцима биолошких течности, алтернативним узорцима као што је коса и биљном материјалу који је садржао синтетички канабиноид MMB-CHMISU. Auto MS/MS метода са фиксним колизионим енергијама и енергијама које се генеришу на основу молекулске масе једињења успешно је примењена у циљу успостављања услова за хроматографско раздвајање новодизајнираних психоактивних супстанци: мефедрона, метилона, MDPV, 2C-B, 25B-NBOMe, 25I-NBOMe, BZP, AM-2201, JWH-018, JWH-073, и лекова прегабалина, кетамина и норкетамина (метаболит кетамина) који су све чешћа појава на илегалном тржишту дрога.
- LC-QTOF/MS је тренутно најнапреднија метода за токсиколошки скрининг у судској токсикологији. Auto MS/MS режим рада омогућава бележење великог броја информација о једињењу као што су тачна молекулска маса, молекулска формула, изотопска расподела као и тачна маса фрагмената специфичних за једињење. Прикупљени подаци погодни су за ретроспективну анализу без поновног мерења уколико се касније појави сумња на присуство одређених токсиколошки значајних једињења.
- Савремене методе масене спектрометрије као што су LC-MS/MS, GC-MS/MS и LC-QTOF/MS пружају специфичне информације о аналиту потребне за његову идентификацију, али је неопходан и критички приступ аналитичара и токсиколошко знање и искуство у интерпретацији добијених резултата. Успостављање и критеријума за идентификацију један је од начина потврде добијеног резултата.

## **6. ЛІТЕРАТУРА**

1. Hoffmann E de, Stroobant V. Mass spectrometry: principles and applications. 3rd ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley; 2007. 489 p.
2. Yinon J, editor. Advances in forensic applications of mass spectrometry. Boca Raton: CRC Press; 2004. 279 p.
3. MD Osselton, AC Moffat and B Widdop. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons Forensic Toxicology MD Osselton, AC Moffat and B Widdop. Fourth edition. Osselton MD, Widdop B, Watts J, editors. Vol. Chapter 9. London ; Chicago: Pharmaceutical Press; 2011. 160 p.
4. Adatsi FK. Forensic Toxicology. In: Encyclopedia of Toxicology [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2022 Jan 24]. p. 647–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543003870>
5. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J, editors. Clarke's analysis of drugs and poisons. Fourth edition. London ; Chicago: Pharmaceutical Press; 2011. 2 p.
6. Gerostamoulos D. A Simplified Guide to Forensic Toxicology. <http://www.forensicsciencesimplified.org/tox/Toxicology.pdf>;
7. Drummer OH. Post-mortem toxicology. Forensic Sci Int. 2007 Jan;165(2–3):199–203.
8. W.L. Hearn, H.C. Walls, Introduction to postmortem toxicology, in: S.B. Karch (Ed.), Drug Abuse Handbook, CRC Press, Boca Raton, 1998, pp. 863–873.
9. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Sci Int. 2004 Jun;142(2–3):75–100.
10. B.R. Hepler, D.S. Isenschmid, Specimen selection, collection, preservation, and security, in: S.B. Karch (Ed.), Drug Abuse Handbook, CRC Press, Boca Raton, 1998, pp. 873– 889.
11. A.R.W. Forrest, Obtaining samples at post mortem examination for toxicological and biochemical analyses, J. Clin. Pathol. 46 (1993) 292–296.
12. Richardson T. Pitfalls in forensic toxicology. Ann. Clin. Biochem. 2000; 37: 20-44.
13. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA, Remião F, Marques A, Santos A, et al. Collection of biological samples in forensic toxicology. Toxicol Mech Methods. 2010 Sep;20(7):363–414.

14. Leikin JB, Watson WA. Post-mortem Toxicology: What The Dead Can And Cannot Tell Us: REVIEW. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2003 Jan;41(1):47–56.
15. Drummer OH, Gerostamoulos J. Postmortem Drug Analysis: Analytical and Toxicological Aspects: *Ther Drug Monit.* 2002 Apr;24(2):199–209.
16. F. Pragst, K. Spiegel, U. Leuschner, A. Hager, Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluidcomparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 168–172.
17. K.S. Scott, J.S. Oliver, Vitreous humor as an alternative sample to blood for the supercritical fluid extraction of morphine and 6-acetylmorphine, *Med. Sci. Law* 39 (1999) 77–81.
18. K.S. Scott, J.S. Oliver, The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodiazepines, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 694–697.
19. E.A. De Letter, P. De Paepe, K.M. Clauwaert, F.M. Belpaire, W.E. Lambert, J.F. Van Bocxlaer, M.H.A. Piette, Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits, *Int. J. Legal Med.* 114 (2000) 29–35.
20. M.D. Robertson, O.H. Drummer, Postmortem distribution and redistribution of nitrobenzodiazepines in man, *J. Forensic Sci.* 43 (1998) 9–13.
21. Y.H. Caplan, B. Levine, Vitreous humor in the evaluation of postmortem blood ethanol concentrations, *J. Anal. Toxicol.* 14 (1990) 305–307.
22. Viel G, Nalesso A, Cecchetto G, Montisci M, Ferrara SD. Stability of cocaine in formalin solution and fixed tissues. *Forensic Sci Int.* 2009 Dec;193(1–3):79–83.
23. Cingolani M, Froidi R, Mencarelli R, Mirtella D, Rodriguez D. Detection and Quantitation of Morphine in Fixed Tissues and Formalin Solutions. *J Anal Toxicol.* 2001 Jan 1;25(1):31–4.
24. Asano M, Yoshioka N, Kuse A, Kuwahara N, Nakabayashi Y, Takahashi M, et al. Stability of ten psychotropic drugs in formalin-fixed porcine liver homogenates. *Forensic Sci Int.* 2020 Feb;307:110136.
25. Ramagiri S, Shukla SK, Prakash PKS. Stability Study of Fluoxetine in Formalin-Fixed Liver Tissue. *J Anal Toxicol.* 2006 Nov 1;30(9):692–6.
26. P. Kintz, *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006.

27. Druid H, Strandberg JJ, Alkass K, Kugelberg FC, KROstrand R. Evaluation of role of abstinence in heroin overdose deaths using segmental hair analysis. *Forensic Sci. Int.* 2006; 1-4.
28. T. Richardson, Pitfalls in forensic toxicology, *Ann. Clin. Biochem.* 37 (2000) 20–44.
29. Fontanals N, Miralles N, Abdullah N, Davies A, Gilart N, Cormack PAG. Evaluation of strong cation-exchange polymers for the determination of drugs by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014 May;1343:55–62.
30. Płotka-Wasyłka J, Szczepańska N, de la Guardia M, Namieśnik J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC Trends Anal Chem.* 2016 Mar;77:23–43.
31. Augusto F, Hantao LW, Mogollón NGS, Braga SCGN. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013 Feb;43:14–23.
32. Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID, Whelpton R. *Fundamentals of Analytical Toxicology* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470516294>
33. *Fundamentals of Analytical Toxicology* Robert J. Flanagan, Andrew Taylor, Ian D. Watson, Robin Whelpton© 2007 John Wiley & Sons.
34. C. Dass, *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, 2001.
35. *Fundamentals of Analytical Toxicology* Robert J. Flanagan, Andrew Taylor, Ian D. Watson, Robin Whelpton© 2007 John Wiley & Sons.
36. Gross JH. *Mass spectrometry: a textbook*. Berlin ; New York: Springer; 2004. 518 p.
37. Физичко, хемијске методе, Рад, Београд, 1985. In.
38. <https://www.creative-proteomics.com/support/agilent-6540-uhd-quadrupole-time-of-flight-accurate-mass-mass-spectrometer.htm>.
39. Milman BL. *Chemical Identification and its Quality Assurance* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cited 2022 Feb 2]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-15361-7>
40. Milman BL. Identification of chemical compounds. *TrAC Trends Anal Chem.* 2005 Jun;24(6):493–508.

41. Milman BL. General principles of identification by mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2015 Jun;69:24–33.
42. Guidelines\_2006\_Final.pdf.
43. European Union Decision 2002/657/EC 17.8.2002, *Off. J. Eur. Commun.* 221 (2002) 8–36.
44. WADA Technical Document – TD2021IDCR.
45. Rivier L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. *Anal Chim Acta.* 2003 Sep;492(1–2):69–82.
46. standard\_for\_mass\_spec\_spectral\_data\_acceptance\_-\_asb.pdf.
47. chsac\_-\_tox\_-\_identification\_in\_forensic\_toxicology\_-\_for\_asb\_and\_website\_1.pdf.
48. Maralikova B, Weinmann W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J Chromatogr B.* 2004 Nov 5;811(1):21–30.
49. Favretto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the “New Psychoactive Substances.” *J Chromatogr A.* 2013 Apr;1287:84–95.
50. R. de Zeeuw, P. Franke, in: M.J. Bogusz (Ed.), *Forensic Science, Handbook of Separation Sciences*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, 2000, p. 567.
51. ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, International Organization for Standardization, Geneva, 1999.
52. K. Pflieger, H.H. Maurer, A. Weber, *Mass Spectra and GC Data for Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites*, vol. 4, 4th revised ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
53. L. Rivier, in: M. Burns (Ed.), *Medical-Legal Aspects of Drugs, Lawyers & Judges* Publishing Company Inc., Tucson, AZ, 2002, p. 103.
54. Broecker S, Herre S, Wüst B, Zweigenbaum J, Pragst F. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC–QTOF-MS with data-dependent acquisition. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Apr;400(1):101–17.

55. H.H. Maurer, K. Pflieger, A.A. Weber, Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, (2007).
56. S.I. Services, Wiley Registry<sup>TM</sup> of Mass Spectral Data 2010, <http://www.sisweb.com/software/ms/wiley.htm>.
57. S.E. Stein, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program: (Data Version: NIST 08, Software Version 2.0f), <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>.
58. F. Pragst, M. Herzler, B.T. Erxleben, Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD), *Clin Chem Lab Med*, 42 (2004) 1325-1340.
59. A. Pelander, I. Ojanpera, S. Laks, I. Rasanen, E. Vuori, Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chem*, 75 (2003) 5710-5718.
60. A. Pelander, J. Ristimaa, I. Ojanpera, Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J Anal Toxicol*, 34 (2010) 312-318.
61. M. Pavlic, K. Libiseller, H. Oberacher, Combined use of ESI-QqTOF-MS and ESI-QqTOF-MS/MS with mass-spectral library search for qualitative analysis of drugs, *Anal Bioanal Chem*, 386 (2006) 69-82.
62. A. Pelander, J. Ristimaa, I. Rasanen, E. Vuori, I. Ojanpera, Screening for basic drugs in hair of drug addicts by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Ther Drug Monit*, 30 (2008) 717-724.
63. A. Poletini, R. Gottardo, J.P. Pascali, F. Tagliaro, Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chem*, 80 (2008) 3050-3057.
64. H.K. Lee, C.S. Ho, Y.P. Iu, P.S. Lai, C.C. Shek, Y.C. Lo, H.B. Klinke, M. Wood, Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 649 (2009) 80-90.
65. M. Gergov, B. Boucher, I. Ojanpera, E. Vuori, Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated target library search based on elemental formulas, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15 (2001) 521-526.

66. M. Kolmonen, A. Leinonen, A. Pelander, I. Ojanpera, A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 585 (2007) 94-102.
67. M.K. Nielsen, S.S. Johansen, P.W. Dalsgaard, K. Linnet, Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS, *Forensic Sci Int*, 196 (2010) 85-92.
68. S. Ojanpera, A. Pelander, M. Pelzing, I. Krebs, E. Vuori, I. Ojanpera, Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20 (2006) 1161-1167.
69. Broecker S, Herre S, Pragst F. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci Int*. 2012 May;218(1-3):68-81.
70. Arsic, B. Macrolide antibiotics as anti-bacterial and potential anti-malarial medicines. Doktorska teza. Univerzitet u Mančesteru, Velika Britanija. 2012.
71. Davidson, E. R. Molecular mechanics and modeling: overview. *Chem. Rev.* 1993, 93, 7, 2337.
72. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general AMBER force field. *J. Comput. Chem.* 2004, 25, 1157-1174.
73. World Drug Report 2021 (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8).
74. United Nations Office on Drugs and Crime [https://www.unodc.org > tocta > 5.Heroin.pdf](https://www.unodc.org/tocta/5.Heroin.pdf).
75. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2021), Drug-related deaths and mortality in Europe: update from the EMCDDA expert network, Technical report, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
76. Drummer OH, Odell M. *Forensic Pharmacology Drugs of Abuse*. LONDON: Hodder Arnold; 2001.
77. Musshoff F, Trafkowski J, Madea B. Validated assay for the determination of markers of illicit heroin in urine samples for the control of patients in a heroin prescription program. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, (2004);811(1):47-52.
78. Olaf H, Drummer PhD. Toxicology. In: *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*. Victorian Institute Of Forensic Medicine, Viktoria, Australia 2002; 1.2: 9-16, 5: 230-60.



79. Shakleya DM, Dams R, Choo RE, Jones H, Huestis MA. Simultaneous Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Quantification of Urinary Opiates, Cocaine, and Metabolites in Opiate-Dependent Pregnant Women in Methadone-Maintenance Treatment. *J Anal Toxicol*. 2010 Jan 1;34(1):17–25.
80. <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (Accessed 11 February 2021).
81. United Nations, Global Synthetic Drugs Assessment 2020a. <https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/2020-globalsynthetic-drugs-assessment-main.html> (Accessed 25 February 2021).
82. Favreto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology: focus on the “New Psychoactive Substances”. *J Chromatogr A*. 2013;1287:84–95.
83. Zamengo L, Frison G, Bettin C, Sciarrone R. Understanding the risks associated with the use of new psychoactive substances (NPS): high variability of active ingredients concentration, mislabelled preparations, multiple psychoactive substances in single products. *Toxicol Lett*. 2014;229:220–8.
84. Elliott S. Investigating drugs of abuse at autopsy. *Diagn Histopathol*. 2018;24:341–5.
85. Elliott S, Sedefov R, Evans-Brown M. Assessing toxicological significance of new psychoactive substances in fatalities. *Drug Test Anal*. 2018;10:120–6.
86. Apirakkan O, Frinculescu A, Denton H, Shine T, Cowan D, Abbate V, et al. Isolation, detection and identification of synthetic cannabinoids in alternative formulations or dosage forms. *Forensic Chem*. 2020;18:100227.
87. Riley AL, Nelson KH, To P, Lopez-Arnau R, Xu P, Wang D, et al. Abuse potential and toxicity of the synthetic cathinones (i.e., “Bath salts”). *Neurosci Biobehav Rev*. 2020;110:150–73.
88. <https://www.unodc.org/LSS/SubstanceGroup/Details/8242b801-355c-4454-9fdc-ba4b7e7689d5>.
89. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), “Synthetic cathinones”, Drug Profiles accessed at [www.emcdda.europa.eu](http://www.emcdda.europa.eu).
90. Riley AL, Nelson KH, To P, López-Arnau R, Xu P, Wang D, et al. Abuse potential and toxicity of the synthetic cathinones (i.e., “Bath salts”). *Neurosci Biobehav Rev*. 2020 Mar;110:150–73.
91. Kelly JP. Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test Anal*. 2011;3:439–53.

92. Zawilska JB, Wojcieszak J. Designer cathinones-an emerging class of novel recreational drugs. *Forensic Sci Int.* 2013;231:42–53.
93. Karila L, Megarbane B, Cottencin O, Lejoyeux M. Synthetic cathinones: a new public health problem. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13:12–20.
94. Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu L-H, Huwyler J, et al. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol.* 2013;168:458–70.
95. Valente MJ, Guedes de Pinho P, de Lourdes Bastos M, Carvalho F, Carvalho M. Khat and synthetic cathinones: a review. *Arch Toxicol.* 2014;88:15–45.
96. Prosser JM, Nelson LS. The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *J Med Toxicol.* 2012;8:33–42.
97. Gardos G, Cole JO. Evaluation of pyrovalerone in chronically fatigued volunteers. *Curr Ther Res Clin Exp.* 1971;13(10):631–5.
98. Goldberg J, Gardos G, Cole JO. A controlled evaluation of pyrovalerone in chronically fatigued volunteers. *Int Pharmacopsychiatry.* 1973;8(1):60–9.
99. Kriikku P, Wilhelm L, Schwarz O, Rintatalo J. New designer drug of abuse: 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). Findings from apprehended drivers in Finland. *Forensic Sci Int.* 2011;210(1–3):195–200.
100. Backberg M, Lindeman E, Beck O, Helander A. Characteristics of analytically confirmed 3-MMC-related intoxications from the Swedish STRIDA project. *Clin Toxicol.* 2015;53(1):46–53.
101. WHO. Critical review project of 3-methylmethcathinone (3-MMC) for 38th ECDD meeting; 2016.
102. Adamowicz P, Gieron J, Gil D, Lechowicz W, Skulska A, Tokarczyk B. 3-Methylmethcathinone – interpretation of blood concentrations based on analysis of 95 cases. *J Anal Toxicol.* 2016;40:272–6.
103. Power JD, McGlynn P, Clarke K, McDermott SD, Kavanagh P, O’Brien J. The analysis of substituted cathinones. Part 1: chemical analysis of 2-, 3- and 4-methylmethcathinone. *Forensic Sci Int.* 2011;212(1–3):6–12.
104. Christie R, Horan E, Fox J, O’Donnell C, Byrne HJ, McDermott S, et al. Discrimination of cathinone regioisomers, sold as ‘legal highs’, by Raman spectroscopy. *Drug Test Anal.* 2014;6(7–8):651–7.

105. Feyissa AM, Kelly J. A review of the neuropharmacological properties of khat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat*. 2008;32:1147–66.
106. Baumann MH, Ayestas MA Jr, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley P, et al. The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:1192–203.
107. Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR, Thorndike EB, Hoffman AF, Holy M, et al. Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive “bath salts” products. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38:552–62.
108. Lopez-Arnau R, Martinez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone. *Br J Pharmacol*. 2012;167:407–20.
109. Martinez-Clemente J, Escubedo E, Pubill D, Camarasa J. Interaction of mephedrone with dopamine and serotonin targets in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012;22:231–6.
110. Meyer MR, Wilhelm J, Peters FT, Maurer HH. Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography- mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397:1225–33.
111. Gibbons S, Zloh M. An analysis of the “legal high” mephedrone. *Bioorg Med Chem*. 2010;20:4135–9.
112. Dargan PI, Sedefov R, Gallegos A, Wood DM. The pharmacology and toxicology of the synthetic cathinone mephedrone (4-methylmethcathinone). *Drug Test Anal*. 2011;3:454–63.
113. Liechti M. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signalling. *Swiss Med Wkly*. 2015;145(w):14043.
114. Dasgupta A. Abuse of magic mushroom, peyote cactus, LSD, khat, and volatiles. *Critical issues in alcohol and drugs of abuse testing*. 2nd edn; 2019.
115. [https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones\\_en](https://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones_en). Accessed 14/07/2020.
116. Meyer MR, Wilhelm J, Peters FT, Maurer HH. Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of

- mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography- mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397:1225–33.
117. Majchrzak M, Celinski R, Kus P, Kowalska T, Sajewicz M. The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol.* 2018;36:33–50.
118. Papaseit E, Perez-Mana C, de Sousa Fernandes Perna EB, Olesti E, Mateus J, Kuypers KP, et al. Mephedrone and alcohol interactions in humans. *Front Pharmacol.* 2020;10:1588.
119. Katz DP, Bhattacharya D, Bhattacharya S, Deruiter J, Clark CR, Suppiramaniam V, et al. Synthetic cathinones: a khat and mouse game. *Toxicol Lett.* 2014;229:349–56.
120. Uralets V, Rana S, Morgan S, Ross W. Testing for designer stimulants: metabolic profiles of 16 synthetic cathinones excreted free in human urine. *J Anal Toxicol.* 2014;38:233–41.
121. Lusthof KJ, Oosting R, Maes A, Verschraagen M, Dijkhuizen A, Sprong AGA. A case of extreme agitation and death after the use of mephedrone in The Netherlands. *Forensic Sci Int.* 2011;206:e93–5.
122. Shima N, Kakehashi H, Matsuta S, Kamata H, Nakano S, Sasaki K, et al. Urinary excretion and metabolism of the  $\alpha$ -pyrrolidinophenone designer drug 1-phenyl-2-(pyrrolidine-1-yl)octan-1-one (PV9) in humans. *Forensic Toxicol.* 2015;33:279–94.
123. Hill SL, Thomas SH. Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clin Toxicol (Phila).* 2011;49:705–19.
124. Maurer HH. Chemistry, pharmacology, and metabolism of emerging drugs of abuse. *Ther Drug Monit.* 2010;32:544–9.
125. Shulgin A. *Pihkal: a chemical love story.* Berkeley: Transform Press; 1991.
126. Corazza O, Schifano F, Farre M, Deluca P, Davey Z, Torrens M, et al. Designer drugs on the internet: a phenomenon out-of-control? The emergence of hallucinogenic drug Bromo- Dragonfly. *Curr Clin Pharmacol.* 2011;6:125–9.
127. Elz S, Klas T, Warnke U, Pertz H. Development of highly potent partial agonists and chiral antagonists as tools for the study of 5-HT<sub>2A</sub>-receptor mediated function. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2002;365(1 Suppl):R29.
128. Heim R. *Synthese und pharmakologiepotenter 5-HT<sub>2A</sub>rezeptoragonisten mit N-2-methoxybenzyl-partialstruktur.* Berlin: Freien Universitat Berlin; 2003.

129. Trachsel D. Fluorine in psychedelic phenethylamines. *Drug Test Anal.* 2012;4:577–90.
130. Le Roux G, Bruneau C, Lelievre B, Deguigne MB, Turcant A, Harry P, et al. Recreational phenethylamine poisonings reported to a French poison control center. *Drug Alcohol Depend.* 2015;154:46–53.
131. Kueppers VB, Cooke CT. 25I-NBOMe related death in Australia: a case report. *Forensic Sci Int.* 2015; 249:e15–e18.
132. Logan BK, Reinhold LE, Xu A, Diamond FX. Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States. *J Forensic Sci.* 2012;57:1168–80.
133. Aldlgan AA, Torrance. HJ. Bioanalytical methods for the determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological specimens. *TrAC Trends Anal Chem.* 2016 Jun;80:444–57.
134. King, L.A and A.T. Kicman, “A brief history of ‘new psychoactive substances’”, *Drug Testing Analysis* 3 (2011): 401-403.
135. Karila L, Marillier M, Chaumette B, Billieux J, Franchitto N, Benyamina A. New synthetic opioids: part of a new addiction landscape. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;106:133–40.
136. Reich DL, Silvey G. Ketamine: an update on the first twentyfive years of clinical experience. *Can J Anaesth.* 1989;36:186–97.
137. White PF, Way WL, Trevor AJ. Ketamine – its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology.* 1982;56:119–36.
138. Petrillo TM, Fortenberry JD, Linzer JF, Simon HK. Emergency department use of ketamine in pediatric status asthmaticus. *J Asthma.* 2001;38(8):657–64.
139. Smith KM, Larive LL, Romanelli F. Club drug: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(11):1067–76.
140. WHO Expert Committee on Drug Dependence, JWH-018, Critical Review Report, Thirty-sixth Meeting Geneva, 2014.
141. WHO Expert Committee on Drug Dependence, 4-Methylethcathinone (4-MEC), Critical Review Report, Thirty-eighth Meeting Geneva, 2016.
142. WHO Expert Committee on Drug Dependence, 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) Pre-Review Report, Thirty-fifth Meeting Hammamet, Tunisia, 2012.

143. WHO Expert Committee on Drug Dependence, 25B-NBOMe, Critical Review Report, Thirty-sixth Meeting Geneva, 2014.
144. WHO Expert Committee on Drug Dependence, 25I-NBOMe, Critical Review Report, Thirty-sixth Meeting Geneva, 2014.
145. WHO Expert Committee on Drug Dependence, 3,4-Methylenedioxypropylone (MDPV), Critical Review Report, Thirty-sixth Meeting, Geneva, 2014.
146. WHO Expert Committee on Drug Dependence, 25C-NBOMe, Critical Review Report, Thirty-sixth Meeting Geneva, 2014.
147. WHO Expert Committee on Drug Dependence, AH-7921, Critical Review Report, Thirty-sixth Meeting Geneva, 2014.
148. WHO Expert Committee on Drug Dependence Ethylone, Critical Review Report, Thirty-eighth Meeting Geneva, 2016.
149. WHO Expert Committee on Drug Dependence, JWH-073, Critical Review Report, Thirty-eighth Meeting Geneva, 2016.
150. WHO Expert Committee on Drug Dependence, Methylone (bk-MDMA), Critical Review Report Thirty-sixth Meeting, Geneva, 2014.
151. WHO Expert Committee on Drug Dependence, N-benzylpiperazine (BZP) Pre-Review Report, Thirty-fifth Meeting Hammamet, Tunisia, 2012.
152. Arsic, B.; Aguilar, J.A.; Bryce, R.A.; Barber, J. Conformational study of tylosin A in water and full assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra of tylosin A in D<sub>2</sub>O and tylosin B in CDCl<sub>3</sub>. *Magn. Reson. Chem.* 2017, 55, 367–73.
153. <https://www.caymanchem.com/product/17984/mmb-chmica>.
154. NPS and related compounds-analytical reports. [https://www.policija.si/apps/nfl\\_response\\_web/seznam.php](https://www.policija.si/apps/nfl_response_web/seznam.php) (accessed 30 March 2021).
155. Boumba VA, Di Rago M, Peka M, Drummer OH, Gerostamoulos D. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Sci Int.* 2017 Oct;279:192–202.
156. Li, L.; Li, C.; Zhang, Z.; Alexov, E. On the dielectric “constant” of proteins: Smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. *J. Chem. Theory Comput.* 2013, 9, 2126–2136.

157. Xi, K.; Wang, F.-H.; Xiong, G.; Zhang, Z.-L.; Tan, Z.-J. Competitive binding of Mg<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> ions to nucleic acids: From helices to tertiary structures. *Biophys. J.* 2018, 114, 1776–1790.
158. Lukic, V.; Micic, R.; Arsic, B.; Nedovic, B.; Radosavljevic, Z. Overview of the major classes of new psychoactive substances, psychoactive effects, analytical determination and conformational analysis of selected illegal drugs. *Open Chem.* 2021, 19, 60-106.
159. Lukic, V.; Micic, R.; Arsic, B.; Mitic, M.; Jovanovic, M.; Pavlovic, A. Identification of synthetic cannabinoid methyl 2-[[1-(cyclohexylmethyl)-1H-indol-3-yl] formamido]-3-methylbutanoate using modern mass spectrometry and nuclear magnetic resonance techniques. *Open Chem.* 2021, 19, 1259-1273.
160. Lukic, V.; Micic, R.; Arsic, B.; Jokic, A.; Sejmanovic, D. Prediction of physico-chemical properties of illegal drugs using the conformational analysis. 6th IAPC meeting (sixth world conference on physico-chemical methods in drug discovery and third world conference on ADMET and DMPK). 4–7. septembar 2017, Zagreb, Hrvatska, 2017, 41.
161. Eshleman, A.J.; Nagarajan, S.; Wolfrum, K.M.; Reed, J.F.; Swanson, T.L.; Nilsen, A.; et al. Structure-activity relationships of bath salt components: substituted cathinones and benzofurans at biogenic amine transporters. *Psychopharmacology* 2019, 236(3), 939–952.
162. Kostic, E.J.; Arsic, B.B.; Milosavljevic, B.S.; Vujovic, M.M. Docking analysis of selected cathinones on a complex of SAP97 PDZ2 with 5-HT<sub>2A</sub> receptor peptide. Sixth international conference on novel psychoactive substances. 8–9. april 2019, Maastricht, Holandija, 2019.
163. Floresta, G.; Rescifina, A.; Abbate, V. Structure-based approach for the prediction of  $\mu$ -opioid binding affinity of unclassified designer fentanyl-like molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(9), 2311.
164. Vujović, M.; Ragavendran, V.; Arsić, B.; Kostić, E.; Mladenović, M. DFT calculations as an efficient tool for prediction of Raman and infra-red spectra and activities of newly synthesized cathinones. *Open Chem.* 2020, 18, 185–195.
165. ILAC Document G-19, Guideline for Forensic Science Laboratories, 2002.

**ПРИЛОЗИ**



**Хероин**

Врста дроге и употреба		Потентни наркотички аналгетик кратког деловања против болова, едема плућа и контроле дисања код неонатуса
Доступност и особине или друга имена		Улична дрога са неким терапијским употребама. Такође позната као диаморфин, диацетилморфин или ацетоморфин
Хемијски облик и растворљивост		Хероин је доступан као слободна база и у облику соли хидрохлорида; соли су углавном растворљиве у води; чистоћа уличне дроге варира од 3% до 70%
Особине		
CAS	561-27-3	
MW	396.4	
pKa	7.6	
VD	Видети морфин	
CL	Видети морфин	
Везивање за протеине	Видети морфин	
Биорасположивост	Веома ниска	
Полувреме елиминације из крви	2-7 min.	Хероин
	3-25 min.	6-Ацетилморфин
	2-3 h	Морфин
Утицај година и болести		Нема студија, али највероватније су слични морфину
Метаболизам		Деацетилација и конјугација
Метаболити		6-ацетилморфин, морфин, глукурониди
Активни метаболити		6-ацетилморфин, морфин
Екскреција путем урина	0%	Хероин
	0.5%	6-ацетилморфин
	5%	Морфин
	55%	Глукурониди морфина
Уобичајене дозе	5-10 mg	Код одраслих
Концентрација у крви (20 mg и.в.)	400 и 50 ng/mL	Хероин и морфин - концентрација за 2 минута
	0 и 20 ng/mL	Хероин и морфин - концентрација за 60 минута
Постмортал артефакти		Постмортал метаболизам до морфина
Токсичност и потенцијал злоупотребе		Високо токсичан са високим потенцијалом злоупотребе, све концентрације морфина су потенцијално фаталне

**Прилог 1: Хероин – монографија (78)**

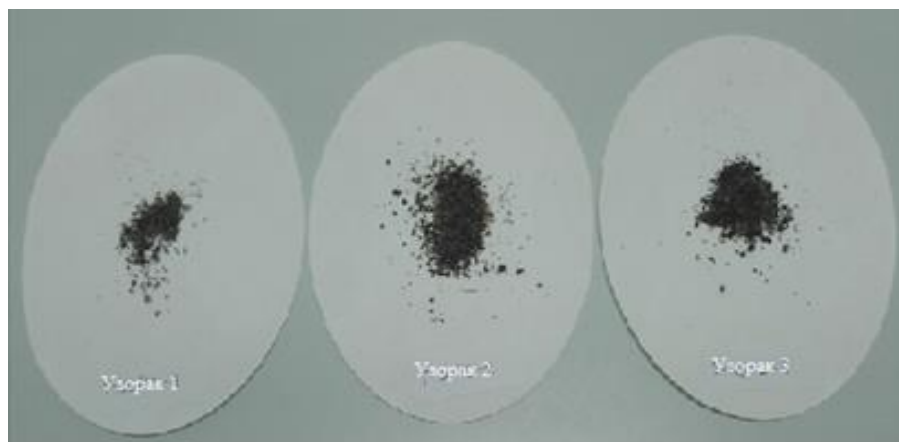
**Морфин**

Врста дроге и употреба		Потентни наркотички аналгетик који се користи за ублажавање умерених и јаких болова и придружене анксиозности, као анестетик у току операције
Доступност и особине или друга имена		Anamorph, Karanol, Morphalgin, Ms Contin, таблете и препарати са успореним ослобађањем и раствори за ињекције, Astramorph, Duramorph, Infumorph, Kadian, MSIR, Oramorph, Roxanol, и други одговарајући производи
Хемијски облик и растворљивост		Морфин је доступан као сулфат и со хидрохлорида, који су растворљиви у води
Особине		
CAS	57-27-2	
MW	303.4	
pKa	7.95	
VD	1-6 L/kg	
CL	21 mL/min/kg	
Везивање за протеине	35%	
Биорасположивост	15-64%	
Полувреме елиминације из крви	1-8h	Морфин
Утицај година и болести		Смањен клиренс са годинама, обољења јетре и бубрега
Метаболизам		Конјугација, деметилација
Метаболити		N-дезметил, глукурониди на позицијама 3 и 6-
Активни метаболити		Норморфин и морфин 6-глукуронид
Екскреција путем урина	2-10% 50-60%	Морфин Глукурониди морфина, 3 и 6
Уобичајене дозе	5-3000 mg дневно	Зависи од потребе
Концентрација у крви	до 1000 ng/mL	Велики опсег у зависности од дозе
Постмортал артефакти		Нема значајне промене након смрти
Токсичност и потенцијал злоупотребе		Високо токсично, фаталне концентрације се крећу од 0.01 mg/L; високи потенцијал злоупотребе

**Прилог 2: Морфин – монографија (78)**

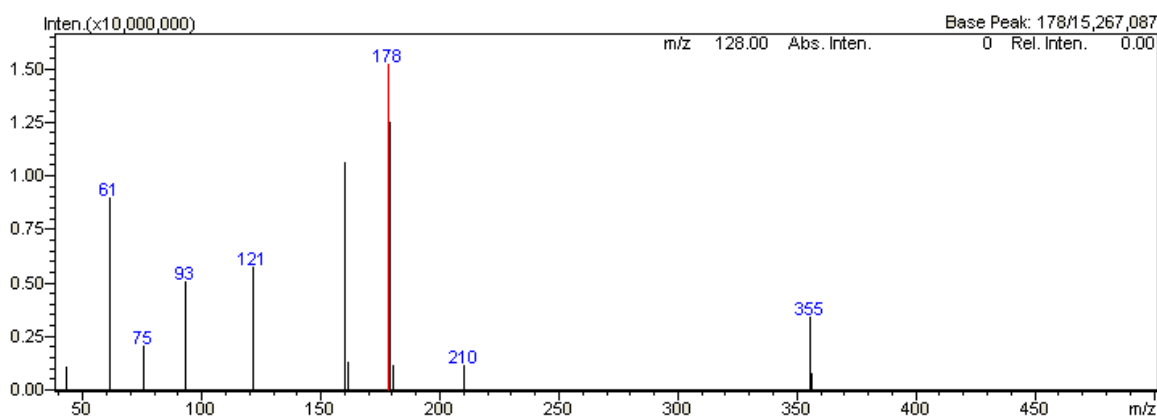
<b>Кодеин</b>		
Врста дроге и употреба		Слаб аналгетик који се користи за слабе и умерене болове, као антитусик и за лечење дијареје
Доступност и особине или друга имена		Разноврсни препарати, 8mg са парацетамолом (acetaminophen) без рецепта, и 30-50 mg обично уз рецепт, и бројни други
Хемијски облик и растворљивост		Доступан као хидрохлорид, соли сулфата и фосфата, растворљив у води
Особине		
CAS	76-57-3	
MW	317.4	
pKa	8.2	
VD	3.5L/kg	
CL		
Везивање за протеине	7%	
Биорасположивост	Умерена	
Полувреме елиминације из крви	2-4h	Кодеин
Утицај година и болести		Мало утицаја
Метаболизам		О-деметилација до морфина и коњугација
Метаболити		Морфин и 3-и 6- глукуронид
Активни метаболити		Морфин
Екскреција путем урина	5-17%	Кодеин
	0.5%	Норкодеин
	трагови	Морфин
	32-56%	Глукурониди кодеина
	5-13%	Глукурониди морфина
Уобичајене дозе	8-60 mg 3 до 4 пута дневно	Код одраслих
Концентрација у крви		
Постмортал артефакти		Нема значајних промена постмортал у феморалној крви
Токсичност и потенцијал злоупотребе		Фатална концентрација >0.4mg/L; низак потенцијал злоупотребе

### Прилог 3: Кодеин – монографија (78)

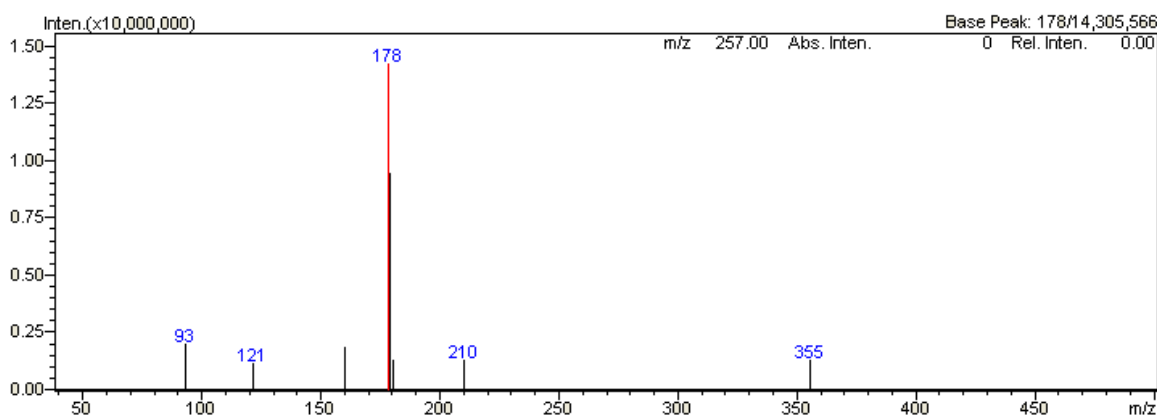


**Прилог 4:** Узорци биљног материјала који садрже JWH-018

Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.101->0.169]-[0.068<->0.575] Scan#: [13->21]-[9<->69]

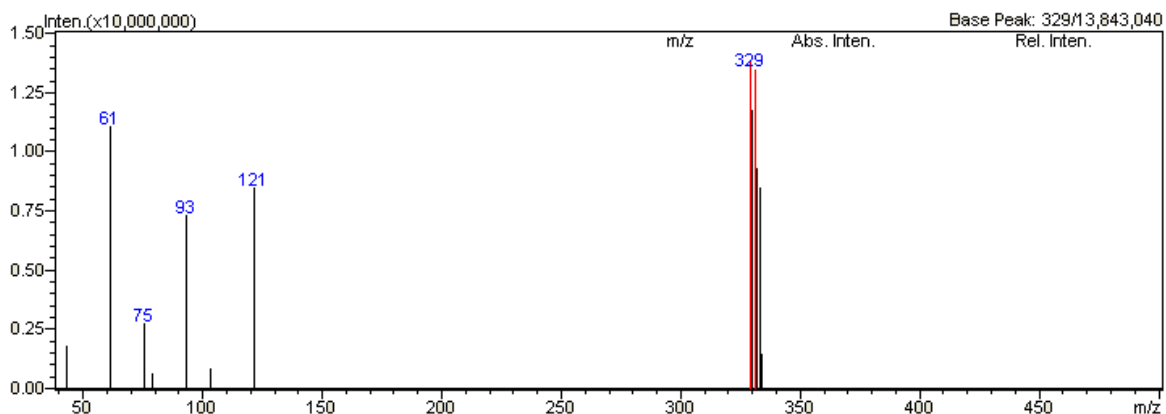


Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.110->0.178]-[0.076<->0.584] Scan#: [14->22]-[10<->70]

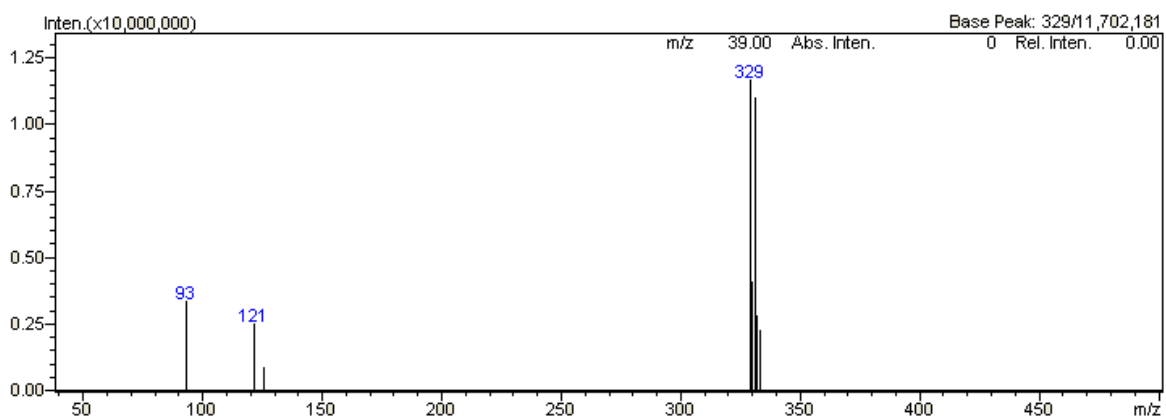


**Прилог 5:** ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, мефедрон

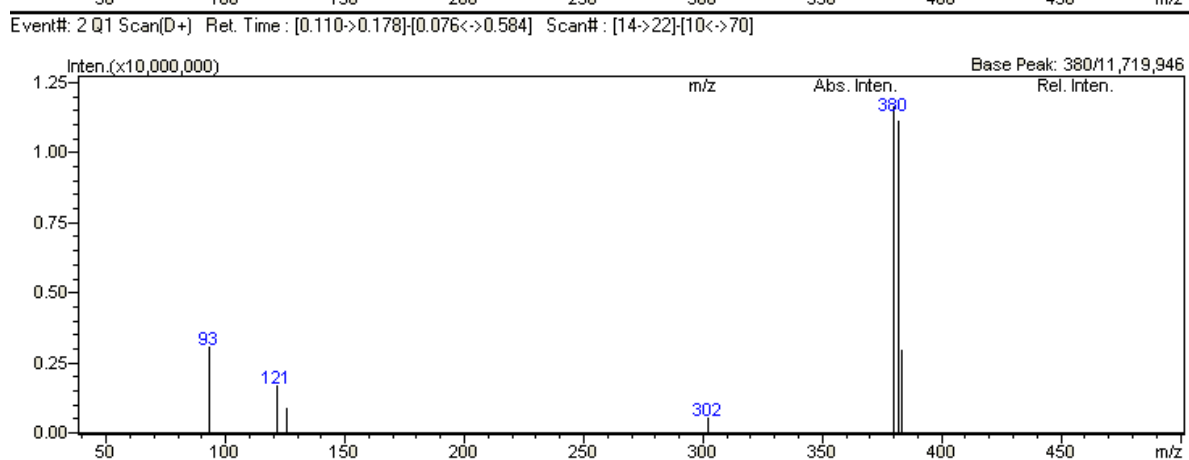
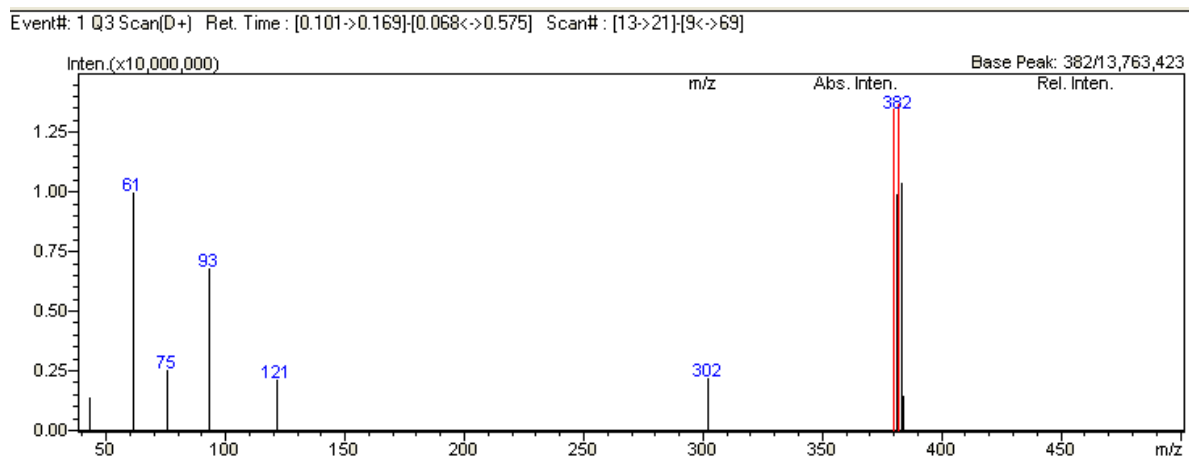
Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.101->0.169]-[0.068<->0.609] Scan# : [13->21]-[9<->73]



Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.110->0.178]-[0.076<->0.617] Scan# : [14->22]-[10<->74]

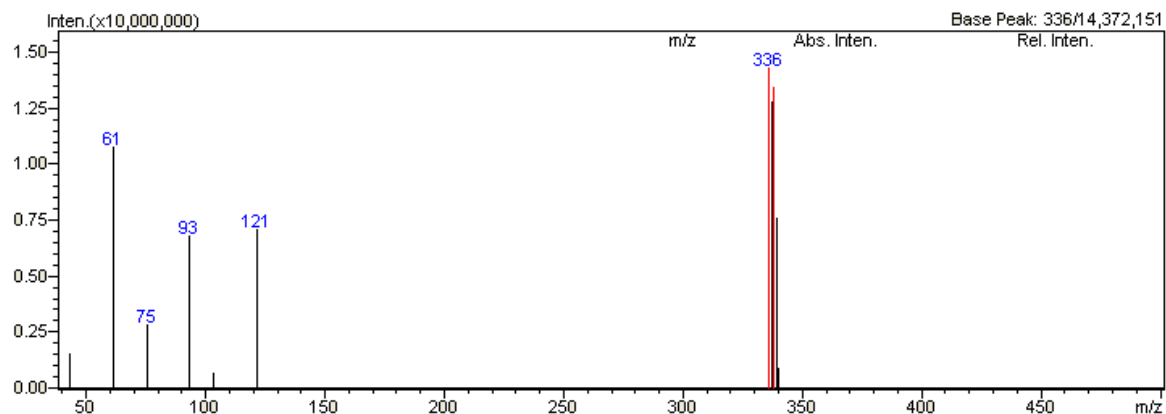


Прилог 6: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, AH-7921

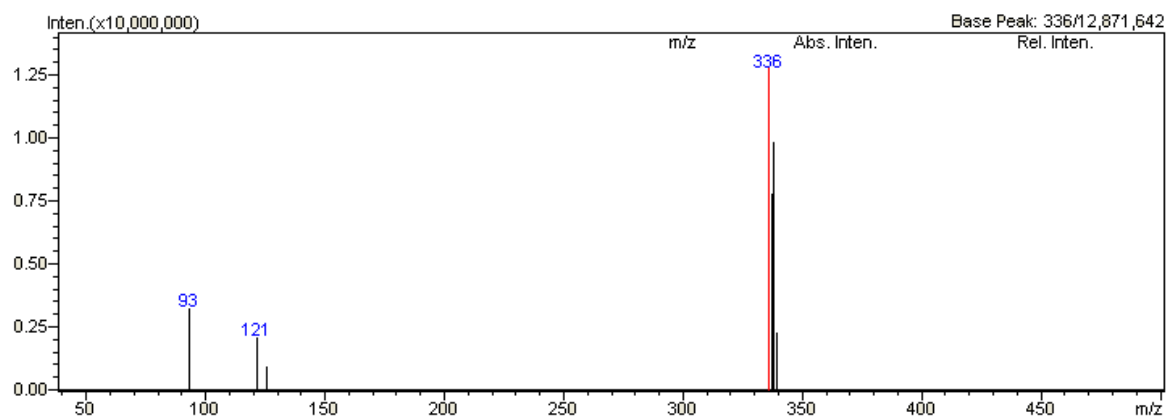


**Прилог 7: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, 25B-NBOMe**

Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.101->0.169][0.068<->0.541] Scan#: [13->21][9<->65]

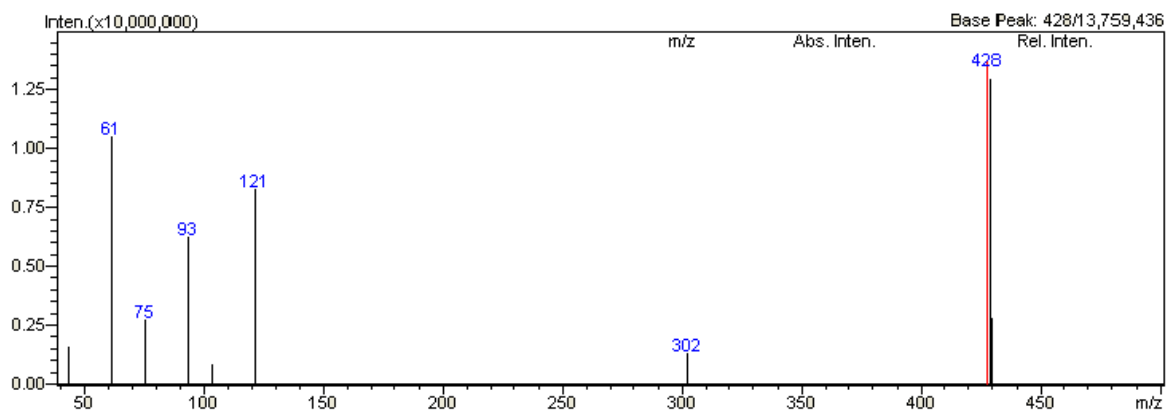


Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.110->0.178][0.076<->0.550] Scan#: [14->22][10<->66]

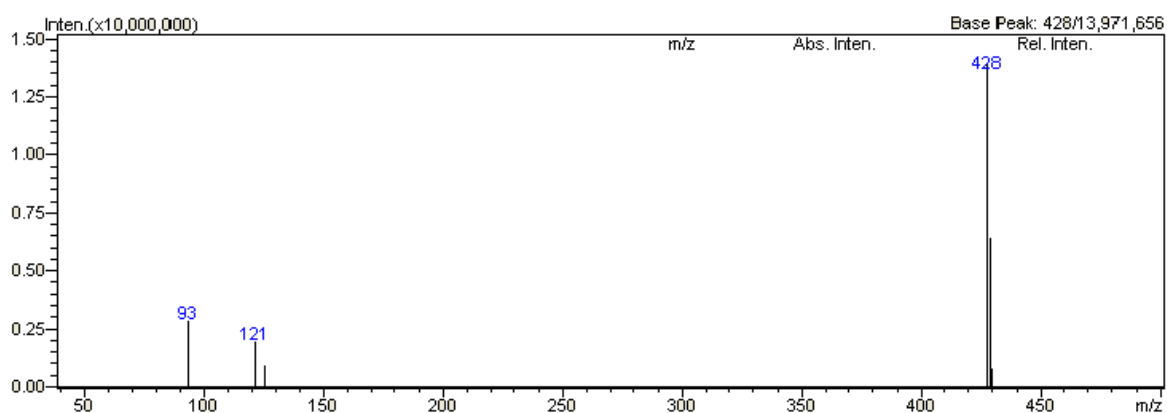


**Прилог 8:** ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, 25C-NBOMe

Event#: 1 Q3 Scan[D+] Ret. Time : [0.101-&gt;0.169]-[0.068&lt;-&gt;0.812] Scan# : [13-&gt;21]-[9&lt;-&gt;97]

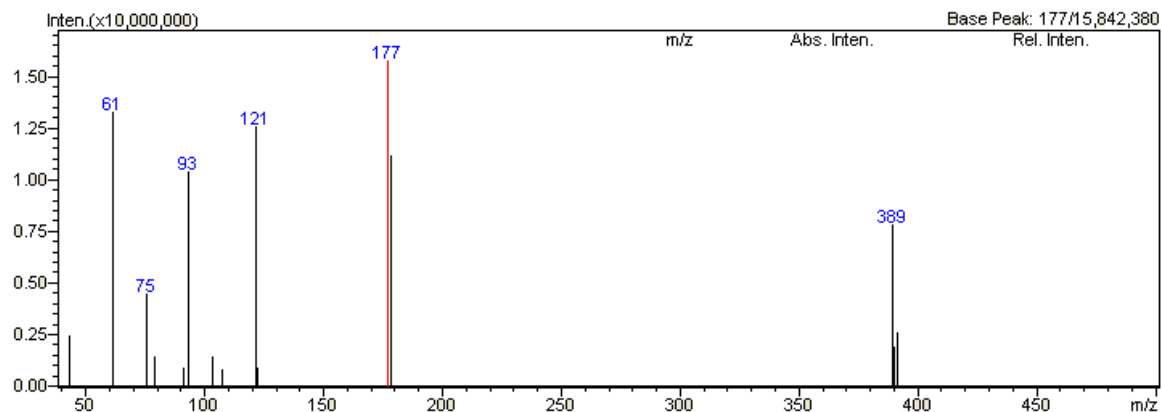


Event#: 2 Q1 Scan[D+] Ret. Time : [0.110-&gt;0.178]-[0.076&lt;-&gt;0.820] Scan# : [14-&gt;22]-[10&lt;-&gt;98]

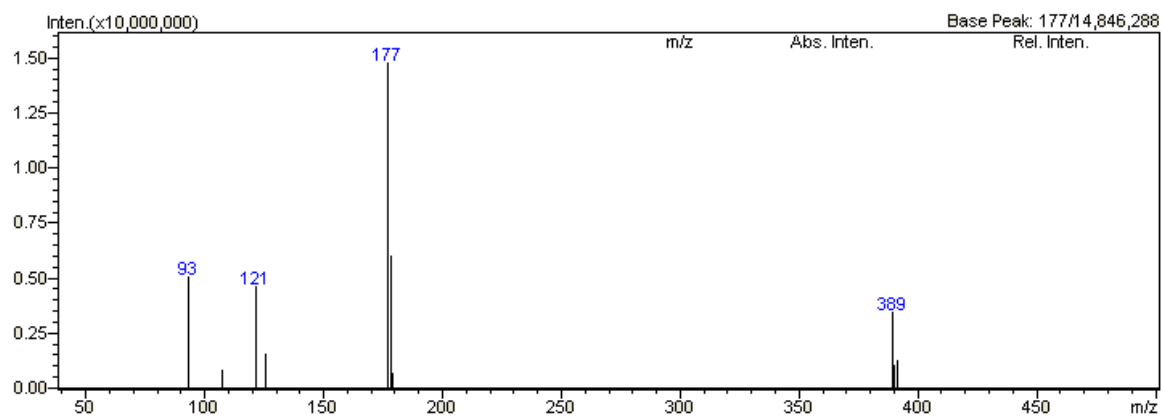
**Прилог 9: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, 25I-NBOMe**



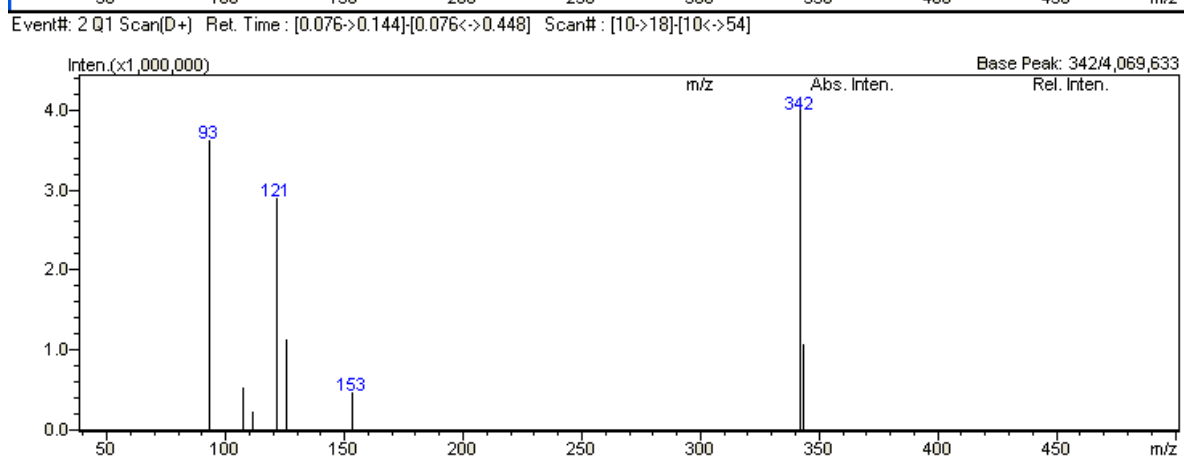
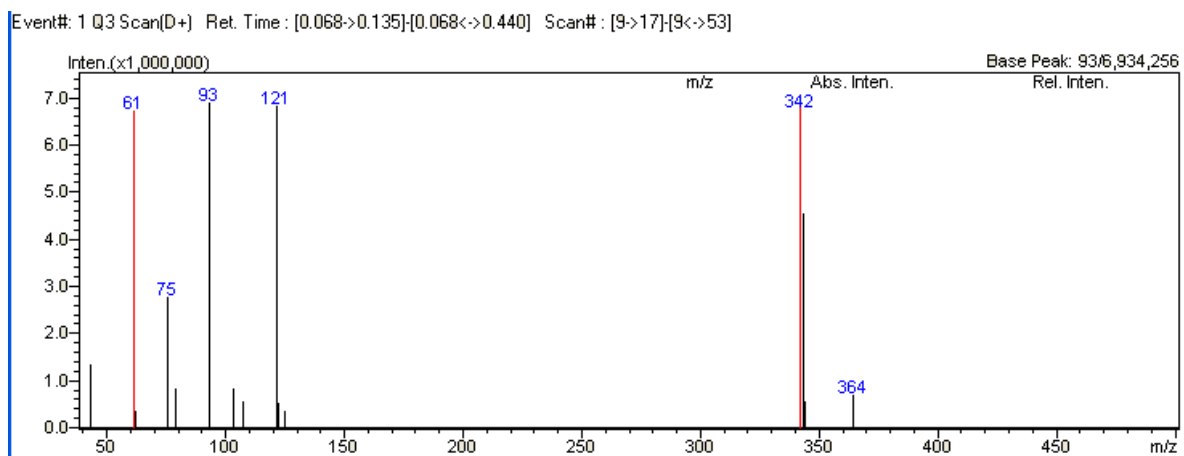
Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time: [0.135->0.203]-[0.068<->0.778] Scan#: [17->25]-[9<->93]



Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time: [0.144->0.211]-[0.076<->0.786] Scan#: [18->26]-[10<->94]

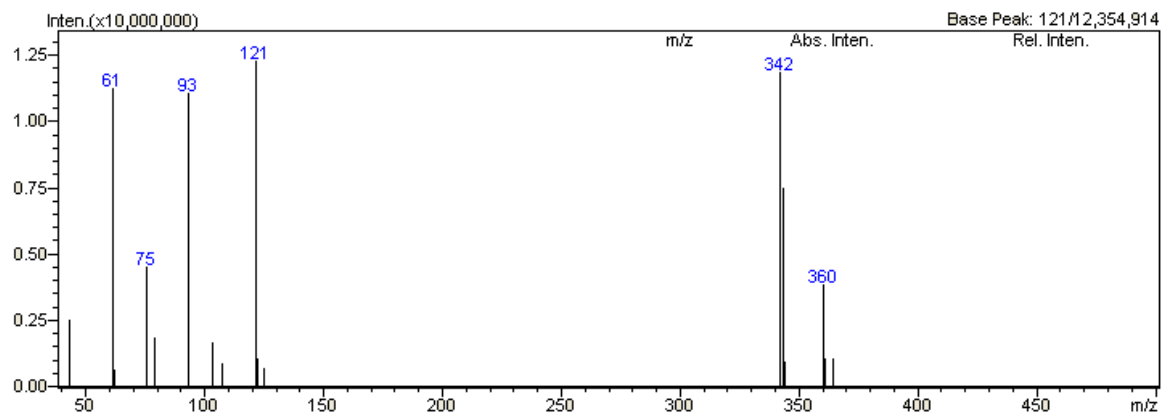


Прилог 10: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, BZP

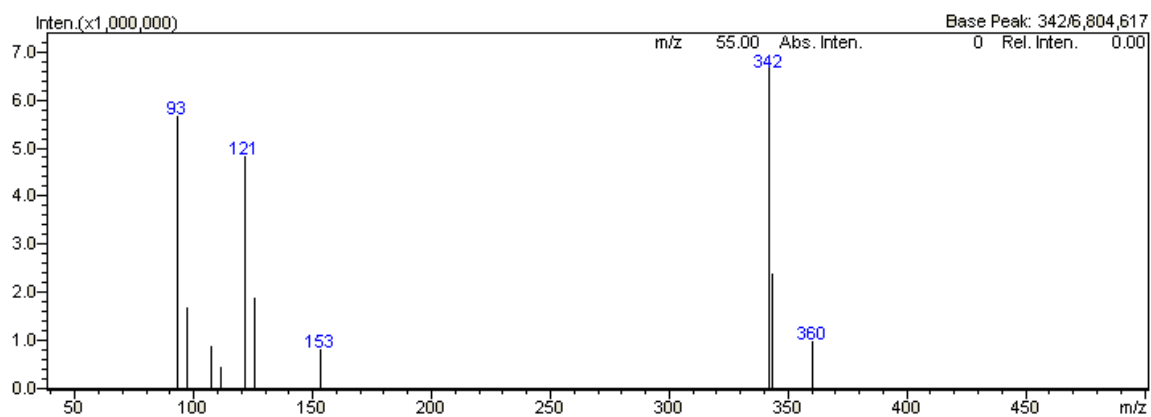


**Прилог 11:** ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, JWH-018

Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.101->0.169][0.068<->0.744] Scan# : [13->21][9<->89]

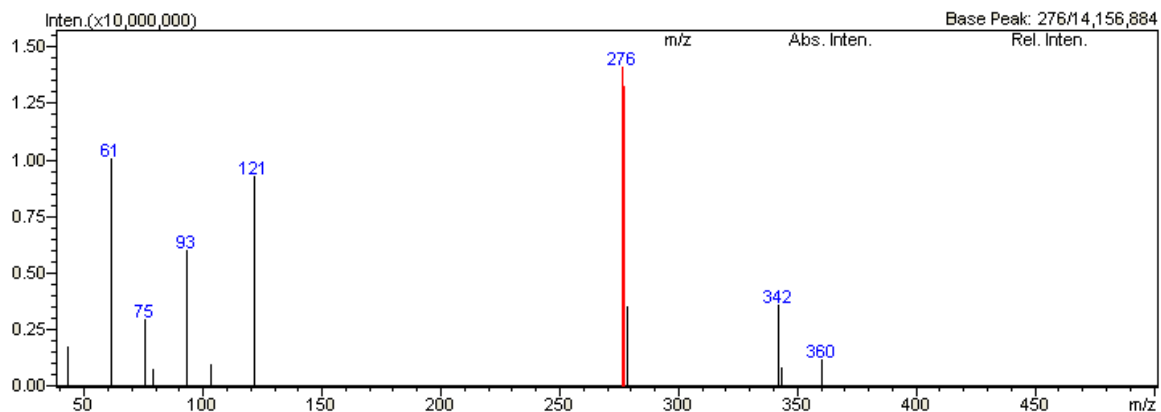


Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.110->0.178][0.076<->0.753] Scan# : [14->22][10<->90]

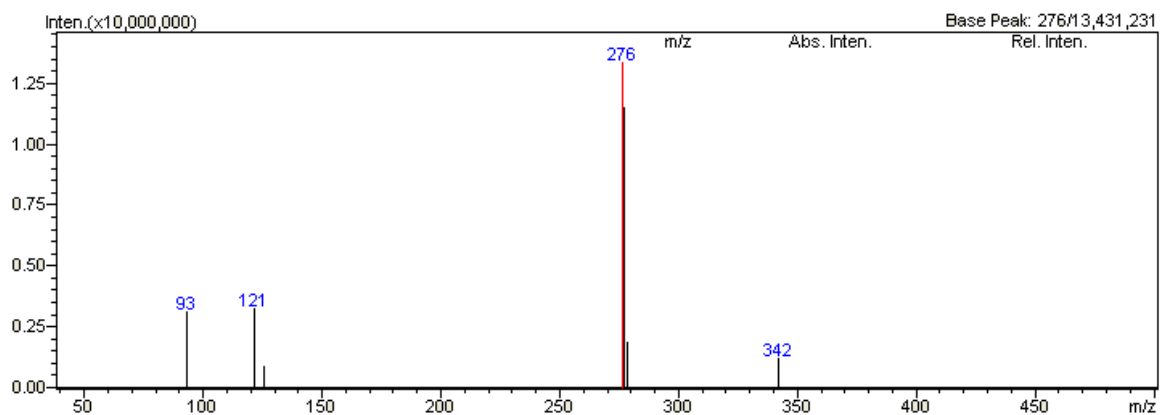


Прилог 12: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, AM-2201

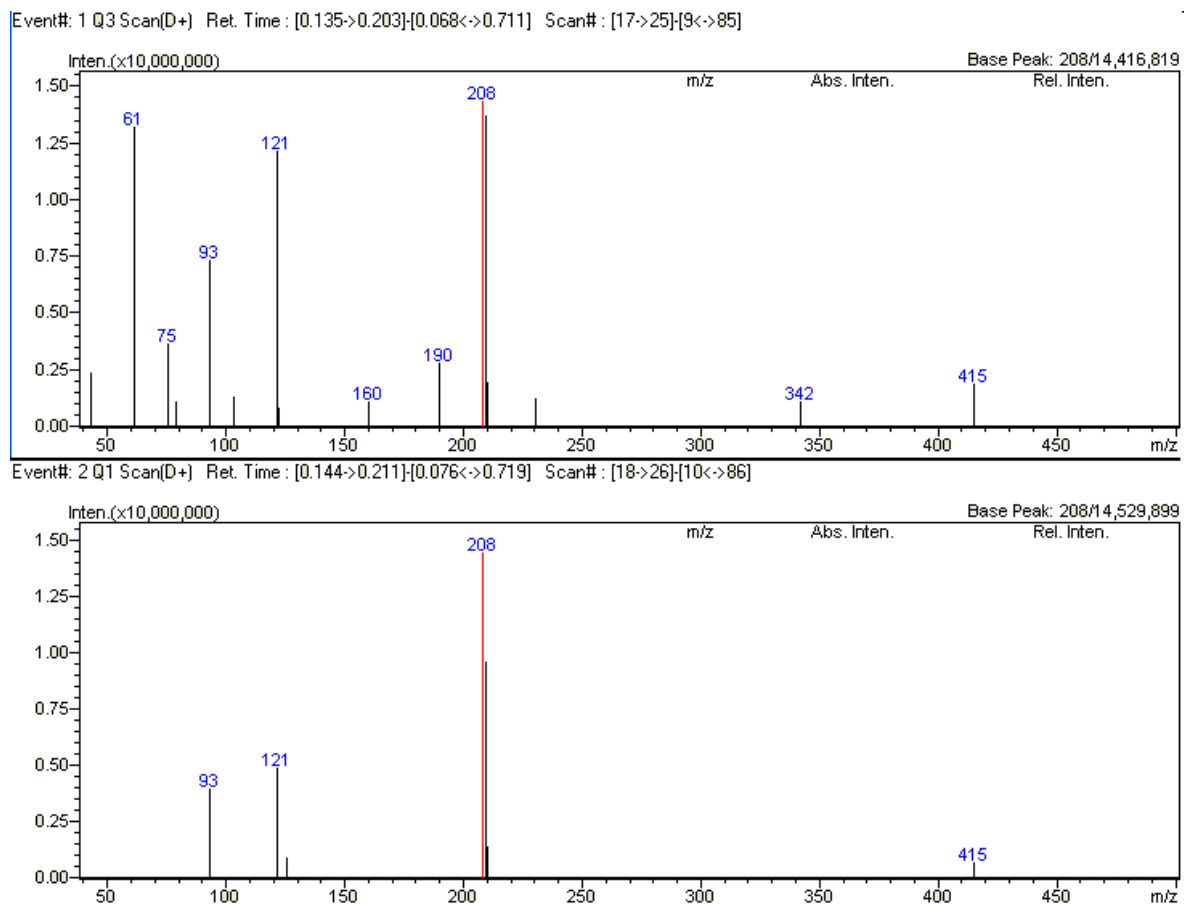
Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.101->0.169][0.068<->0.812] Scan# : [13->21][9<->97]



Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.110->0.178][0.076<->0.820] Scan# : [14->22][10<->98]

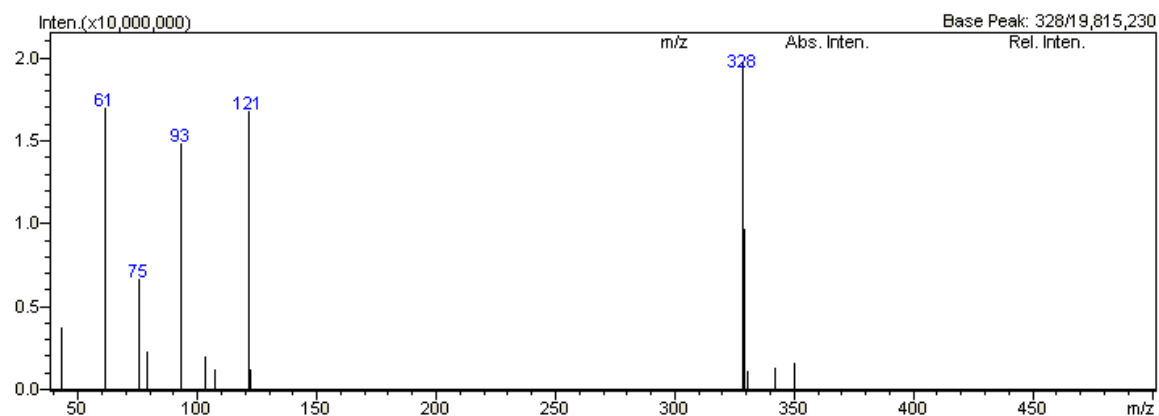


Прилог 13: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, MDPV

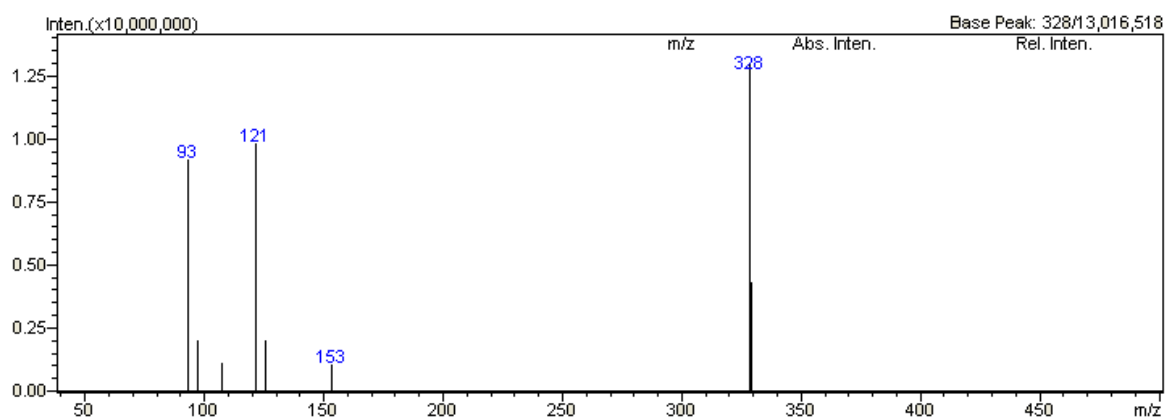


Прилог 14: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, Метилон

Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.169->0.237]-[0.068<->0.677] Scan# : [21->29]-[9<->81]

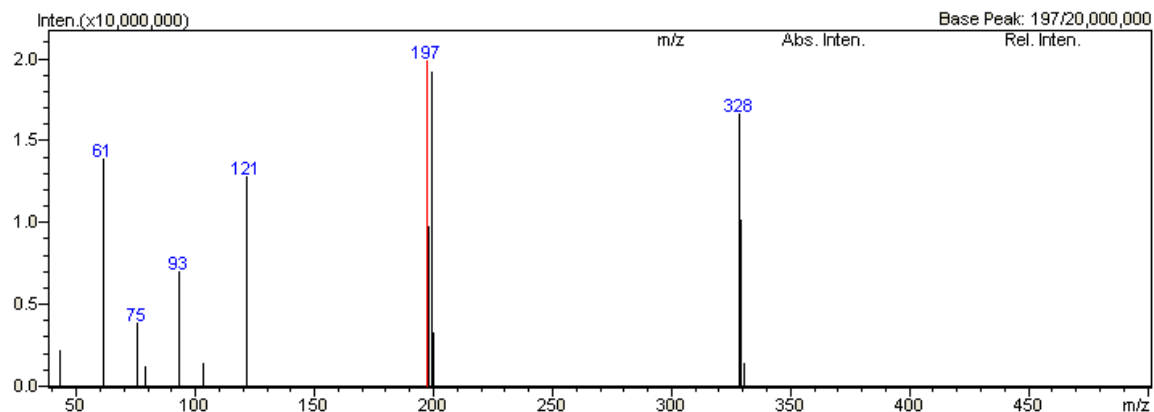


Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.178->0.245]-[0.076<->0.685] Scan# : [22->30]-[10<->82]

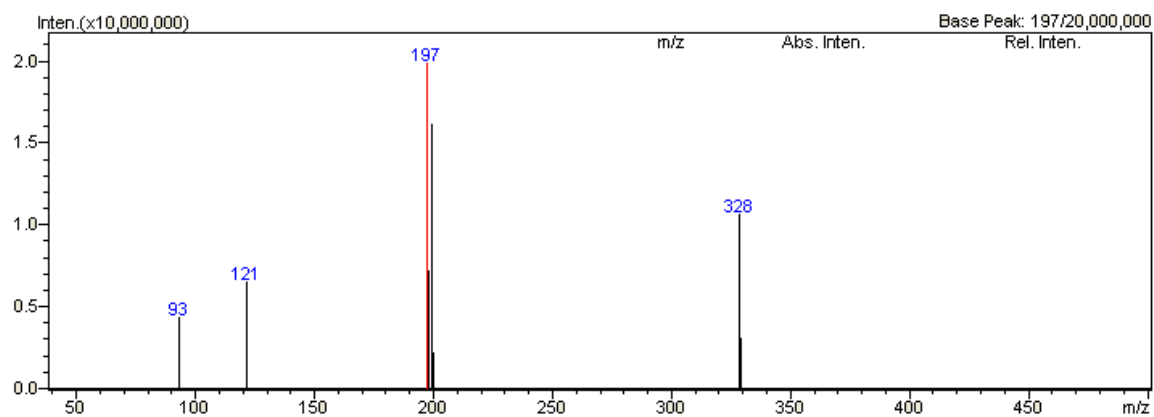


**Прилог 15:** ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, JWH-073

Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time: [0.203->0.271]-[0.101<->0.846] Scan#: [25->33]-[13<->101]

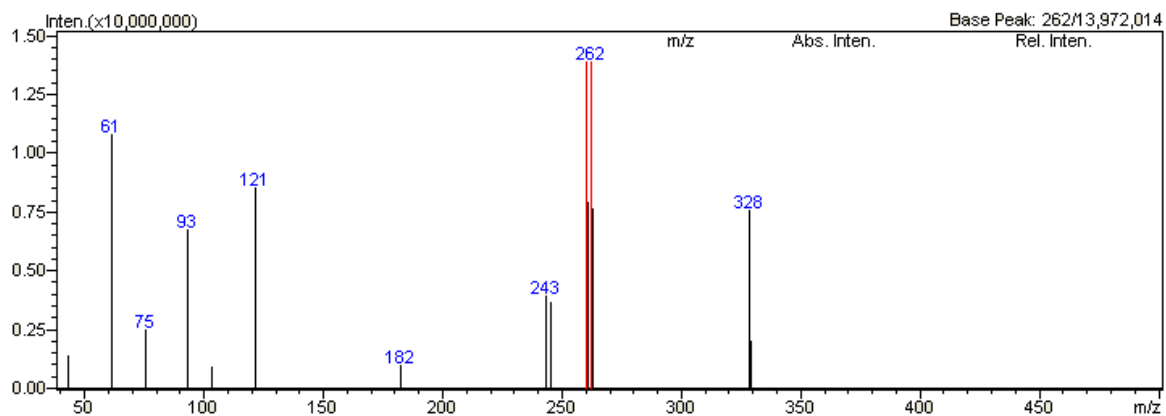


Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time: [0.211->0.279]-[0.110<->0.854] Scan#: [26->34]-[14<->102]

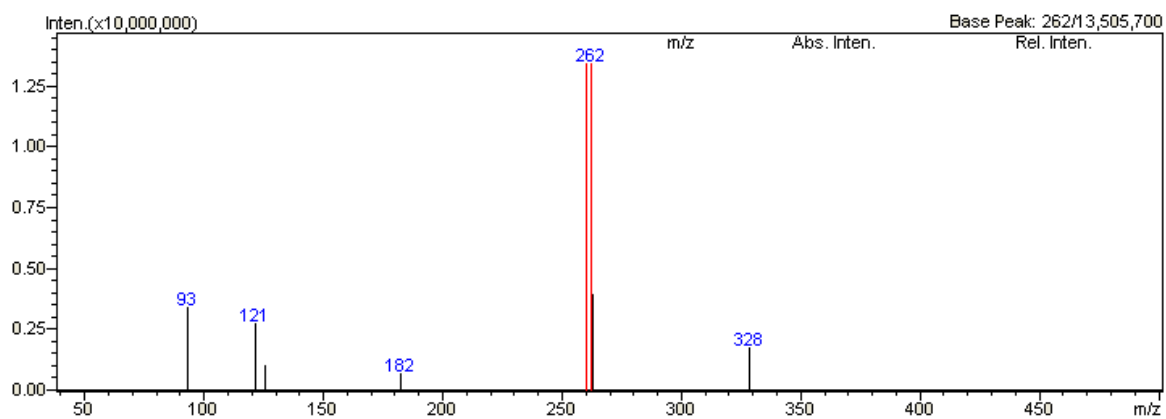


Прилог 16: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, mCPP

Event#: 1 Q3 Scan(D+) Ret. Time : [0.101->0.169][0.068<->0.575] Scan#: [13->21][9<->69]

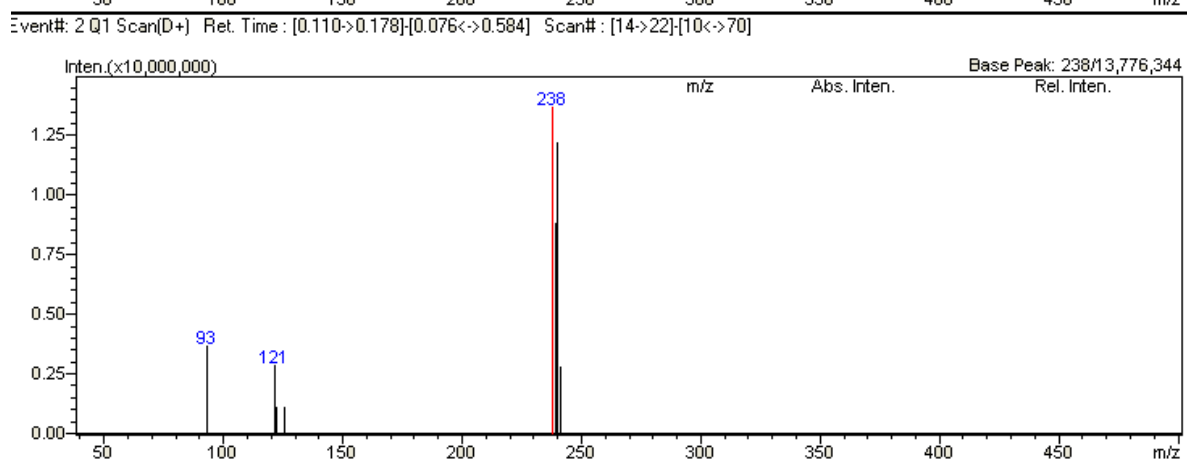
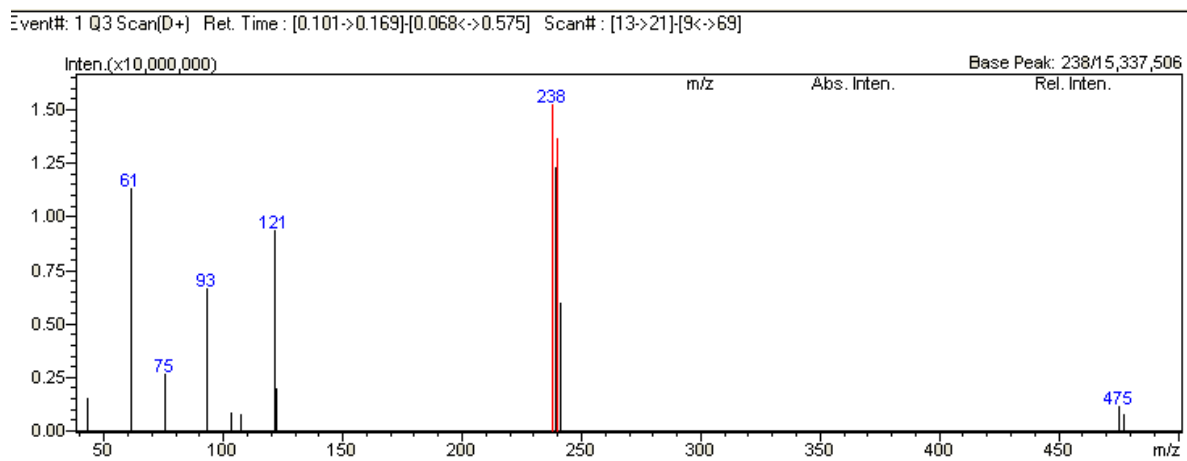


Event#: 2 Q1 Scan(D+) Ret. Time : [0.110->0.178][0.076<->0.584] Scan#: [14->22][10<->70]

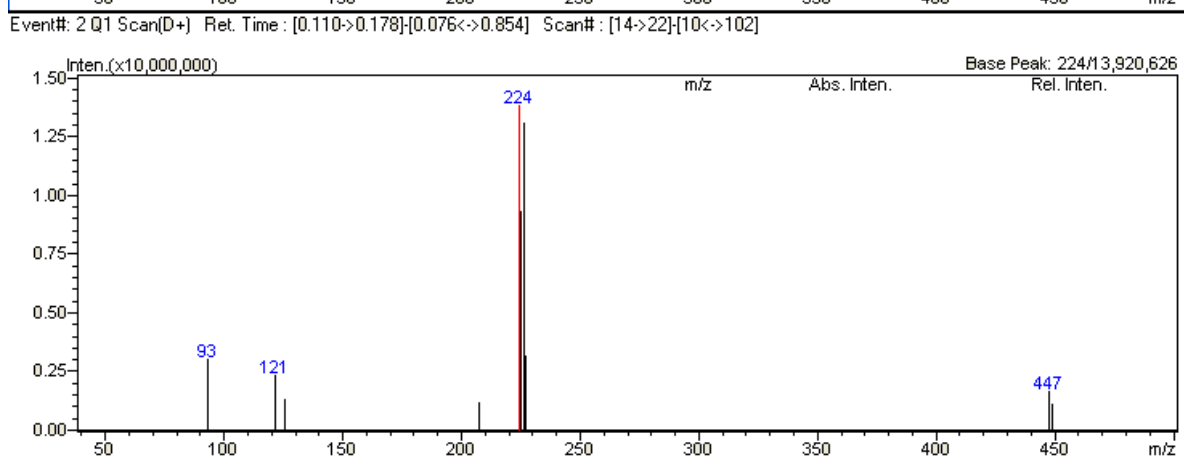
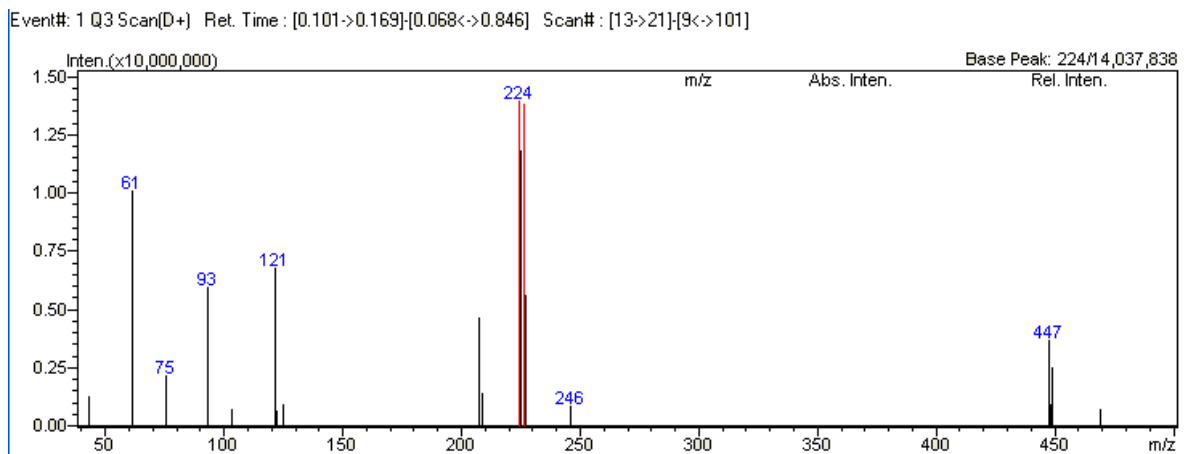


Прилог 17: ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, 2C-B





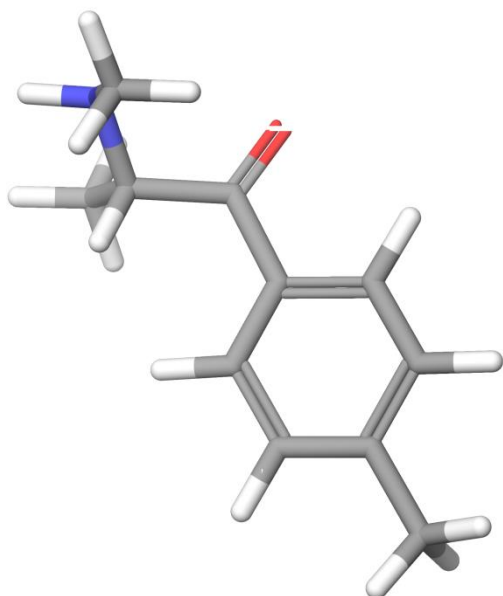
**Прилог 18:** ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, Кетамин



**Прилог 19:** ESI LC-MS/MS, масени спектар Product Ion Scan Q3 и Q1, Норкетамин

Име и структура – глобални минимум за једињења

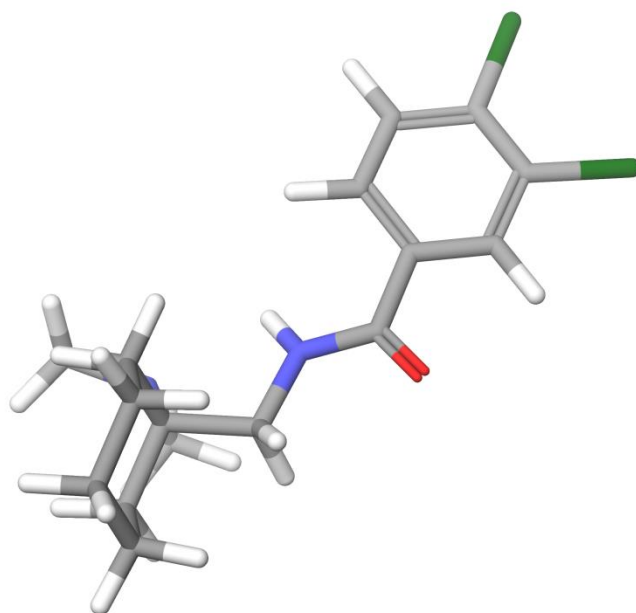
Енергија  
глобалних  
минимума,  
kJ/mol



276.15

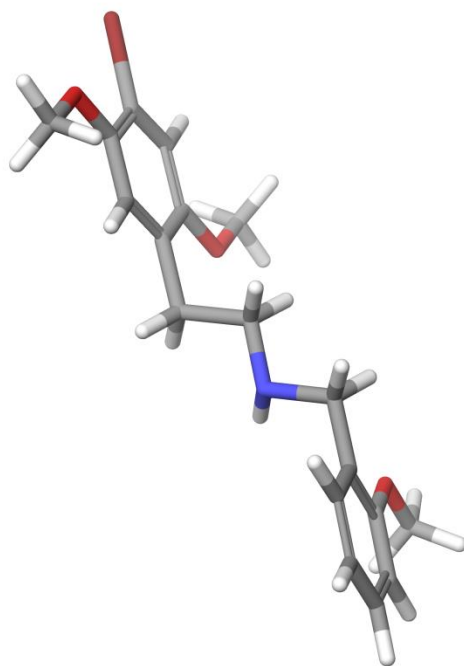
mephedrone

Ah-7921



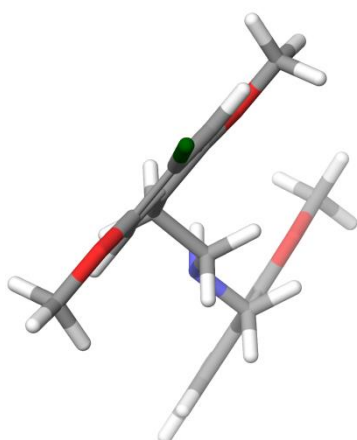
153.56

25B-NBOMe



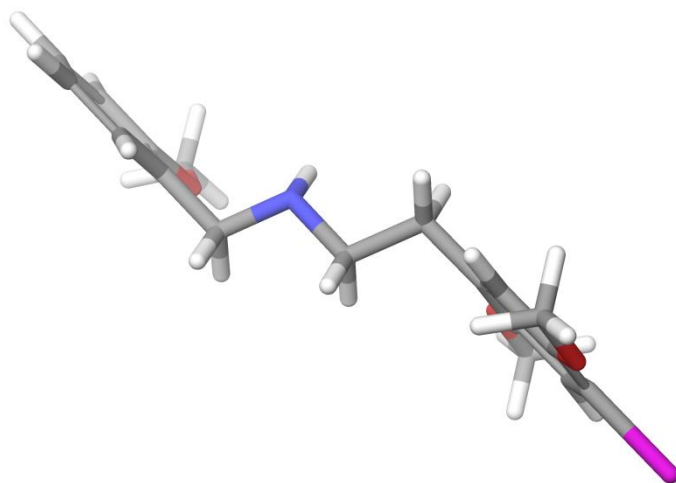
244.92

25C-NBOMe



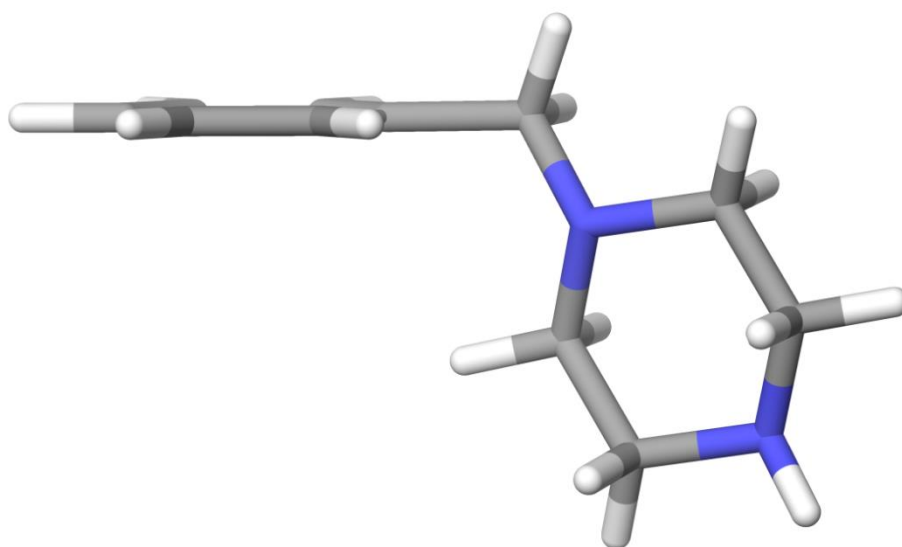
252.04

25I-NBOMe



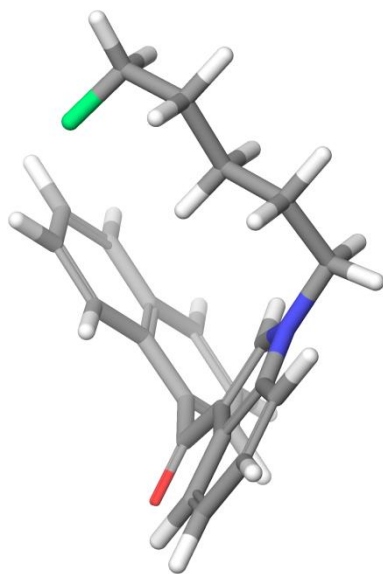
244.16

BZP



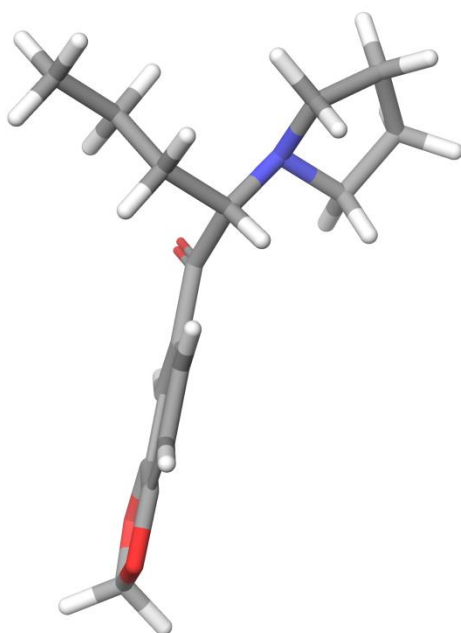
307.50

AM-2201

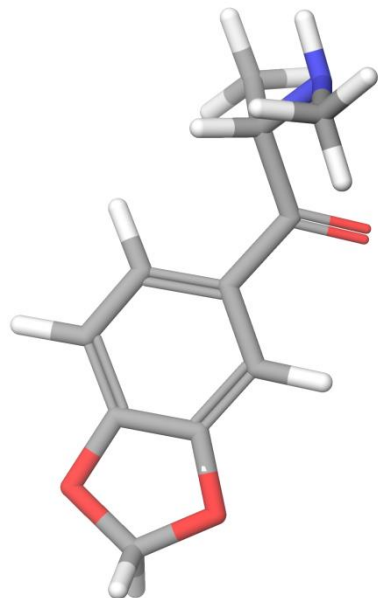


345.15

MDPV



265.43

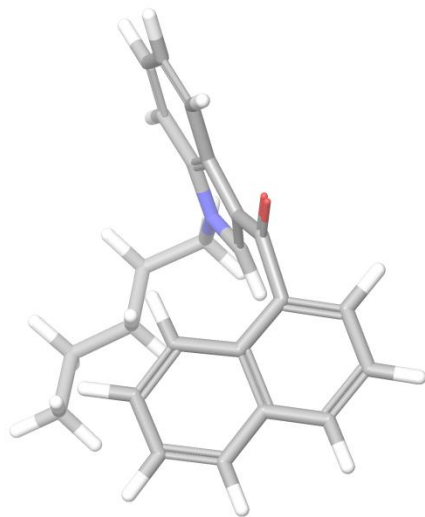


Methylone

243.09

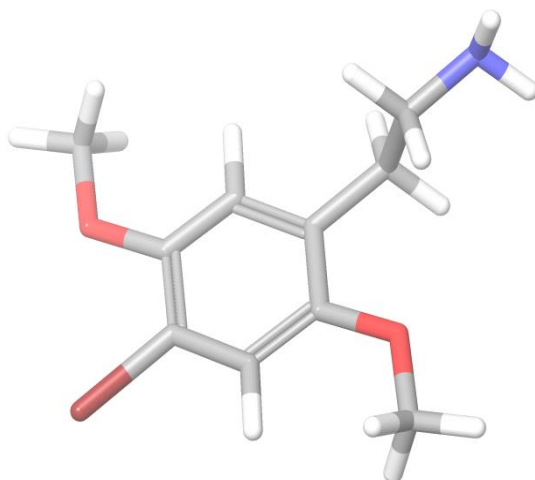


JWH-018



340.96

2C-B



143.71

---

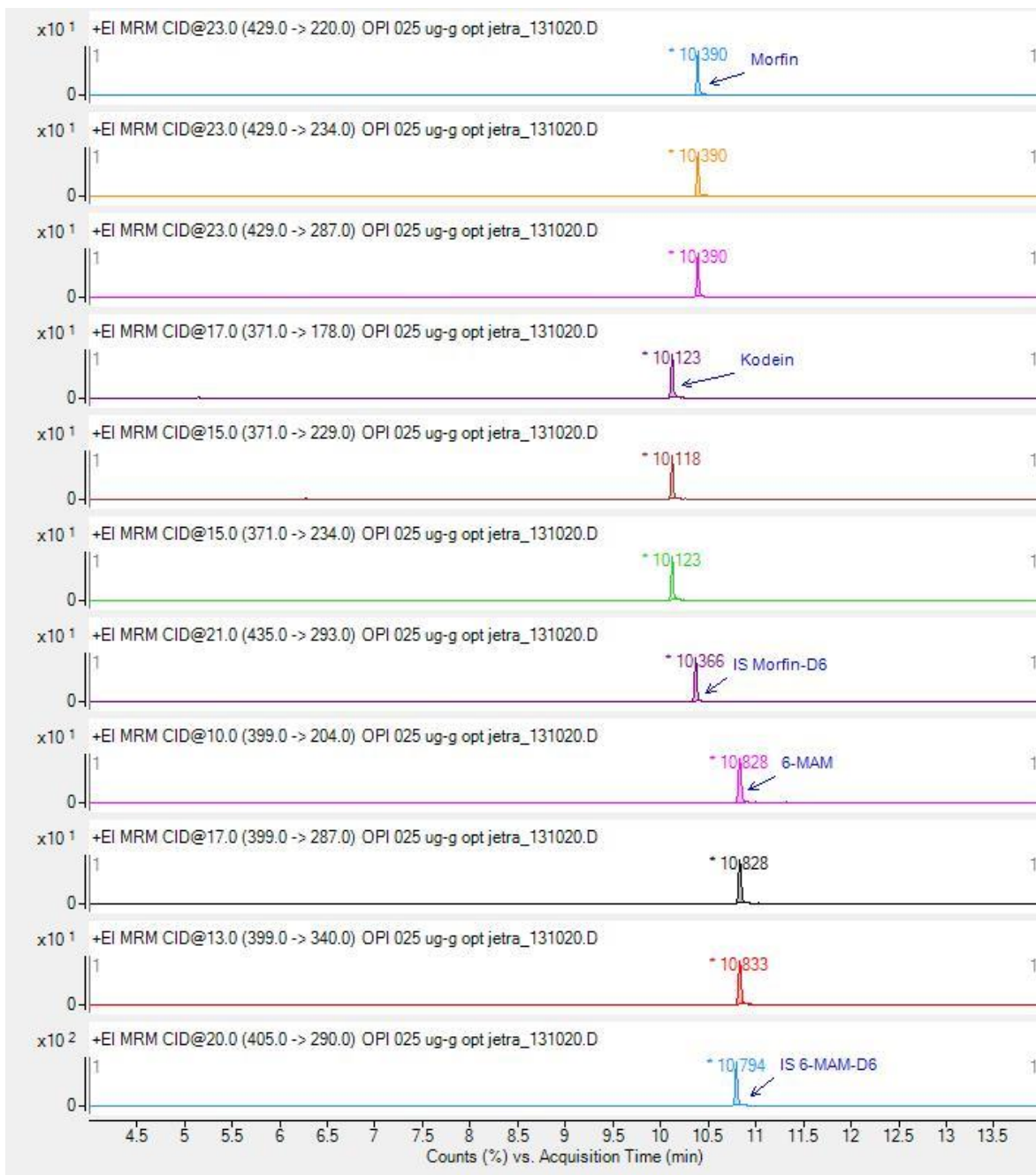
**Прилог 20:** Структуре глобалних минимума и њихове енергије.



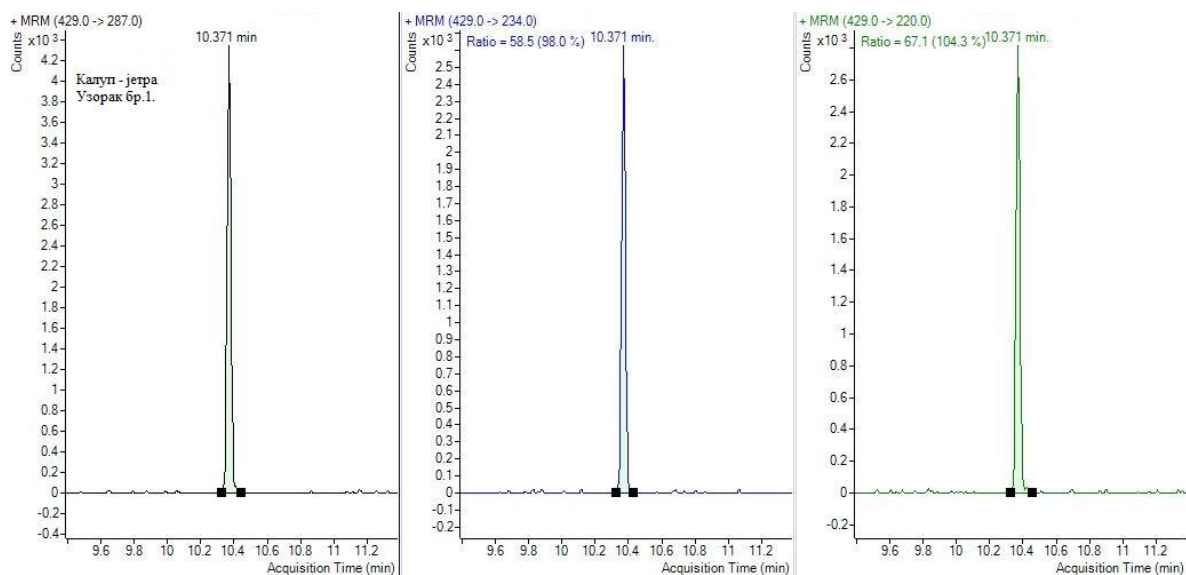
**Прилог 21:** Ткиво јетре у парафинском калупу



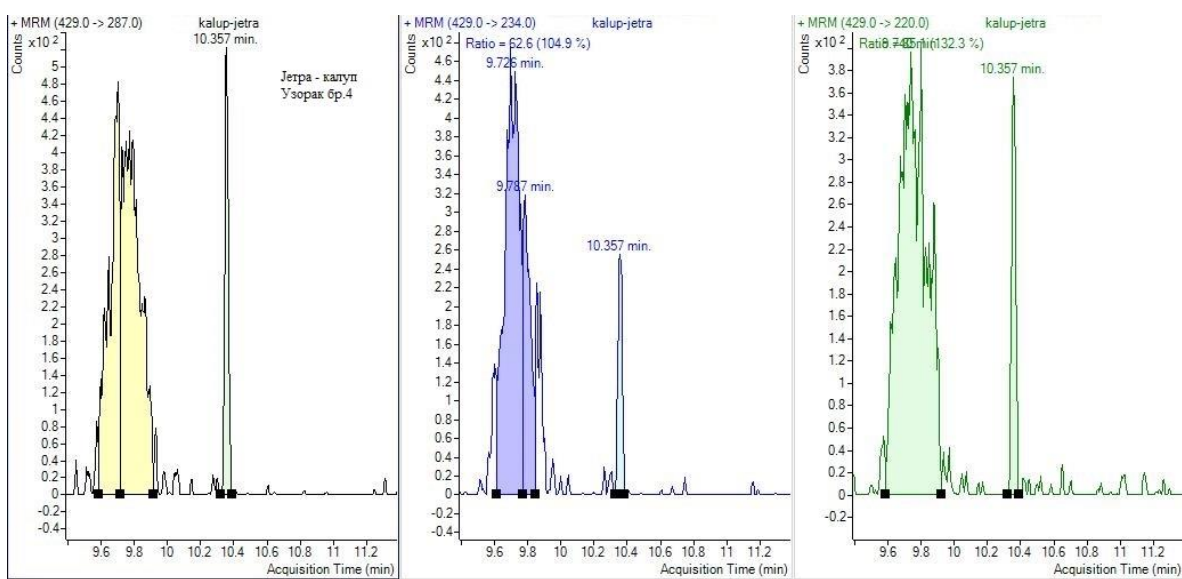
**Прилог 22:** Ткиво јетре из парафинског калупа, уситњено ручно и микротомом



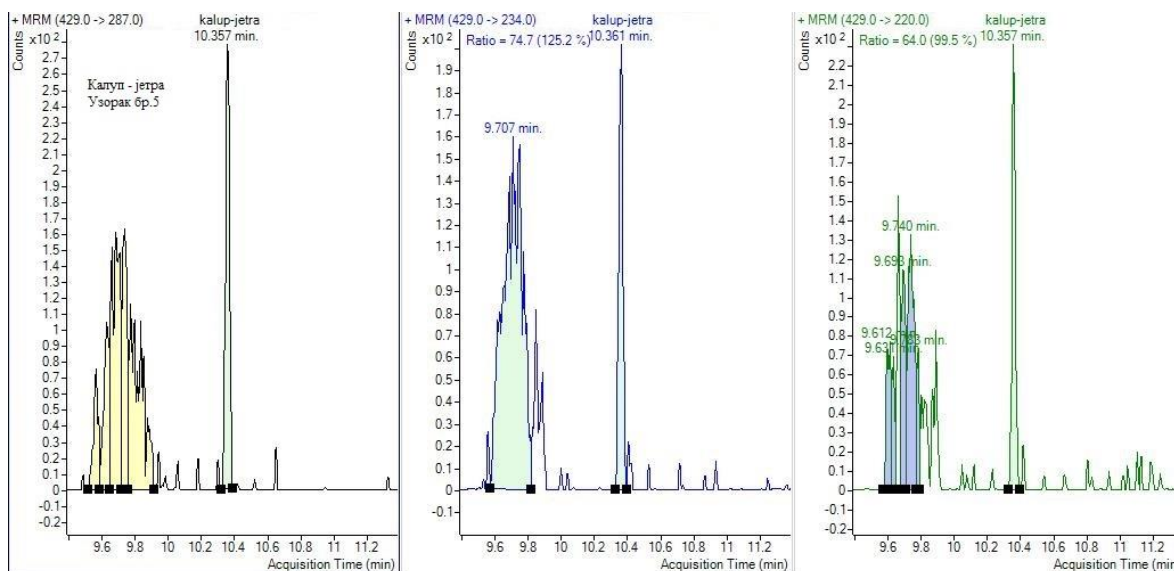
**Прилог 23:** MRM, јетра спајк, морфин, кодеин и 6-МAM са IS, 0,025 $\mu$ g/g



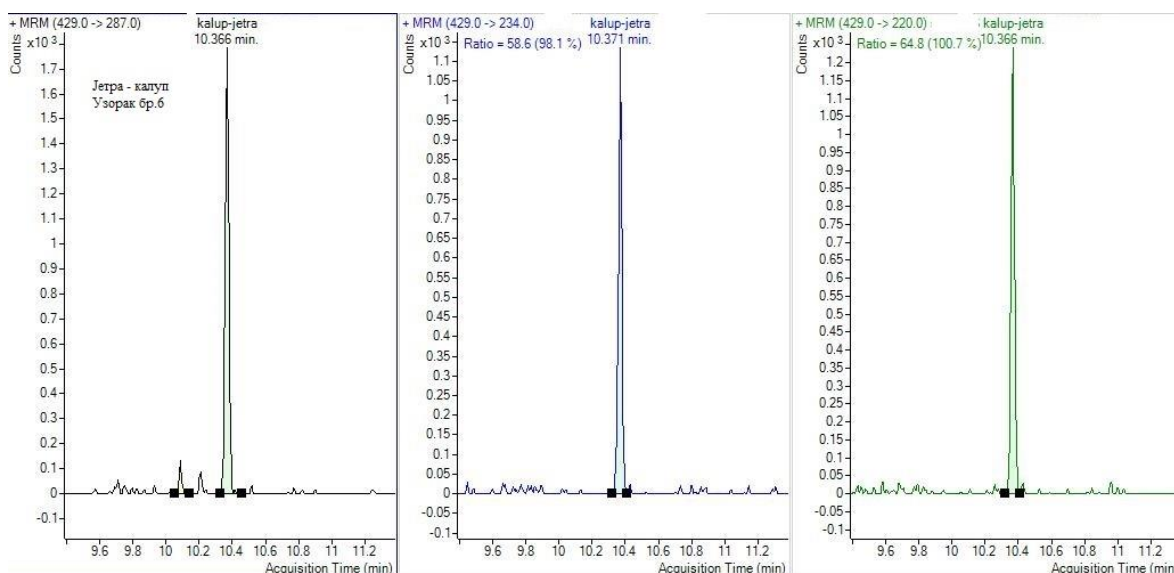
Прилог 24: MRM, узорак ткива јетре из калупа број 1, са релативним интензитетима  $m/z$  јона



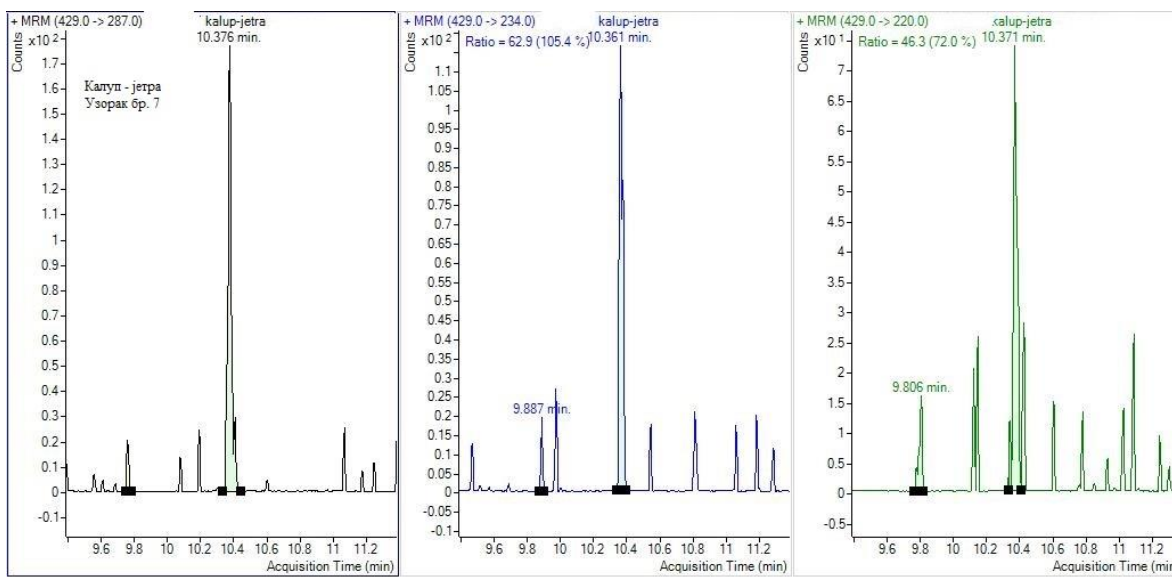
Прилог 25: MRM, узорак ткива јетре из калупа број 4, са релативним интензитетима  $m/z$  јона



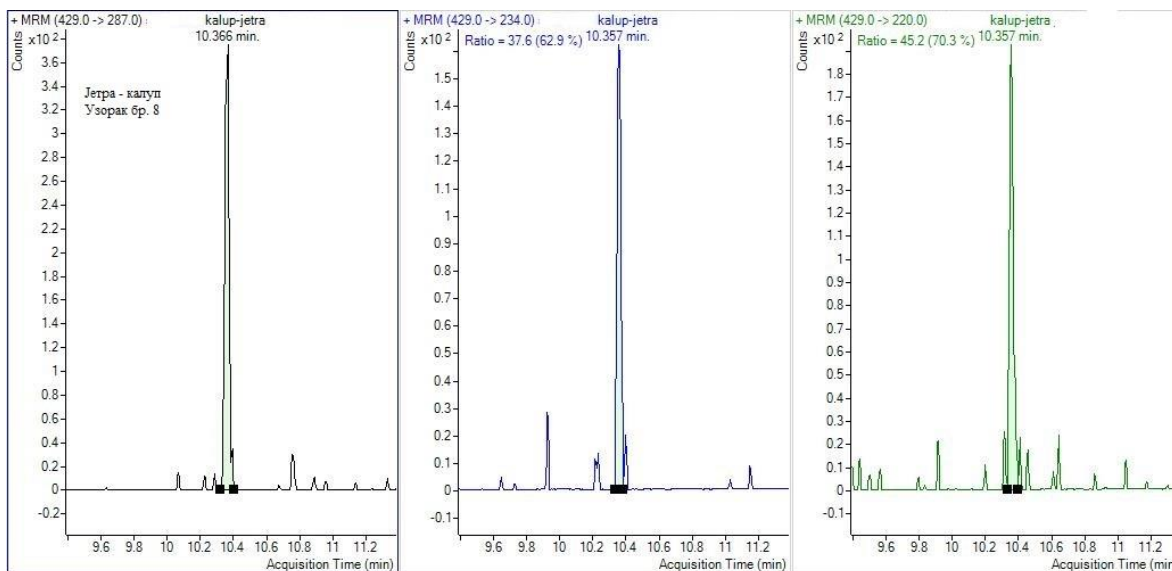
Прилог 26: MRM, узорак ткива јетре из калуца број 5, са релативним интензитетима m/z јона



Прилог 27: MRM, узорак ткива јетре из калуца број 6, са релативним интензитетима m/z јона

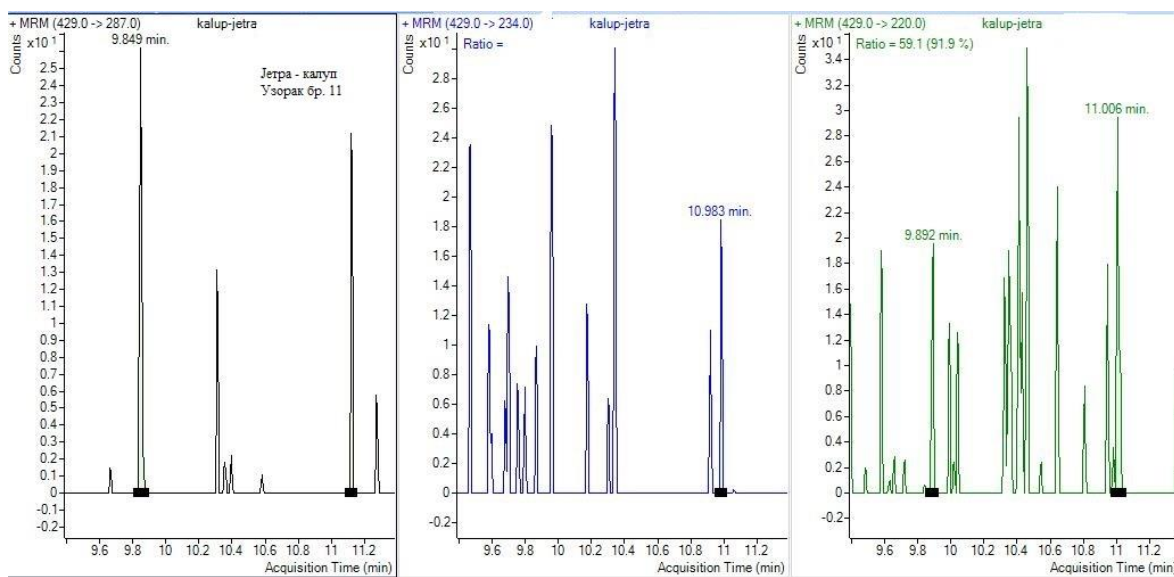


**Прилог 28:** MRM, узорак ткива јетре из калупа број 7, са релативним интензитетима  $m/z$  јона

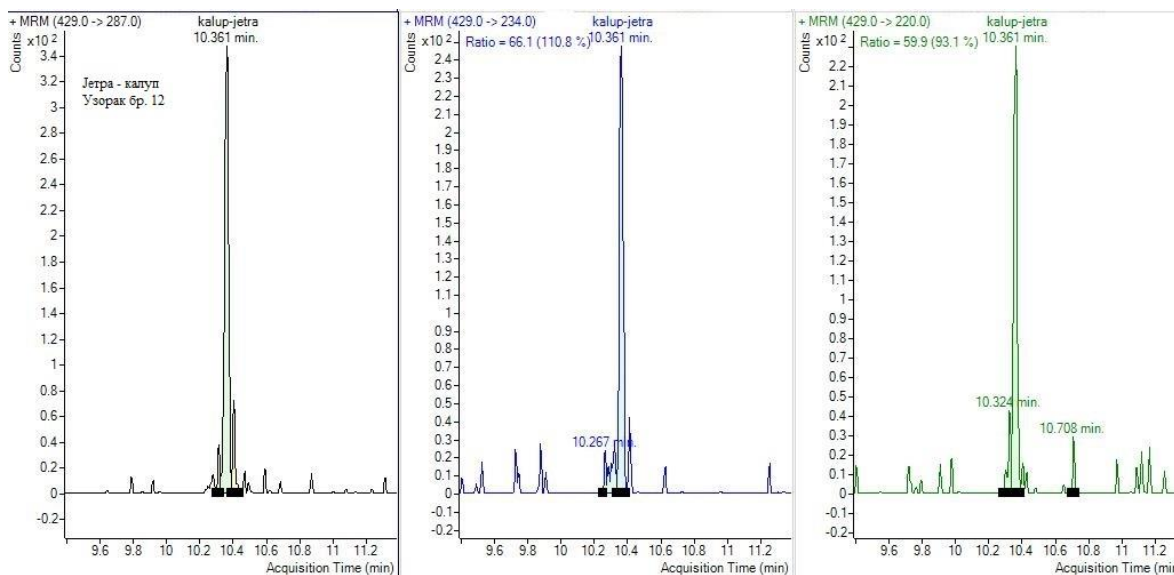


**Прилог 29:** MRM, узорак ткива јетре из калупа број 8, са релативним интензитетима  $m/z$  јона

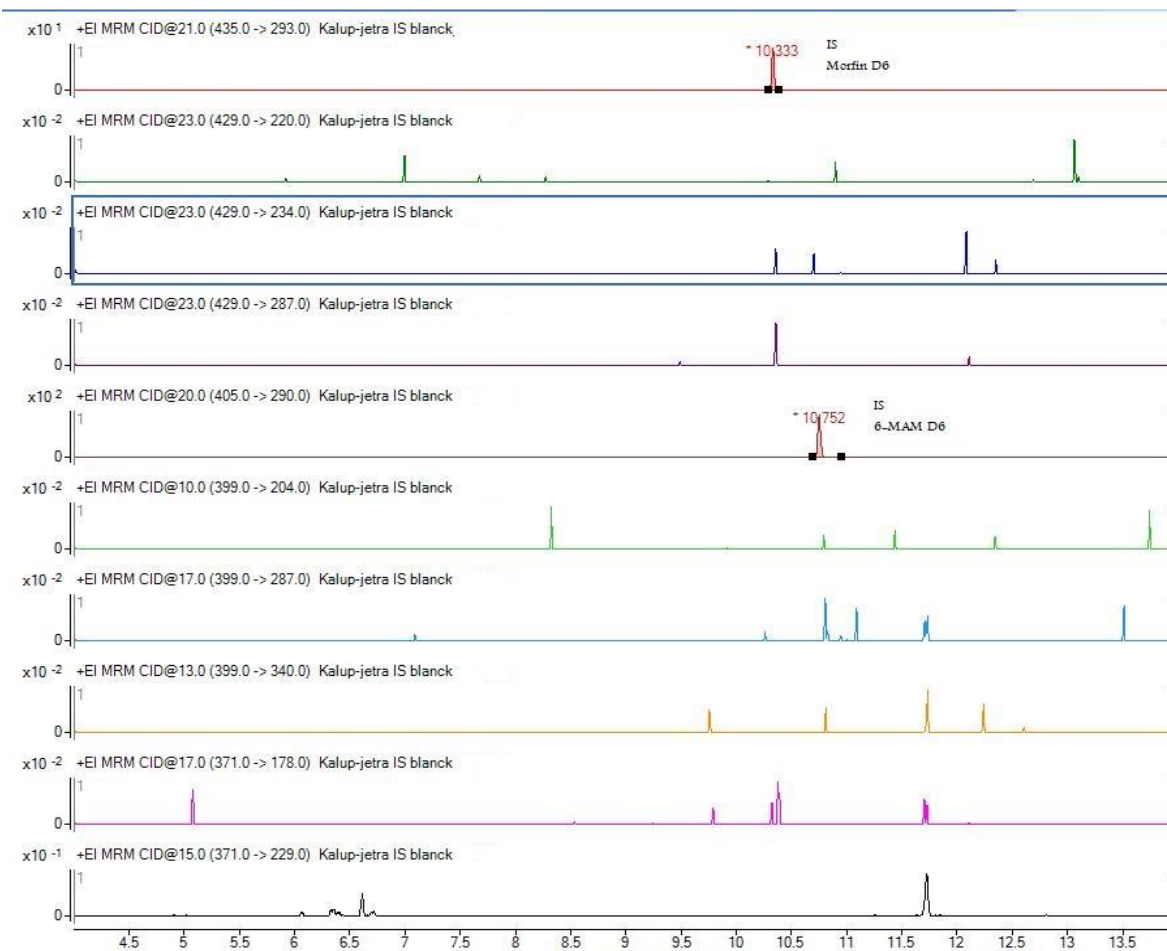




**Прилог 30:** MRM, узорак ткива јетре из калуца број 11, са релативним интензитетима  $m/z$  јона

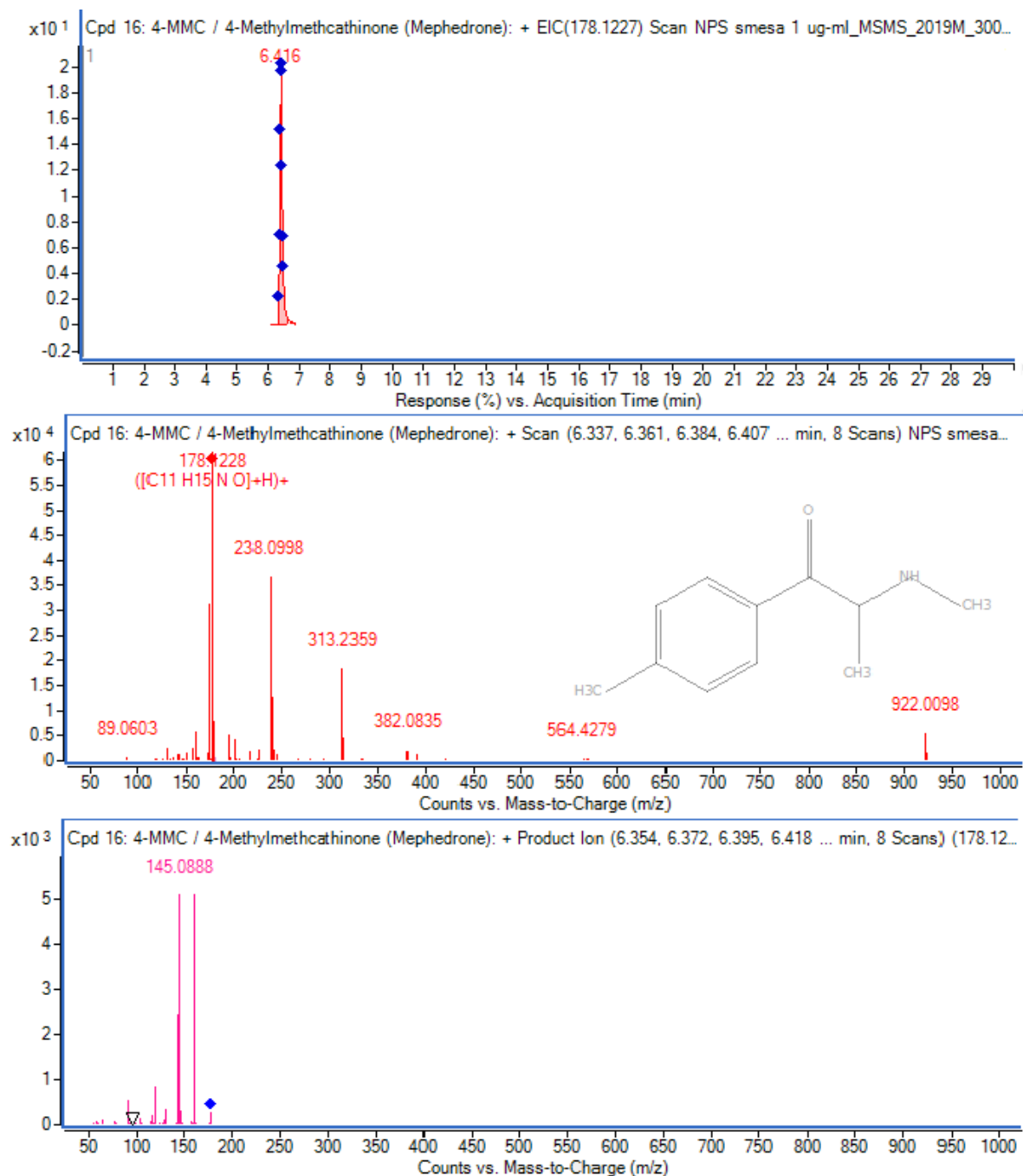


**Прилог 31:** MRM, узорак ткива јетре из калуца број 12, са релативним интензитетима  $m/z$  јона

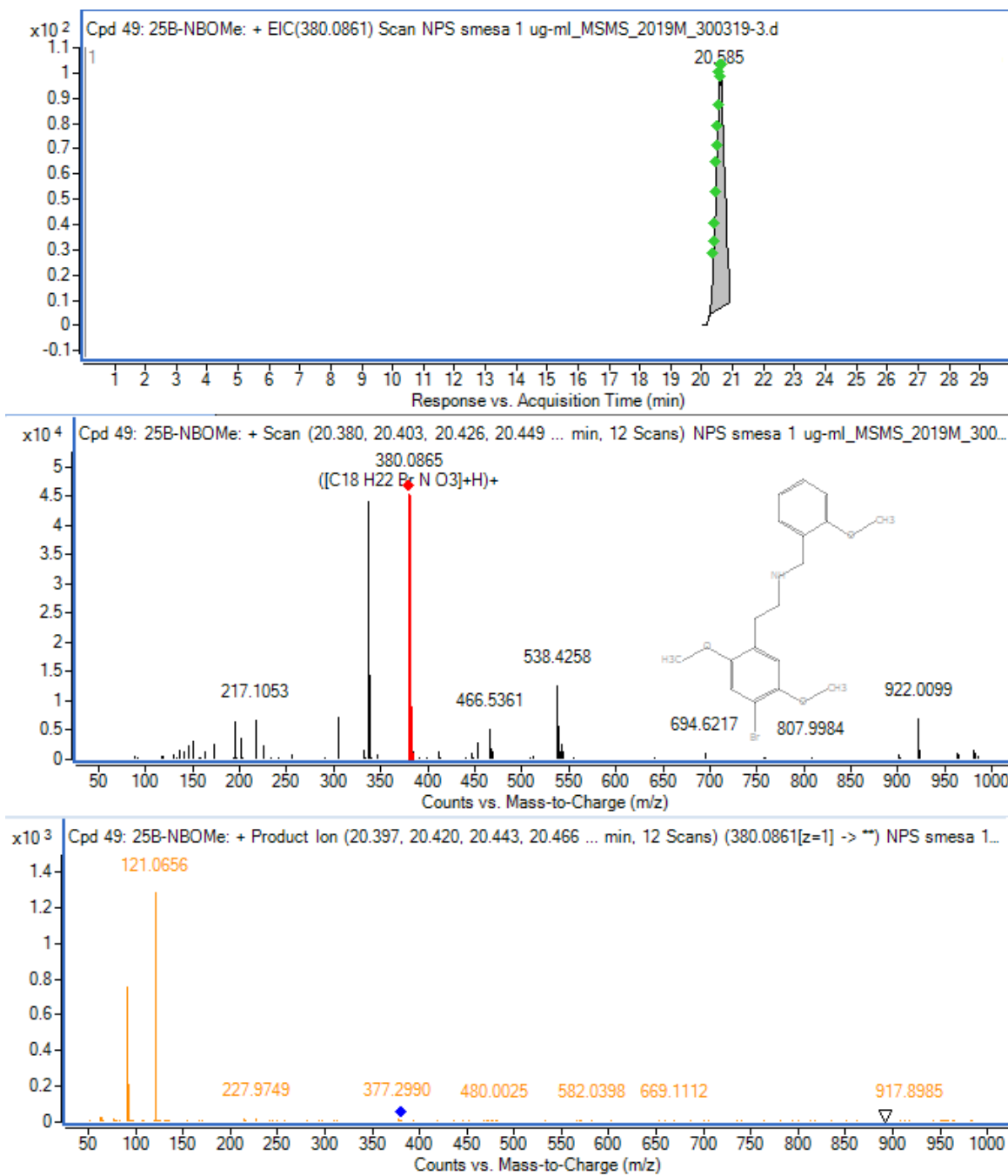


Прилог 32. MRM хроматогра бланк узорка ткива јетре из калуа са IS

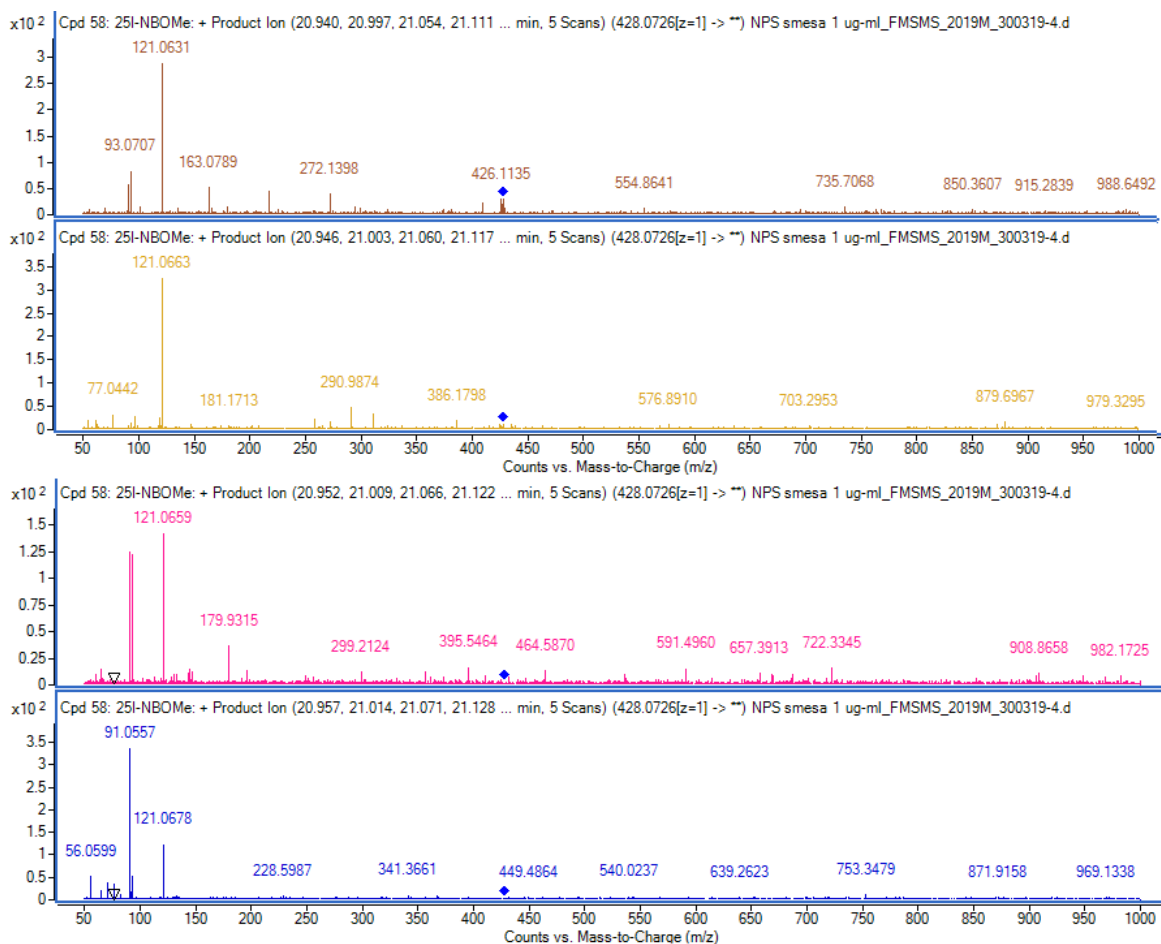




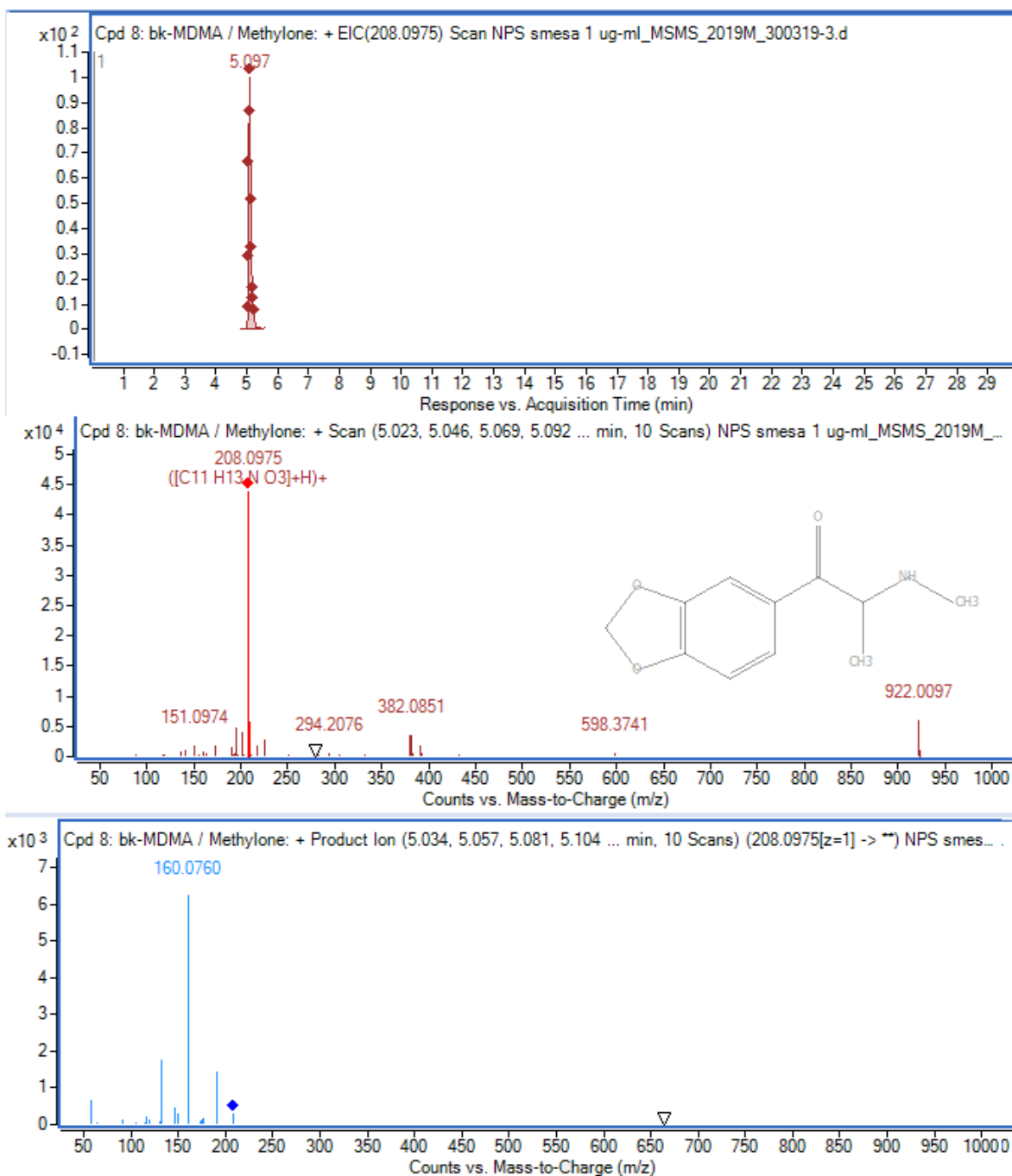
**Прилог 33:** Мефедрон из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, SE су генерисане на основу молекулске масе



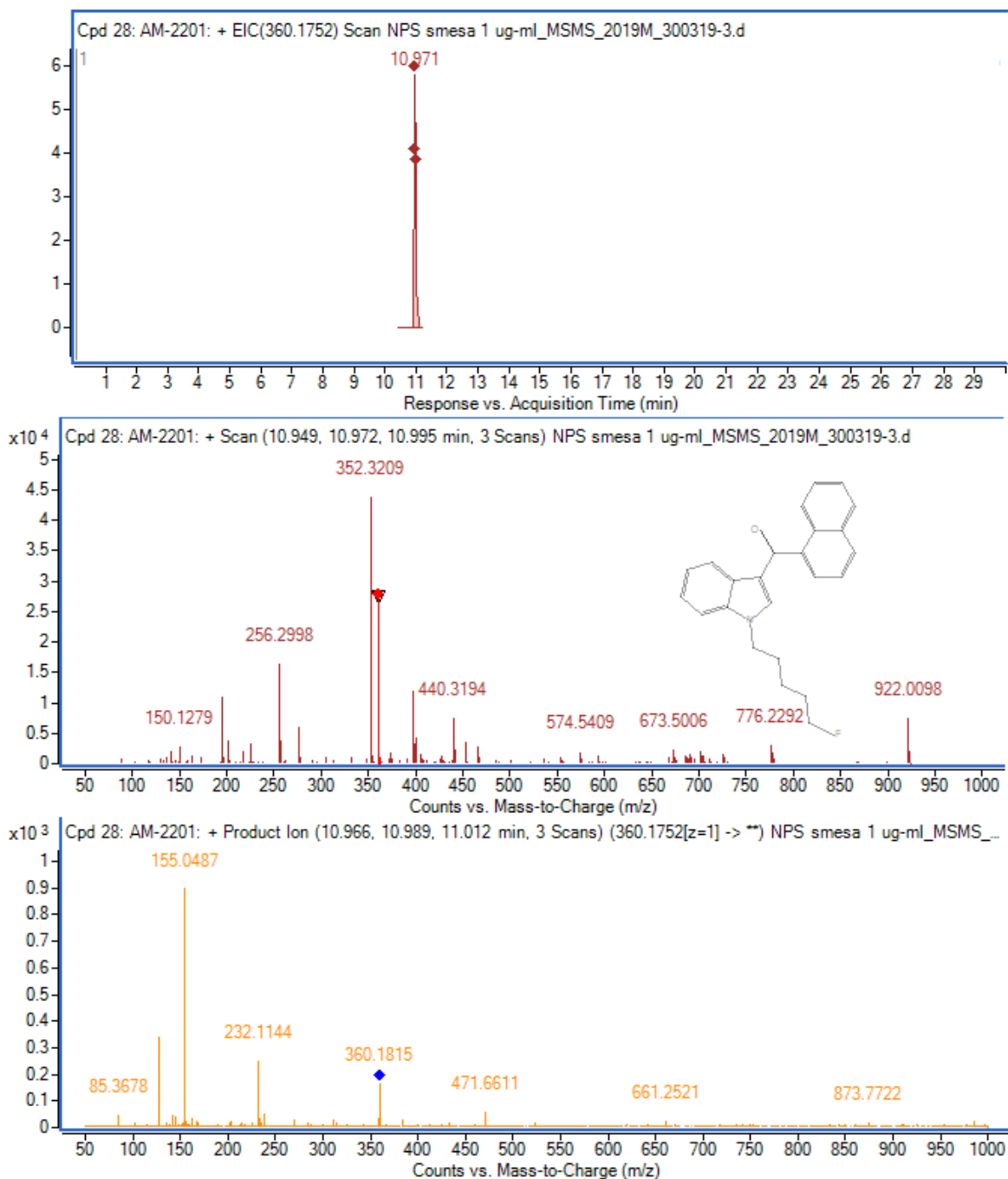
**Прилог 34:** 25B-NBOMe из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, CE су генерисане на основу молекулске масе



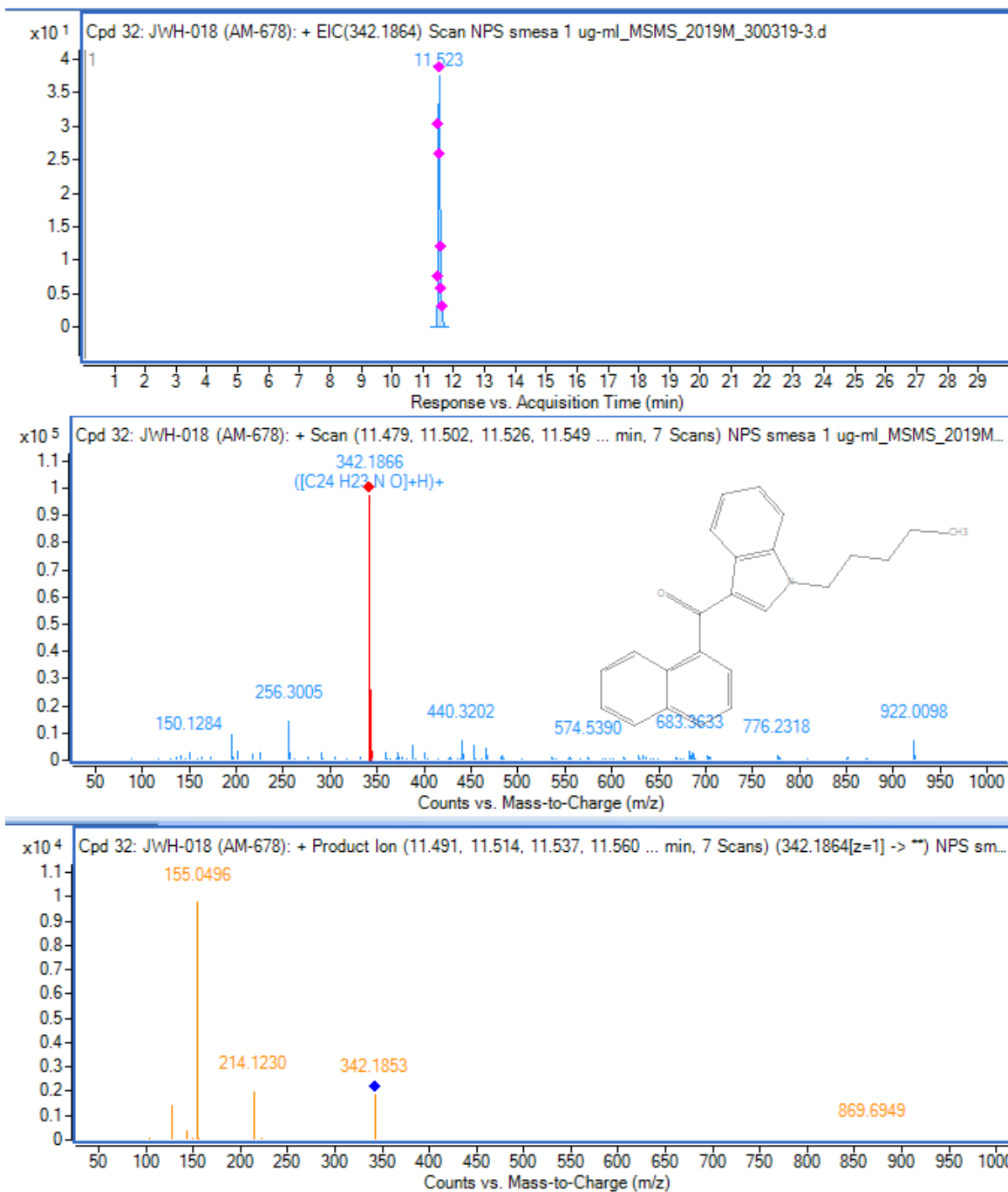
**Прилог 35:** 25I-NBOMe из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, при CE од 10 eV, 20 eV, 30 eV и 40 eV



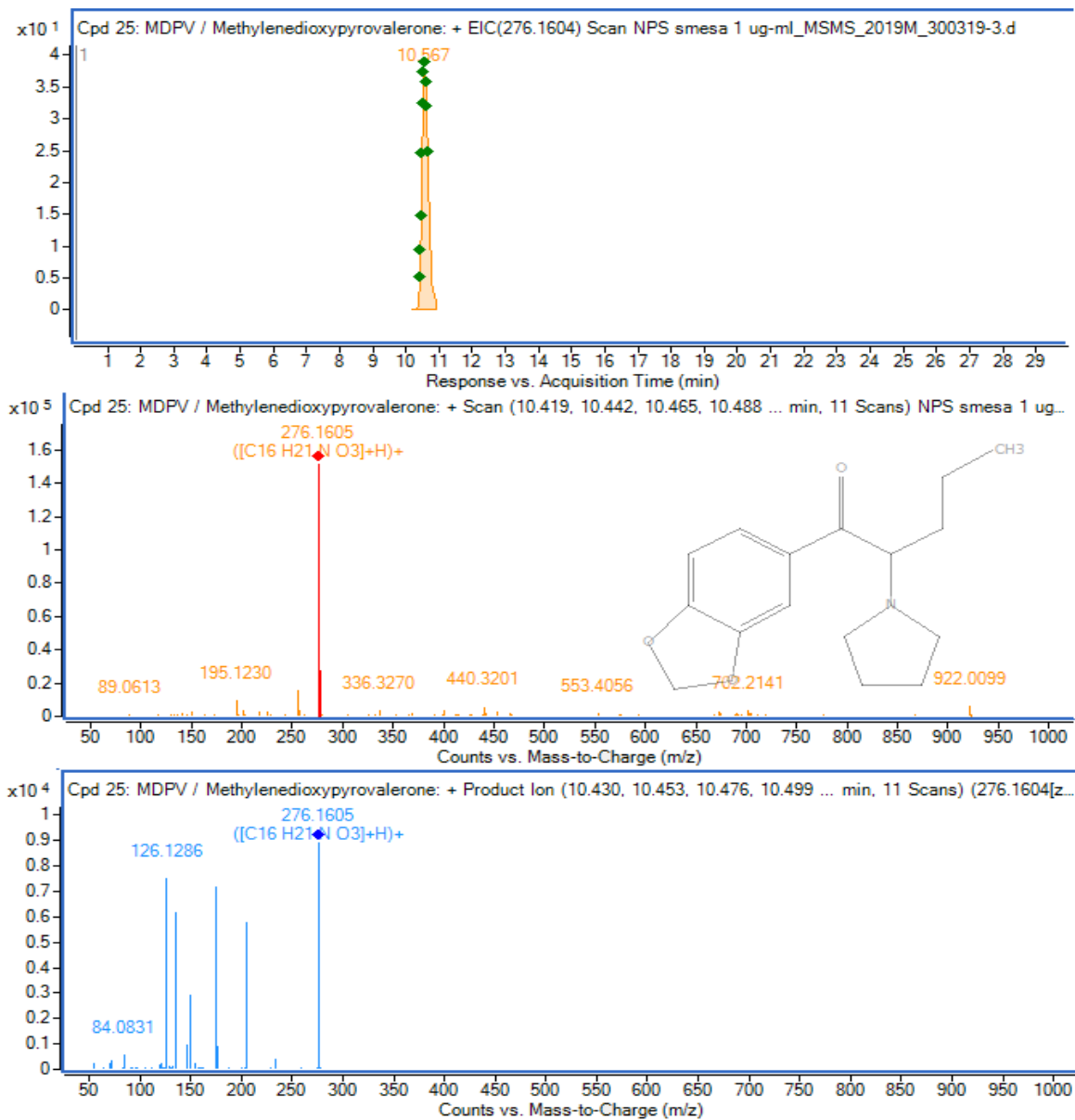
**Прилог 36:** Метилон из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, SE су генерисане на основу молекулске масе



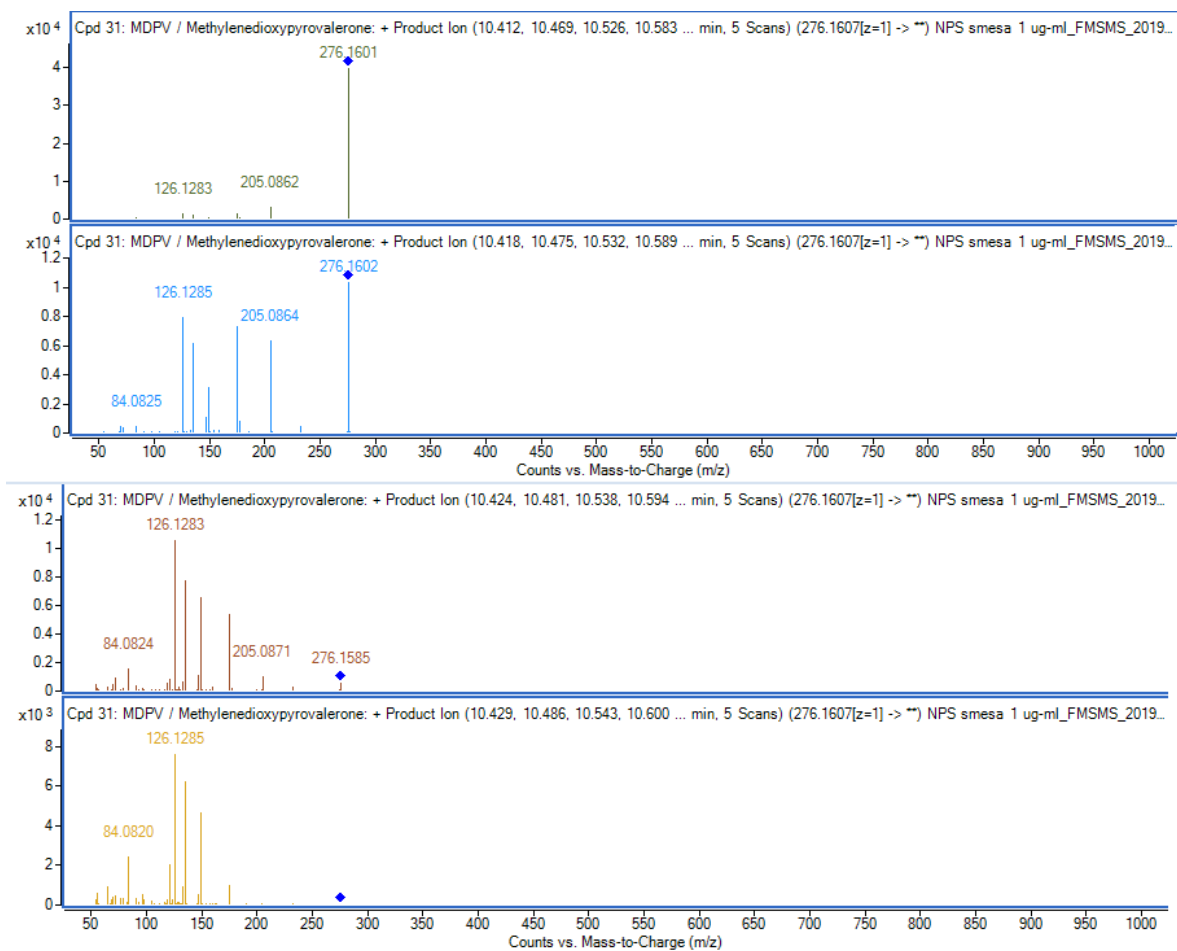
**Прилог 37:** AM-2201 из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, SE су генерисане на основу молекулске масе



**Прилог 38:** JWH-018 из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, CE су генерисане на основу молекулске масе

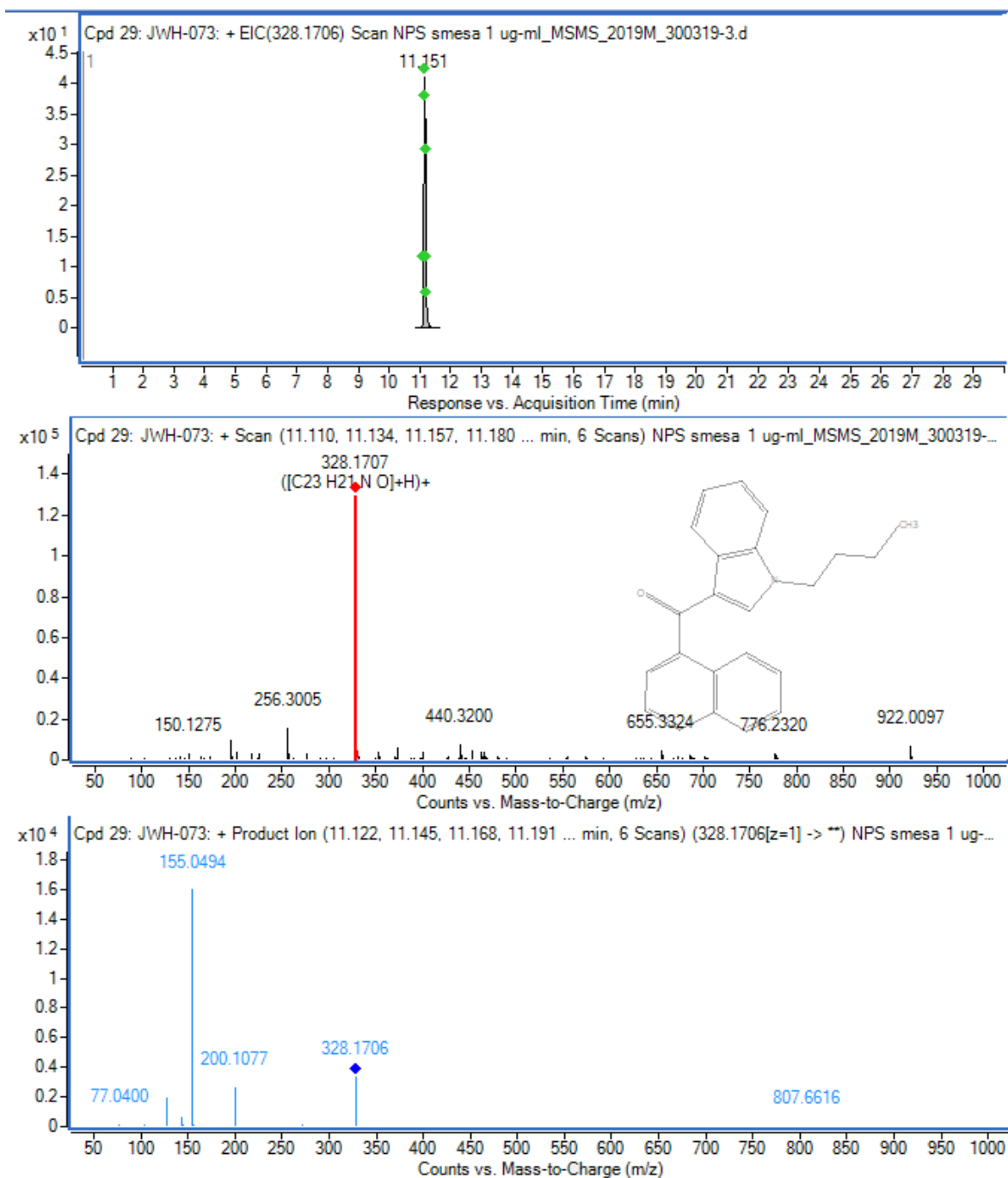


**Прилог 39:** MDPV из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, SE су генерисане на основу молекулске масе

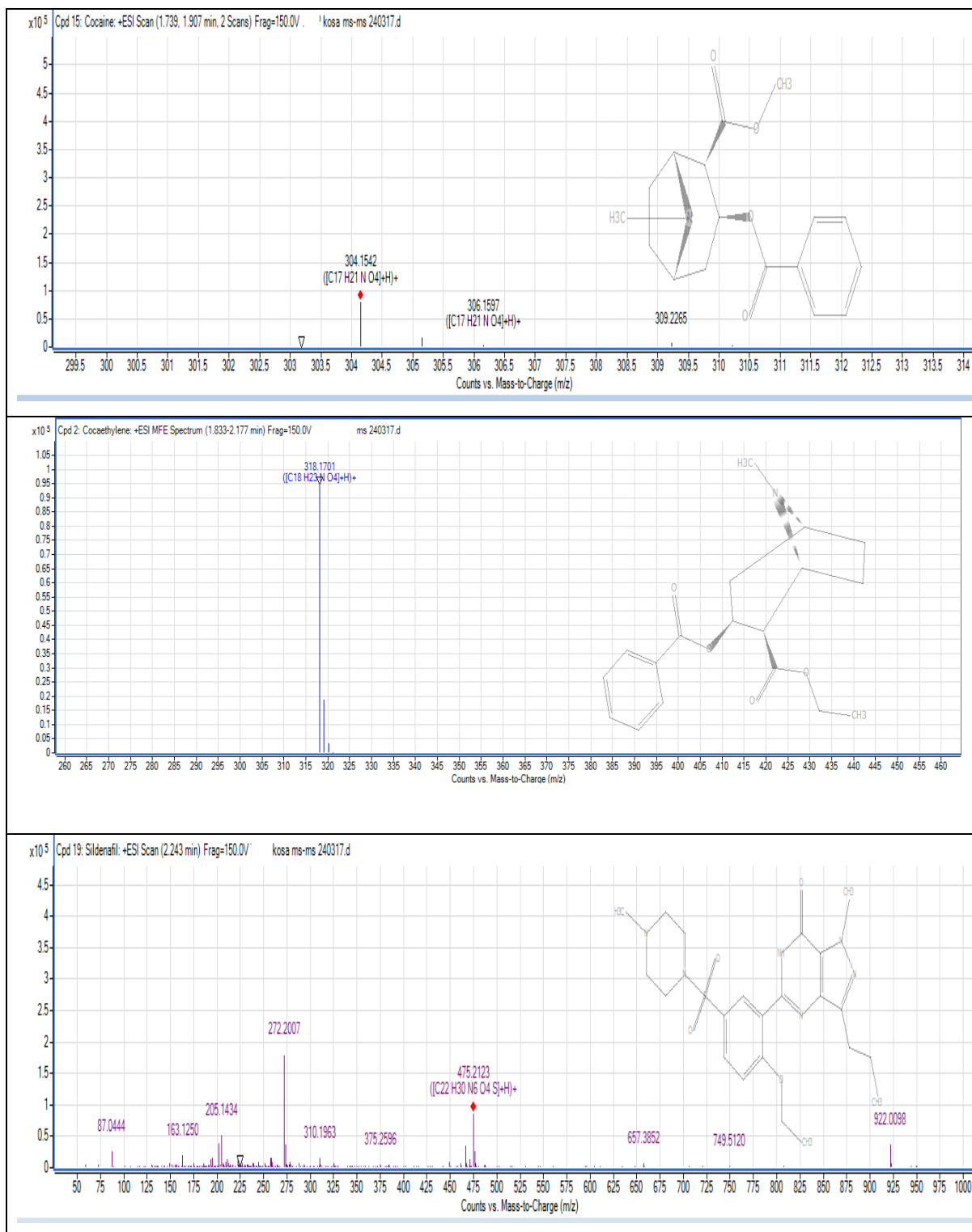


**Прилог 40:** MDPV из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, при SE од 10 eV, 20 eV, 30 eV и 40 eV





**Прилог 41:** JWH-073 из смеше стандарда одабраних NPS, снимљен у Auto MS/MS моду, SE су генерисане на основу молекулске масе



Прилог 42: Масени спектри кокаина, кокаетилена и сиденафила из узорка косе

## БИОГРАФИЈА

Вера Лукић је рођена 1967. године у Приштини. Основне студије на Одсеку за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Приштини, завршила је 1991. године.

Од 1994-2005 ради као хемичар у биохемијској лабораторији Клиничко-болничког центра у Приштини. У току 2005. године је радно ангажована у токсиколошкој лабораторији Института за судску медицину Клиничког центра Војводине у Новом Саду.

Од 2005. године ради у Институту за судску медицину Медицинског факултета у Београду као стручни сарадник, специјалиста токсиколошке хемије, а од 2013. године и као заменик одговорног лица Референтне лабораторије за идентификацију и испитивање психоактивних контролисаних супстанци при Институту за судску медицину.

Специјалистички рад са насловом "Одређивање етил-алкохола у крви и течности стакластог тела методом гасне хроматографије са *headspace* техником", одбранила је 2006. године на Катедри за токсиколошку хемију "Данило Солдатовић" Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду и стекла звање специјалисте токсиколошке хемије.

Судски вештак за област хемија - ужа специјалност судска токсикологија постаје 2011. године. Од 2014. године је ангажована као технички експерт Акредитационог тела Србије. Од 2017. године је члан Комисије за психоактивне контролисане супстанце Владе Републике Србије.

Провела је месец дана на стручном усавршавању из области судске токсикологије у токсиколошкој лабораторији Универзитета „*Tor Vergata*” у Риму.

Као стручњак из области судске токсикологије 2016. године учествује у формирању обрасца за прикупљање података о новим психоактивним супстанцама у биолошком материјалу, у организацији Канцеларије Уједињених нација за дрогу и криминал, *UNODC*.

Укључена је у систем раног информисања о новим психоактивним супстанцама према Протоколу о систему раног упозоравања у случају појаве нових психоактивних супстанци у Републици Србији. Члан је Удружења токсиколога Србије. Бави се судском, аналитичком токсикологијом, тј. идентификацијом и квантитативном анализом дрога, лекова или других супстанци, које могу бити узрок тровања, у биолошком или другом материјалу. Користи савремене аналитичке инструменте у области гасне и течне хроматографије (*GC-FID*, *GC-MS*, *GC-MS/MS*, *LC-MS/MS*, *LC-QTOF/MS*). Главна област интересовања су јој нове психоактивне супстанце.

**Изјава о ауторству**

Потписани-а

Вера Лукић

број индекса 3/2014

---

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Савремене методе масене спектрометрије у аналитици  
психоактивних супстанци у судској токсикологији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**

---

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора: Вера Лукић

Број индекса: 3/2014

Студијски програм: Хемија, модул аналитичка хемија

Наслов рада: Савремене методе масене спектрометрије у аналитици психоактивних супстанци у судској токсикологији

Ментор: др Ружица Мицић, редовни професор

Потписана: Вера Лукић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета**

**у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**

---

## Образац 7.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици и Национални репозиторијум докторских дисертација унесе моју докторску дисертацију/ писани део докторског уметничког пројекта под насловом:

Савремене методе масене спектрометрије у аналитици  
психоактивних супстанци у судској токсикологији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију/ писани део уметничког пројекта са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију/ писани део уметничког пројекта похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици и Национални репозиторијум докторских дисертација могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Косовској Митровици, \_\_\_\_\_

## Потпис докторанда

---

1. Ауторство – Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.  
Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.