

Kromatografska analiza psihoaktivnih supstanci

Prevarić, Viktorija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:083927>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Viktorija Prevarić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Viktorija Prevarić

KROMATOGRAFSKA ANALIZA PSIHOAKTIVNIH SUPSTANCI

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

doc. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Ema Horak, asistent

Zagreb, rujan 2017.

*Ovaj je rad izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za analitičku kemiju, akademske godine 2016./2017.*

Ponajprije, zahvaljujem se svojem mentoru prof. dr. sc. Tomislavu Bolanči, na vodstvu prilikom izrade ovog završnog rada.

Također zahvaljujem se i doc. dr. sc. Šimi Ukiću na nesebičnoj pomoći i savjetima pruženima tijekom izrade rada.

Naposljetku, zahvaljujem se obitelji i svima koji su mi bili podrška kroz dosadašnje godine studija.

Sažetak

Psihoaktivne tvari su spojevi koji konzumacijom utječu na djelovanje centralnog živčanog sustava, ilegalne su, odnosno njihovo posjedovanje i konzumacija su zakonom zabranjeni (uz iznimke). Svrha provođenja analiza nad takvim supstancama je dokazivanje odnosno opovrgavanje postojanja psihoaktivnih komponenti u uzorcima zbog provođenja zakona, ili zbog dokazivanja mogućih toksikoloških trovanja organizma.

Kromatografske tehnike su vrlo široko primjenjivane tehnike analize tvari. Omogućavaju separaciju tvari na temelju različitih brzina kretanja komponenti kroz sustav pokretne i nepokretne faze. Različite kromatografske tehnike imaju različita obilježja. U kombinaciji s raznim detektorima, kromatografijom se omogućava kvalitativna i kvantitativna analiza iznimno širokog spektra uzoraka.

Upotreba kromatografskih metoda u analizi psihoaktivnih komponenti često se primjenjuje zbog jednostavnosti, brzine i relativno niske cijene te pokazuje izvrsne rezultate. Najveći uspjeh ostvaruje se zadovoljavajućom analizom uzoraka nepoznatog sastava koji se najčešće i pojavljuju prilikom analize droga.

U ovom radu će biti dan pregled najčešćih droga (psihoaktivnih tvari) i kromatografskih tehnika upotrebljivanih za njihovu analizu.

Ključne riječi: psihoaktivne tvari, droga, kromatografija

Summary

Psychoactive substances are compounds which affect function of central nervous system after consumption. They are illegal and their possession and consumption are prohibited by law (with minor exceptions). The analyses of such substances are performed in order to prove or suppress the existence of psychoactive components in samples or to prove possible toxicological poisoning of the organism.

Chromatographic techniques are very widely applied analytical techniques. They allow separation of matter based on different components-movement through the stationary phase. Different types of chromatography have different characteristics. In combination with various detectors, the chromatography allows qualitative and quantitative description of the sample, making chromatography suitable for analysis of a wide range of analytical samples.

The use of chromatographic methods in the analysis of psychoactive components is often applied due to simplicity, speed and relatively low analysis-cost; yet at the same time it provides excellent results. Also, chromatography can analyse samples of unknown composition that are most commonly found in drug analysis.

This paper provides a review of the most common drugs (psychoactive substances) and chromatographic techniques used for their analysis.

Keywords: psychoactive substances, drugs, chromatography

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Psihoaktivne tvari.....	2
2.1 MDMA	2
2.2 Kokain	3
2.3 Heroin	4
2.4 Kanabis i sintetski kanabinoidi.....	5
2.5 Benzodiazepinski lijekovi.....	6
3. Kromatografija	8
3.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	11
3.2 Tankoslojna kromatografija.....	14
3.3 Plinska kromatografija.....	16
3.4 Detektori	18
3.4.1 Elektrokemijski detektor	18
3.4.2 Detektor s nizom dioda	19
3.4.3 Maseni spektrometar	19
3.4.4 Plameno-ionizacijski detektor.....	21
4. Praktična primjena u detekciji droga	22
4.1 HPLC analiza THC-a.....	22
4.2 HPLC analiza ecstasy tableta	23
4.3 GC analiza heroina	24
4.4 GC analiza benzodiazepina	25
4.5 TLC analiza kokaina.....	26
5. Zaključak.....	28
6. Literatura.....	29
Životopis.....	32

1. Uvod

Drogama se nazivaju tvari čija se stimulativna djelovanja zlorabljavaju te nerijetko stvaraju teške ovisnosti. Sukladno tome, njihovo posjedovanje i korištenje je zakonom zabranjeno¹, osim u iznimnim situacijama. Mnoge droge su nekada ne samo bile na slobodnom tržištu nego i promovirane kao izrazito korisne od strane prehrambene i farmaceutske industrije. Negativan trend se razvio zbog zlorabe farmaceutskih proizvoda kao što su npr. heroin, kokain ili amfetamini što je vodilo povećanju zakonskih ograničenja i zabrana, ali i postupnom usponu ilegalne industrije.

Većina droga spada u samo nekoliko farmakoloških skupina: stimulansi centralnog živčanog sustava (psihoaktivne tvari), narkotici, analgetici, halucinogene tvari i hipnotici. Najviše ih je prirodnog (biljnog) ili polusintetskog podrijetla (npr. kanabis, kokain, heroin), međutim najveće probleme uzrokuju danas „moderne“, potpuno sintetske droge (npr. *ecstasy*, razni kanabinoidi).²

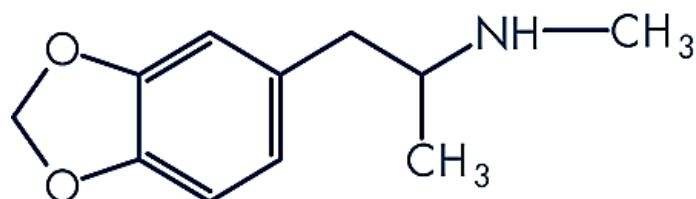
Psihoaktivne tvari se zbog toga i analiziraju, kako bi se dokazalo njihovo postojanje u uzorcima te poduzele potrebne zakonske mjere. Uzorci za analizu su najčešće u izvornom obliku u kojem se i zaplijene od osobe (tablete, prašci, biljke) ili su biološkog podrijetla (uzorci urina, krvi, kose). Uzorak je potrebno kvalitativno i kvantitativno odrediti. Vrsta analize ovisi o podrijetlu samog uzorka, no najčešće se provode kromatografske analize.^{3,4}

2. Psihoaktivne tvari

Psihoaktivne tvari kemijski su spojevi koji u biološkom organizmu djeluju na centralni živčani sustav i mijenjaju moždane funkcije što rezultira privremenim promjenama percepcije, raspoloženja, svijesti i ponašanja.⁵ Mnoge od ovih tvari uzrokuju tešku psihičku i fizičku ovisnost, te nerijetko rezultiraju zlouporabom. U ovom odjeljku obradit će se neke od psihoaktivnih tvari koje se najčešće susreću u praksi.

2.1 MDMA

MDMA je sintetski spoj, droga poznata kao glavna aktivna komponenta *ecstasy* tableta. MDMA je kratica za 3,4-metilendioksi-metamfetamin ($C_{11}H_{15}NO_2$, $M = 193,2$ g/mol)⁶, derivat je amfetamina i član grupe supstituiranih prstenastih feniletilamina. Rijetko se nalazi u čistom obliku (prozirno ulje netopivo u vodi), najčešće je u obliku klorovodičnih i fosfatnih soli (bijeli prah ili kristal topiv u vodi). Analizom na masenom spektrometru pokazuje ograničenu strukturu s glavnim pikom kod $m/z = 58$ i sporednim pikovima kod $m/z = 135$ i 77 . Primjenom plinske kromatografije, granica za detekciju MDMA u krvnoj plazmi je 1,6 ppb, a u urinu 47 ppb. Uz aktivnu komponentu MDMA, *ecstasy* tablete sadrže i razna punila, kao što su npr. laktoza, kofein i druga veziva u manjoj količini.⁷



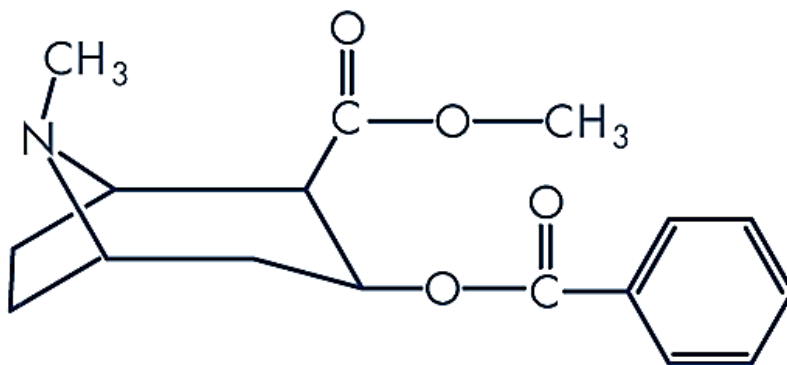
Slika 1. Strukturna formula MDMA

Iako je prvotna namjena MDMA bila medicinska, terapijska upotreba je iznimno ograničena i vrlo rijetka.^{8,9} Ilegalna MDMA se najčešće nalazi u obliku tableta koje sadrže karakterističan utisak (logo) ili u obliku praha te se konzumira oralno. Utječe na centralni živčani sustav kao stimulans te blagi halucinogen, stvara osjećaj viška energije, euforije i suosjećanja prema drugima te iskrivljuje percepciju osjetila i vremena. Negativni učinci konzumacije su tjelesna iscrpljenost, usporena koordinacija pokreta, dekoncentracija,

glavobolja, poremećaj spavanja, mučnina praćena povraćanjem, mamurluk koji može potrajati danima i koji je obično praćen jakom depresijom.¹⁰

2.2 Kokain

Kokain je prirodni spoj koji se proizvodi od lišća biljke koke porijeklom iz Južne Amerike. Nalazi se u obliku soli klorovodične kiseline te kao takav ima ograničenu medicinsku upotrebu kao anestetik. *Crack* je oblik kokaina koji se obrađuje kako bi se dobio kristal koji se može konzumirati pušenjem. Kristal se zagrijava pri čemu proizvodi pare koje se apsorbiraju u plućima te tako dospijevaju u krvotok. Kokain u obliku praha se ili inhalira kroz nos (ušmrkava), gdje se apsorbira kroz tkivo nosa, ili se otapa u vodi i ubrizgava u krvotok. Konzumiranjem izaziva osjećaj kratkotrajne euforije, energije i pričljivosti uz dodatne potencijalno opasne fizičke efekte poput ubrzanih otkucaja srca i pojačanog krvnog pritiska.¹¹ Različiti načini konzumiranja kokaina mogu izazvati različite nuspojave. Jedna od posljedica dugotrajnog i redovitog konzumiranja većih količina kokaina je i karakteristična paranoidna psihoza kod gotovo svih korisnika.¹⁰

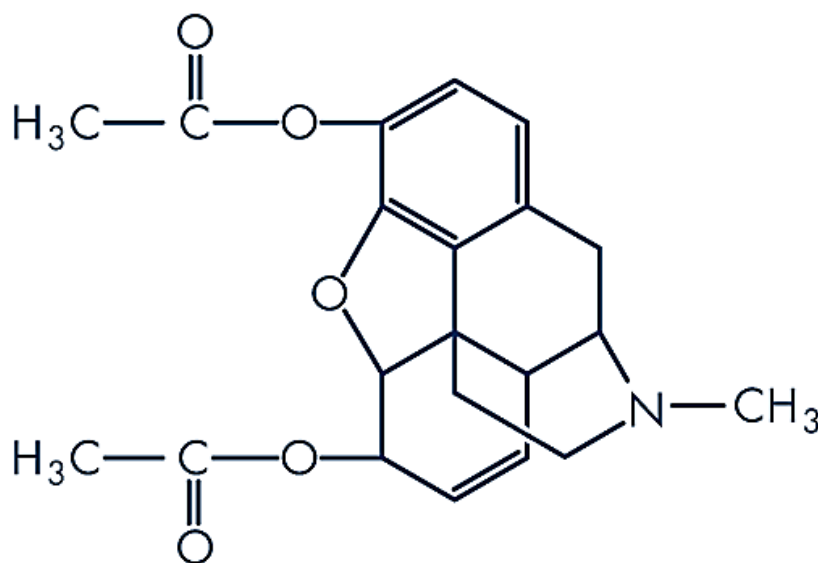


Slika 2. Strukturna formula kokaina.

Kokain je po svojem kemijskom sastavu metil ester benzoilekgonina ($C_{17}H_{21}NO_4$, $M = 303,4$ g/mol).⁶ Klorovodična sol kokaina je prašak bijele boje, a kada se pojavljuje kao *crack*, nalazi se u obliku prozirnih kamenčića, tj. kristala. Analizom na masenom spektrometru glavni pikovi su kod $m/z = 82, 182, 83, 105, 303, 77, 94$ i 96 . Primjenom plinske kromatografije, granica za detekciju kokaina u krvi je 20 ppb. Najčešće primjese su fenacetin, benzokain, kofein, paracetamol i šećer u prahu.⁷

2.3 Heroin

Heroin je sirovi pripravak morfina. Prirodni je spoj koji se nalazi u opijumu - suhim sjemenkama određenih vrsta biljke maka. Morfin (morfij) je narkotik koji se koristi u medicini za smanjenje osjeta boli. Heroin se može ubrizgati, inhalirati ušmrkavanjem ili se može pušiti. Sva tri načina dovode drogu veoma brzo do mozga što stvara velik zdravstveni rizik, ali i veliku vjerojatnost da osoba postane ovisnik. Kako dolazi do mozga, heroin se ponovno pretvara u morfin koji se veže na stanice poznate kao opioidni receptori koji kontroliraju automatske procese nužne za život, kao što je krvni pritisak, uzbuđenje i disanje.¹⁰ Izaziva analgeziju, osjećaj pospanosti, euforiju i osjećaj „izvantjelesnog“. Neki od negativnih učinaka su: poteškoće s disanjem, slabost i mučnina, usporenost probavnog sustava i pothlađenost.⁷ Heroin je droga koja izaziva tešku ovisnost te se povezuje s najvećim brojem slučajnih predoziranja i otrovanja.¹²

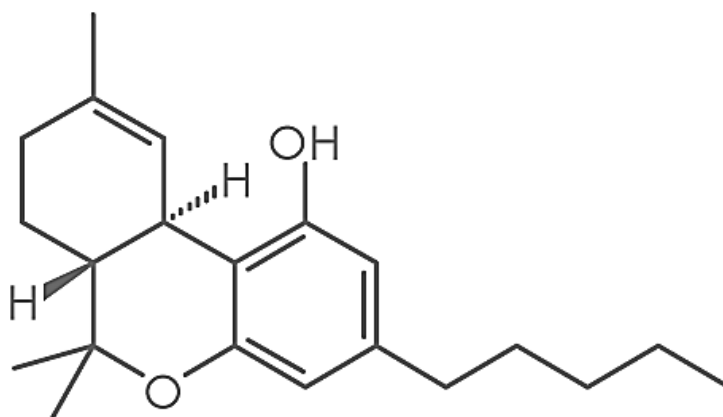


Slika 3. Strukturna formula heroína

Heroin je derivat morfina, diacilmorfin ($C_{21}H_{23}NO_5$, $M = 369,4$ g/mol).⁶ Najčešće se pojavljuje u obliku čiste baze koja je prah smeđe boje netopiv u vodi, ali topiv u organskim otapalima. Može se pronaći i u obliku soli klorovodične kiseline koja je prah bijele boje topiv u vodi, ali netopiv u organskim otapalima. Analizom na masenom spektrometru pokazuje glavne pikove kod $m/z = 327, 43, 369, 268, 310, 42, 215$ i 204 . Primjenom plinske kromatografije, granica za detekciju heroína u krvi je 100 ppb. Najčešće primjese su kofein, paracetamol i benzodiazepin diazepam.⁷

2.4 Kanabis i sintetski kanabinoidi

Kanabis (marihuana) je prirodni proizvod, biljka (konoplja) koja je široko rasprostranjena te raste u prirodnim i tropskim područjima. Biljni kanabis se javlja u različitim oblicima kao suho lišće, cvijet, stabljika i sjemenka iz biljke konoplje. Kanabis smola (hašiš) je koncentrirana kruta tvar od smolastih dijelova biljke, a kanabisovo ulje je gust, viskoznan ekstrakt otopine kanabisa.⁷ Gotovo uvijek se konzumira pušenjem, često pomiješan s duhanom u ručno motanim cigaretama zvanim džoint ili u lulama (bongovima).



Slika 4. Strukturna formula THC-a

Glavna psihoaktivna komponenta marihuane je dronabinol, poznat pod imenom tetrahidrokanabinol: THC ($C_{21}H_{30}O_2$, $M = 314,4$ g/mol).⁶ Biljka marihuane je dvodomna, tj. razlikujemo muške i ženske jedinke. THC je u najvećoj mjeri koncentriran u cvjetovima ženskih biljaka, dok ga u listovima i muškim biljkama ima vrlo malo, a stabljike i sjemenke ga gotovo uopće ne sadrže. THC utječe na specifične molekule u moždanim stanicama (kanabinoidni receptori) koje utječu na osjećaj ugone, pamćenje, razmišljanje, koncentraciju, percepciju osjetila i vremena i koordinirane pokrete. Pojačava budnost živčanog sustava te uzrokuje osjećaj uzbuđenja (*high*). Postoje tvrdnje o različitim terapijskim učincima^{13,14,15,16}, a Dronabinol (Marinol) je licencirani lijek u nekim zemljama za liječenje mučnine uzrokovane kemoterapijom.^{17,18}

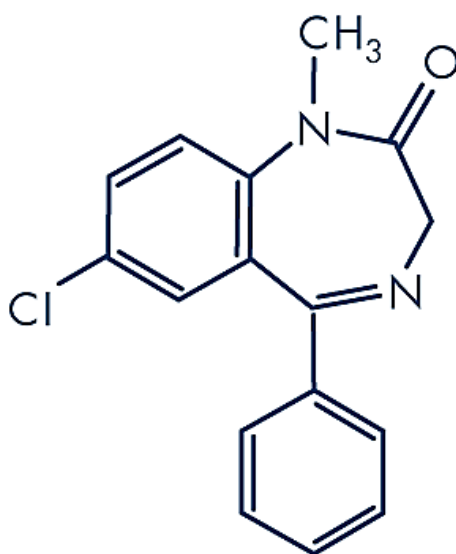
Iako su i sami listovi kanabisa vrlo karakterističnog izgleda, kanabis i hašiš se mogu lako identificirati mikroskopskim promatranjem gdje se uočavaju dlačice kristalnog sjaja te glandularni trihomi, dlačice s kuglicom na vrhu koje daju i karakterističan miris. Analizom na

masenom spektrometru THC pokazuje glavne pikove kod $m/z = 299, 231, 314, 43, 41, 295, 55$ i 271. Primjenom plinske kromatografije, granica detekcije THC-a u krvi je 0,3 ppb.⁷

Sintetički kanabinoidi su funkcionalno slični THC-u, međutim mnogi od njih strukturno nisu uopće povezani s klasičnim kanabinoidnim spojevima.¹⁹ Najčešće se pripravljena otopina kanabinoida dodaje mješavini trava (raspršivanjem) te se konzumira pušenjem. Djelovanje na organizam je isto kao i kod konzumiranja marihuane, no neke od smjesa djeluju mnogo jače.⁷ O njihovoj toksikologiji i farmakologiji se vrlo malo zna zbog toga što je sastav sintetskih mješavina vrlo različit te često nepoznat. Uglavnom se detektiraju plinskom kromatografijom, ali identifikacija i kvantifikacija ovise o dostupnosti čistih referentnih uzoraka. Još uvijek nije razvijena metoda kojom bi se detektirala većina sintetskih kanabinoida.²⁰

2.5 Benzodiazepinski lijekovi

Benzodiazepini su skupina lijekova koji se koriste u medicini za liječenje depresije, anksioznosti, nesаницe te paničnih poremećaja. Sintetički su spojevi koji se obično nalaze u obliku tableta, kapsula ili otopina za injekciju. Na centralni živčani sustav djeluju sedativno, uzrokujući smirenje, opuštanje mišića i pospanost.⁷ Glavna razlika između benzodiazepina i sličnih lijekova za neurotske poremećaje (npr. barbiturata) je ta da anksiolitički učinak počinje odmah.



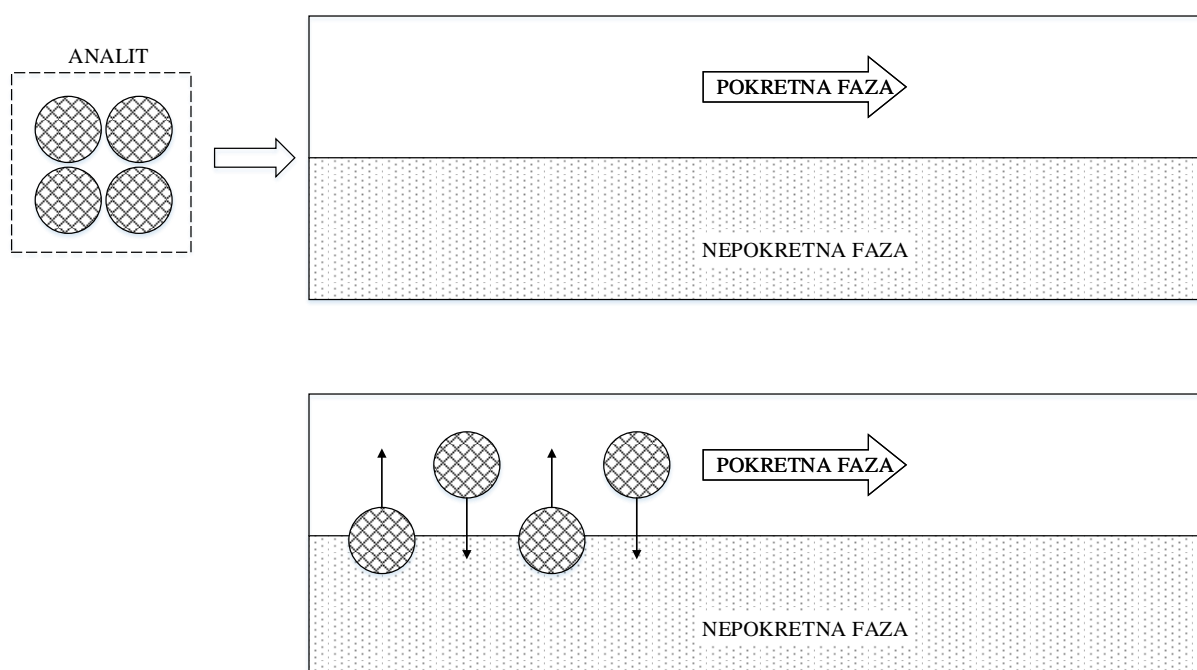
Slika 5. Strukturna formula diazepama

Iako smanjuju osjećaj uznemirenosti (anksioznosti), negativni učinci konzumacije benzodiazepinskih lijekova su dnevna sedacija, pospanost, oštećenje motorne koordinacije, kognitivni učinci, a nakon dugotrajne primjene (više od 10 dana) i tolerancija na učinke benzodiazepina te ovisnost. Benzodiazepini se često zloupotrebljavaju sami ili u kombinaciji s drugim (psihoaktivnim) tvarima. Razlog tome je i njihova relativno niska cijena kod dilera droga.²¹

Diazepam je derivat benzodiazepina koji se najčešće koristi i susreće u praksi ($C_{16}H_{13}ClN_2O$, $M = 284,8$ g/mol).⁶ Nerijetko se nalazi i kao primjesa kod ostalih droga. Pri analizi na masenom spektrometru pokazuje glavni pik kod $m/z = 256$ dok su sporedni pikovi kod $m/z = 283, 284, 285, 257, 255, 258$ i 286 . Primjenom plinske kromatografije u kombinaciji s masenim spektrometrom postiže se granica detekcije diazepama u krvi u rasponu 0,2–20 ppb, dok kod HPLC analize u urinu i krvnoj plazmi ona iznosi 2 ppb.⁷

3. Kromatografija

Kromatografija je široko primjenjivana metoda za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih spojeva u smjesama²². To je tehnika u kojoj se komponente smjese odjeljuju na temelju različitih brzina kretanja kroz sustav uslijed različitih vremena boravka na nepokretnoj, odnosno u pokretnoj fazi. Kromatografski sustav tako čine nepokretna i pokretna faza te ispitivana tvar (analit) koja je tijekom kromatografskog procesa u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze.²³

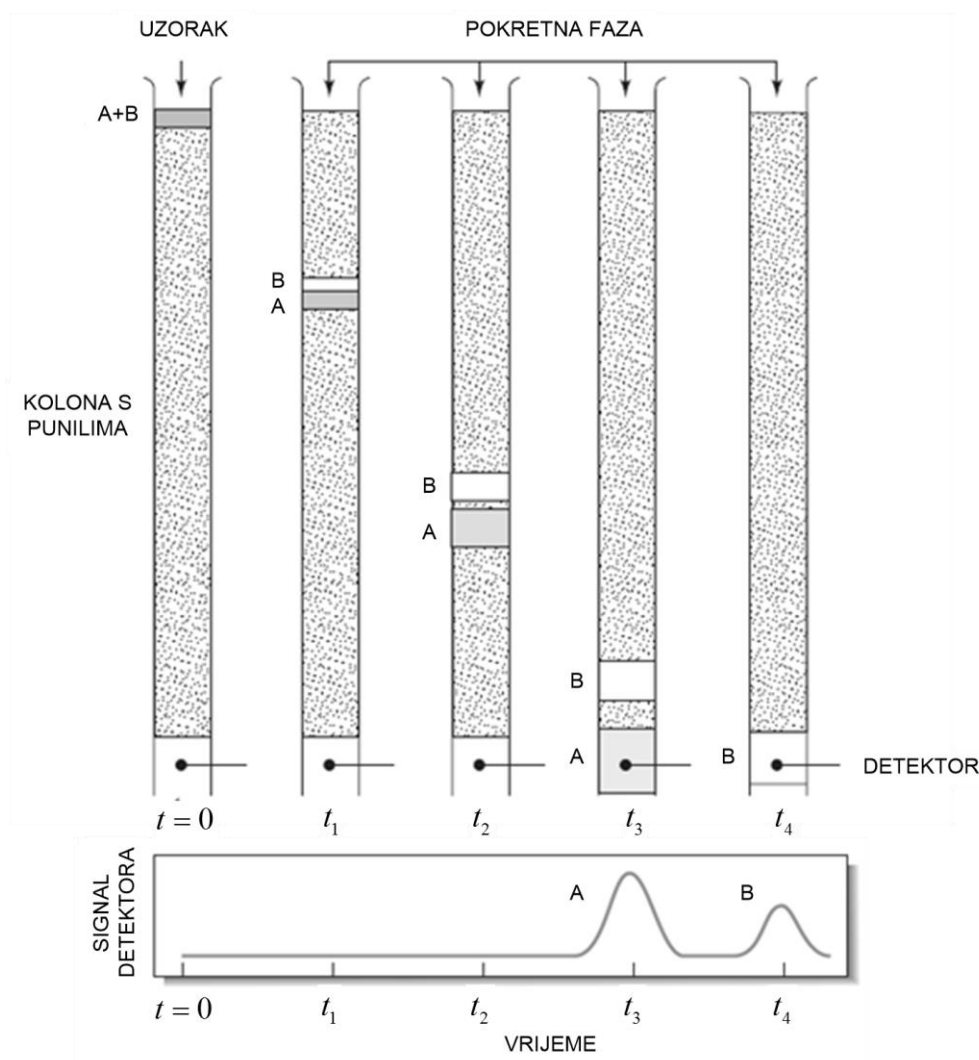


Slika 6. Prikaz kromatografskog procesa

Prema obliku nepokretne faze razlikujemo plošnu kromatografiju, gdje je nepokretna faza tanki sloj nanesen na inertnu podlogu (tankslojna kromatografija, TLC) ili poseban papir (papirna kromatografija, PC), te kolonsku kromatografiju gdje je nepokretna faza gusto pakirana u stupcu tj. koloni. Ovisno o sastavu pokretne faze razlikujemo plinsku kromatografiju (nosač je inertni plin), tekućinsku kromatografiju (nosač je kapljevina male viskoznosti) i kromatografiju pri superkričnim uvjetima (nosač je plin, fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka).

S obzirom na ravnotežu između pokretne i nepokretne faze, kromatografija se dijeli na: razdjelnu kromatografiju, gdje su obje faze fluidi (nepokretna faza je kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač); adsorpcijsku kromatografiju, gdje je nepokretna faza čvrsta, a pokretna

faza fluid; afinitetnu kromatografiju kod koje se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a do vezanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula; kromatografiju isključenjem, gdje nepokretna faza veličinom pora propušta ili isključuje tvar; te ionsku kromatografiju koja omogućava razdvajanje iona i polarnih molekula.²⁴



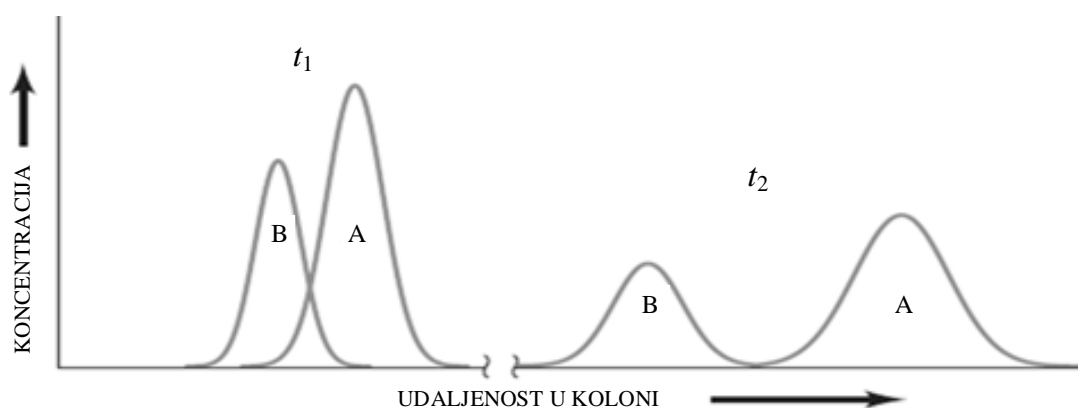
Slika 7. Prikaz razdvajanja dviju hipotetskih komponenti A i B kromatografijom na stupcu

Slika 7 prikazuje tipično razdvajanje dviju komponenti kromatografijom na stupcu (koloni). Otapalo, odnosno pokretna faza, često nazivana eluensom, nosi uzorak preko nepokretne faze. Proces u kojem eluens ispire komponente uzorka s nepokretne faze naziva se elucijom. Kolona se sastoji od uske cijevi u kojoj se nalazi sitni, gusto pakiran, čvrsti, inertni nosač (punilo) na čijoj površini se nalazi nepokretna faza. Nakon što se uzorak unese u kolonu, njegove komponente se prolaskom kroz kolonu raspodjeljuju između pokretne i nepokretne

faze uz nastojanje da uspostave ravnotežu raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Ravnoteža koju pokušavaju postići definirana je Nernstovim zakonom raspodjele:

$$K_c = \frac{[A]_N}{[A]_P} \quad (1)$$

gdje su $[A]_N$ i $[A]_P$ ravnotežne koncentracije komponente A u nepokretnoj, N, odnosno pokretnoj, P, fazi. No, kako je kolona dinamičan sustav, spomenuto ravnotežno stanje se nikad u potpunosti ne postigne. Dodavanjem eluensa, otopljeni se uzorak postepeno pomiče kroz kolonu uz daljnje razdvajanje ostalih komponenti.



Slika 8. Širenje kromatografskih zona hipotetskih komponenti A i B ovisno o vremenu boravka u koloni (t_1 i t_2); udaljenost između komponenti se povećava kako komponente putuju kroz kolonu, no također dolazi i do dodatnog širenja zone.

Komponente uzorka kreću se samo dok su u pokretnoj fazi, pa je zato prosječna brzina kojom se pojedina komponenta kreće kroz kolonu ovisna o vremenu kojeg ista provede u pokretnoj fazi. Vrijeme koje komponenta provede u koloni naziva se vremenom zadržavanja i to je duže što komponenta ima jači afinitet prema nepokretnoj fazi. Zbog različitih putova kroz kolonu, neke komponente imaju više ili manje prilika biti zadržane na nepokretnoj fazi (s obzirom na prosjek) zbog čega uzduž kolone dolazi do njihove raspodjele pa nastaju kromatografske vrpce ili zone. Koncentracijska raspodjela komponente unutar njene zone najčešće se pretpostavlja Gaussovom raspodjelom (slika 8), no u realnim uzorcima to često nije slučaj već imamo odstupanja od simetričnosti, odnosno tzv. pružanje ili povlačenje pikova. Na izlaz iz kolone se najčešće postavlja detektor, čiji odziv ovisi o koncentraciji komponente u analiziranom uzorku, a bilježi se kao funkcija vremena. Kao odziv dobiva se niz više ili manje simetričnih elucijskih krivulja, odnosno pikova, poput onih prikazanih na slici 7, koji se nazivaju kromatogramima. Kromatogram je primjenjiv i za kvalitativnu i za kvantitativnu

analizu. Naime, položaj pika u vremenu može poslužiti za identifikaciju komponente, a iz površine ispod pika ili njegove visine može se izračunati količina svake odijeljene komponente uzorka. Izostanak pika neke tvari s kromatograma sigurno potvrđuje njenu odsutnost u analiziranoj smjesi (ili je tvar prisutna u koncentracijama manjim od praga osjetljivosti primijenjene metode).

Na brzinu odjeljivanja zona eluiranih komponenti te na njihovo širenje utječe više kemijskih i fizikalnih veličina poput spomenutog afiniteta komponenata uzorka prema nepokretnoj fazi, brzine gibanja komponenata, veličina i poroznosti punila, temperature, duljine kolone i jakosti eluensa. Odjeljivanje se može poboljšati optimiranjem onih veličina koje ili povećavaju brzinu odjeljivanja zona ili smanjuju brzinu njihova širenja, što se pak ostvaruje mijenjanjem eksperimentalnih uvjeta u koloni. Uvjeti se optimiraju sve dok se ne postigne zadovoljavajuće odjeljivanje komponenti uz minimalni utrošak vremena. Kao kriterij optimizacije najčešće se koristi parametar razlučivanja, R_s , koji se definira kao:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{B1} + w_{B2}} \quad (2)$$

pri čemu su t_{R1} i t_{R2} vremena zadržavanja dviju susjedno eluiranih komponenti, a w_{B1} i w_{B2} širine njihovih kromatografskih zona.

Moderni instrumenti za provedbu kromatografskih analiza nazivaju se kromatografima.

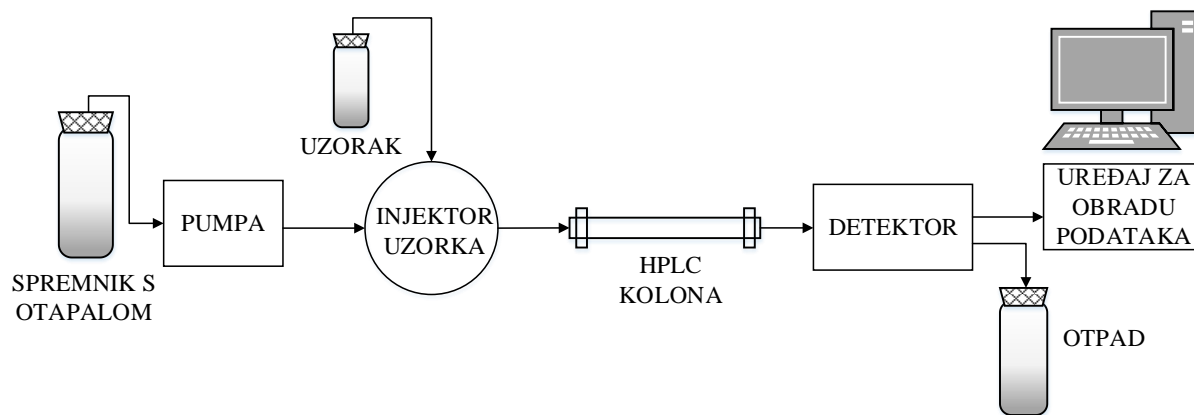
Kromatografija je s vremenom postala metodom koja ima apsolutnu prednost nad ostalim metodama kada je riječ o odjeljivanju kemijski srodnih spojeva. Osim toga, kromatografska se analiza može primijeniti za kvalitativno dokazivanje i kvantitativno određivanje odijeljenih kemijskih spojeva. Uvelike se primjenjuje pri utvrđivanju prisutnosti ili odsutnosti neke komponente u smjesi poznatog sastava.

U sljedećim odjeljcima pobliže će se opisati kromatografske tehnike i detektori koje se najčešće susreću u analizi psihoaktivnih tvari.

3.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) je vjerojatno najšire upotrebljavana kromatografska tehnika. Obje faze, pokretna i nepokretna, utječu na separaciju komponenata, a moguće je i korištenje vrlo širokog spektra tvari za pokretnu i nepokretnu fazu. Pokretna faza je tekućina, a ovisno o ravnoteži među fazama, odnosno ovisno o vrsti nepokretne faze razlikujemo: razdjelnu,

adsorpcijsku, ionsku kromatografiju i kromatografiju isključenjem. Nazivom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti želi se naglasiti razlika prvotnih, klasičnih, metoda primjene tekućinske kromatografije i modernih postupaka koji koriste znatno složenije sustave i uređaje.²²



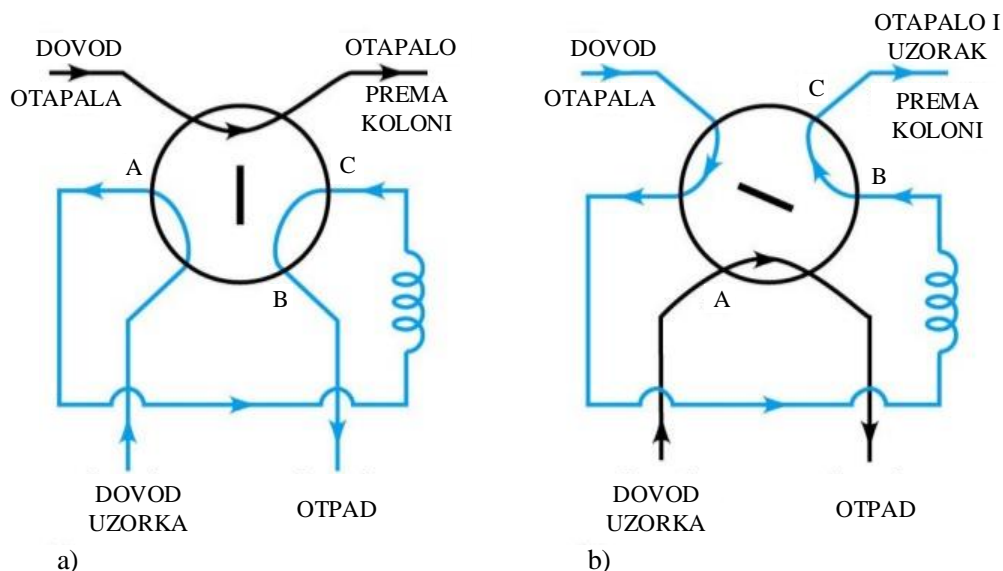
Slika 9. Shema HPLC kromatografa

Slika 9 prikazuje osnovne dijelove tipičnog HPLC sustava. Sustav se sastoji od jednog ili više spremnika za otapala, visokotlačne pumpe, injektora koji služi za ubrizgavanje uzorka u struju pokretne faze, kromatografske kolone na kojoj dolazi do razdvajanja komponenti, detektora te uređaja koji obrađuje na detektoru očitane podatke (računalo).

U spremnicima se nalazi otapalo (pokretna faza). Najjednostavnije je kada se koristi samo jedno otapalo. Međutim često se bolji kromatogram dobije elucijom uz upotrebu dva ili više sustava otapala. Pri upotrebi više otapala razlikujemo izokratnu eluciju, gdje se za vrijeme elucije koristi konstantan omjer izabranih otapala, te gradijentnu eluciju, gdje se omjer otapala programirano mijenja s vremenom. Pumpe kojima se postižu visoki tlakovi, jedan su od najvažnijih dijelova uređaja. Vrlo visoki tlakovi primjenjuju se kako bi se postigle dovoljne brzine protoka, što zahtijeva vrlo izdržljivu i skupu opremu. Zahtjevi koje pumpe moraju zadovoljiti vrlo su strogi: tlakovi do 400 bara, izlaz bez pulsiranja tlaka, brzine protoka 0,1-10 mL/min, reproducibilnost protoka veća od 99,5 %, te otpornost na moguću koroziju izazvanu različitim otapalima.²² Često se uz pumpe, u sustavu nalazi i oprema za uklanjanje otopljenih plinova (engl. *degasser*), jer spomenuti plinovi mogu utjecati na rezultate analize (smanjenje efikasnosti kolone uslijed nastanka plinskih džepova, šumovi na detektoru...).

Unošenje uzorka u sustav se odvija ponekad kroz elastičnu membranu, tzv. septum, što se često primjenjuje zbog jednostavnosti.²² No kako taj način nije osobito reproducibilan, u novije se vrijeme najčešće primjenjuje injektorski ventil uz koji se nalazi više izmjenjivih petlji

(slika 10). Petlja u ventilu se prvo puni uzorkom (tzv. injektorska petlja), nakon čega se zakretanjem ventila tok otapala dovodi na injektorsku petlju čime se uzorak injektira u kolonu.²⁴ Prije unošenja u kolonu, uzorak je potrebno otopiti u pokretnoj fazi, a ako to nije moguće, onda se koristi otapalo što sličnije pokretnoj fazi.



Slika 10. Shematski prikaz injektorskog ventila; a) punjenje petlje uzorkom, b) injektiranje

Suvremene HPLC kolone najčešće su izrađene od čeličnih cijevi, iako se ponekad, uz niske tlakove, upotrebljavaju i staklene cijevi debljih stijenki.²² Kolone se razlikuju u dimenzijama: promjer varira između 4 i 10 mm, najčešće se susreće promjer od 4,6 mm, dok su duljine kolona od 3 do 25 cm. Punjene su poroznim punilima promjera 3-10 μm , a kao punilo najčešće se upotrebljava silikagel. Upotrebljavaju se i punila koja sadrže glinicu, porozne polimere i ionske izmjenjivače. U zadnje vrijeme se često mogu pronaći i mikrokolone duljine 3-10 cm te promjera 0,2-1 mm. Takve kolone pokazuju visoku efikasnost, povećanu osjetljivost uz smanjenu upotrebu otapala te u konačnici nižu cijenu.²³

Za HPLC ne postoji univerzalni sustav detektora već se on odabire ovisno o prirodi komponenta. Oni koji se najčešće upotrebljavaju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog (UV), infracrvenog (IR) ili vidljiva (VIS) zračenja. Često se upotrebljavaju i detektori koji mjere promjene u indeksu loma otapala prouzročene prisutnošću molekula komponenti, ili maseni spektrometri. Nešto više o detektorima biti će objašnjeno u poglavlju 3.3.

3.2 Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (TLC, engl. *Thin Layer Chromatography*) vrsta je plošne kromatografije, gdje je nepokretna faza tanki sloj nanesen na inertnu podlogu (pločicu). Kako se kao pokretna faza može koristiti samo tekućina, TLC se može promatrati kao vrsta tekućinske kromatografije. Aparatura za TLC mnogo je jednostavnija i jeftinija od one za HPLC analize, pa se TLC nerijetko koristi za pripremu, tj. optimiranje uvjeta HPLC separacije.

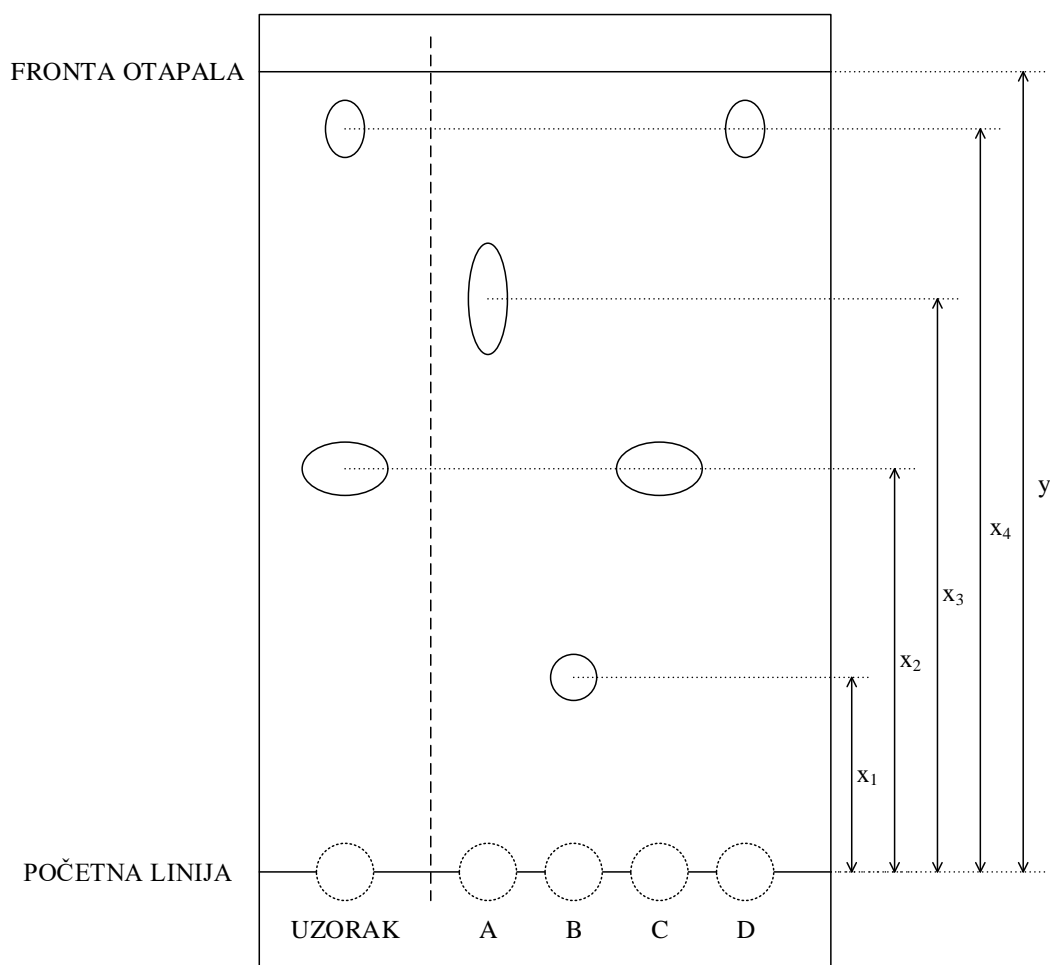
TLC separacije se najčešće provode na staklenoj pločici, iako se upotrebljavaju i pločice od plastike ili aluminijske. Kao nepokretna faza najčešće se koristi silikagel (u 90% slučajeva), kojem se dodaju punila (do 15% udjela) kako bi se proizveo stabilniji sloj koji se čvršće prima za pločicu. Najčešća punila koja se pojavljuju su kalcijev sulfat i polivinil alkohol (PVA). Veličine čestica adsorbensa kreću uglavnom između 10 i 40 μm . Sukladno HPLC analizi, postoji i HPTLC analiza, tj. tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Thin Layer Chromatography*), gdje se koristi veličina čestica adsorbensa 5–6 μm . Iako HPTLC pokazuje izrazito visoke učinkovitosti, klasična TLC analiza ipak se više koristi.²³

Uzorak se na pločicu nanosi tankom kapilarnom ili mikropipetom, prislanjanjem iste na pločicu, i to tako da zauzme što manju površinu. Time se smanjuje mogućnost širenja kromatografske zone te povećava učinkovitost separacije. Moguće je uzorak nanijeti na isto mjesto više puta (sa sušenjem pločice između ponavljanja), kako bi se povećala količina uzorka za separaciju, a zadržala mala površina koju uzorak zauzima. Potrebno je paziti da se prilikom aplikacije uzorka ne ošteti nepokretna faza. Mjesto nanošenja uzorka najčešće je 1-2 cm od ruba pločice.²² Pločicu je prije stavljanja u pokretnu fazu potrebno osušiti, kako bi otapalo u potpunosti isparilo. Za razliku od standardne tekućinske kromatografije, otapalo koje se koristi za uzorak ne mora biti isto otapalo kao i pokretna faza, niti slično pokretnoj fazi.

Razvijanje pločice zapravo predstavlja razvijanje kromatograma: uzorak biva nošen pokretnom fazom preko pločice tj. preko nepokretne faze. Otapalo, tj. pokretna faza, se preko nepokretne kreće kapilarnim silama. Nakon što se na pločicu nanese uzorak, ona se stavlja u zatvoreni spremnik (najčešće stakleni), kako bi se, koliko je to moguće, uspostavila ravnoteža između otapala i njegovih para, te kako bi se stanje sustava što je više moguće približilo ravnotežnom. Trajanje razvijanja je najčešće oko 30 minuta. Pločica se jednim dijelom uroni u otapalo tako da početna fronta otapala ne dodiruje liniju na koju je nanesen uzorak te se spremnik zatvori. Takav sustav se ostavlja u mirovanju sve dok fronta otapala ne prijeđe otprilike dvije trećine pločice, ili koliko je već potrebno za ostvarivanje zadovoljavajućeg

razdvajanja. Nakon toga pločica se vadi iz spremnika te se ostavlja da se osuši kako bi isparilo otapalo te ostale samo više ili manje razdvojene komponente.

Detekcija komponenti može se provoditi na nekoliko načina. U većini slučajeva komponente uzorka nisu vidljive golim okom, tj. u dijelu vidljivog spektra svjetlosti. Ukoliko neka od komponenata fluorescira, može se detektirati promatranjem pod UV lampom. Najčešće se pločica pošprica prikladnim reagensom koji u reakciji s komponentama daje obojenje vidljivo oku. Postoje popisi reagensa za vizualizaciju određenih tvari.²⁵



Slika 11. Shematski prikaz TLC pločice nakon razvijanja analiziranog uzorka.

Na slici 11 prikazana je TLC pločica nakon razvijanja nekog hipotetskog uzorka. Pored nepoznatog uzorka nanoseni su standardi četiriju tvari: A, B, C i D. Pomoću njih, uspoređivanjem dobivenih zona, možemo odrediti nalazi li se u uzorku neka od spomenutih četiriju tvari. Ovakav način detekcije služi za kvalitativno određivanje. S kromatograma prikazanog na slici 11 možemo vidjeti da se nepoznati uzorak sastoji od komponente C i D zbog podudaranja dobivenih kromatografskih zona (razdvojenih mrlja).

Osim usporedbe sa standardom, komponenta se može odrediti i ovisno o obojenju nakon špricanja pločice sa otopinom za vizualizaciju. Većinom se kvalitativno određivanje komponenti provodi mjerenjem R_f vrijednosti. R_f predstavlja omjer udaljenosti od linije na koju je nanesen uzorak (početna linija) do sredine detektirane mrlje komponente te udaljenosti od linije uzorka do završne fronte otapala. Za hipotetsku komponentu C sa slike 11, R_f vrijednost bi se primjerice definirala kao:

$$R_{f,C} = \frac{x_2}{y} \quad (3)$$

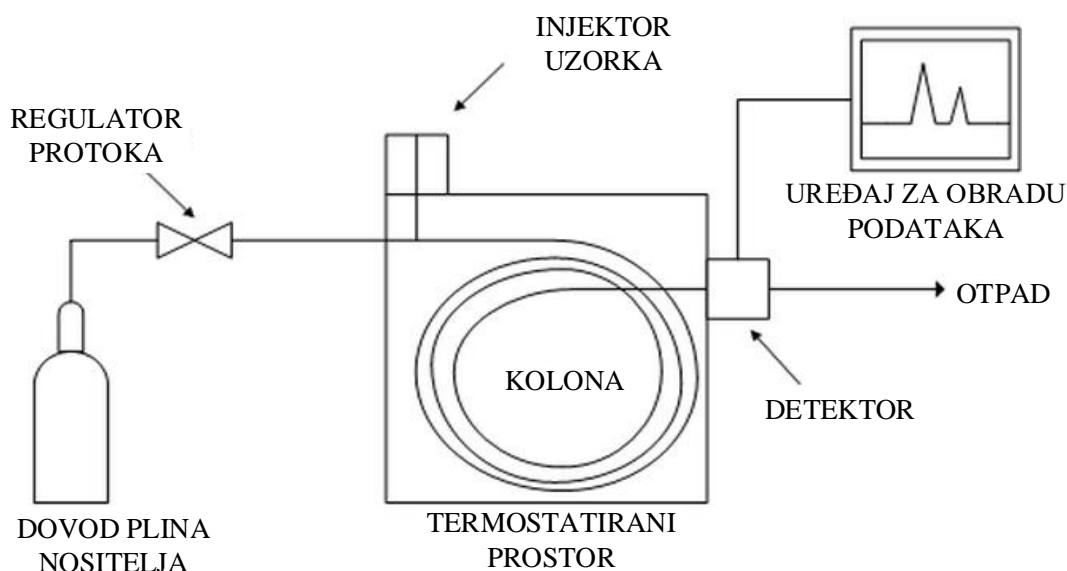
Iako se TLC najčešće koristi za kvalitativnu analizu, kvantitativna analiza se može provoditi vizualnim uspoređivanjem veličine pojedine mrlje sa jednim ili više standarda poznatih koncentracija: odrede se veličine mrlja te se crta kalibracijska krivulja koncentracija/veličina koja pomaže kvantificiranju komponente. Nerijetko se pločica fotografira, te obrađuje naprednim kompjuterskim programima i prevodi u uobičajen kromatografski prikaz s pikovima.²³

TLC je manualna tehnika. Njene glavne prednosti su jednostavnost i niska cijena, mogućnost analize više uzoraka na jednoj pločici te relativno brza analiza. Međutim, neki od nedostataka su nemogućnost kontrole protoka pokretne faze, nepredvidivost i nepreciznost kvantitativne analize. Kako bi se smanjila mogućnost pogreške te povećala reproducibilnost rezultata, svaki od pojedinačnih koraka provedbe TLC analize nastoji se automatizirati (nanošenje uzorka, automatizirani spremnik za razvijanje kromatograma, skeniranje podataka, obrađivanje podataka).

3.3 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC, engl. *Gas Chromatography*) primjenjuje se za analizu uzoraka koji su pri radnim uvjetima u plinovitom stanju. Pokretna faza je inertni plin koji eluira komponente smjese iz kolone napunjene nepokretnom fazom. Za razliku od tekućinske, u plinskoj kromatografiji komponente ne reagiraju s pokretnom fazom, pa zbog toga brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi o kemijskoj strukturi pokretne faze. Nepokretna faza može biti čvrsta tvar velike specifične površine (plinska adsorpcijska kromatografija) ili fluid vezan kemijski/adsorpcijom na inertni nosač (plinska vezana faza ili plinsko tekućinska-kromatografija). Primjena plinske adsorpcijske kromatografije ograničena je na plinovite

spojeve male molekulske mase (npr. ugljikov oksid, kisik, dušik i ugljikovodici) jer se polarnije komponente više zadržavaju na čvrstoj površini, što najčešće suzuje primjenu čvrstih punila u plinskoj kromatografiji.²² Zbog toga plinsko-tekućinska kromatografija ima najveću primjenu te će se o njoj ovdje nešto više reći.



Slika 12. Shema plinskog kromatografa²⁶

Slika 12 prikazuje osnovne dijelove plinskog kromatografa. Uzorak je kroz kolonu nošen plinom nositeljem, koji mora biti kemijski inertan i prema komponentama uzorka i prema punilu. Najčešće se upotrebljavaju helij, dušik i vodik. Plin nositelj mora biti izrazito velike čistoće jer mu je jedini zadatak nošenje komponenta kroz kolonu.²³ Na dovod plina postavljaju se regulatori tlaka, ventili i mjerači protoka, a često i molekularna sita koja služe za uklanjanje vode i ostalih nečistoća. U kolonu se u vrlo kratkom vremenu (trenutno) unosi mala količina uzorka, kako bi se smanjila mogućnost širenja zone eluirane komponente. Tekući se uzorak najčešće unosi kroz silikonsku membranu u zagrijani dio uređaja smješten na vrhu kolone. Mjesto na kojem se unosi uzorak grije se otprilike na 50 °C iznad temperature vrelišta najmanje hlapive komponente, kako bi za vrijeme unošenja u kolonu uzorak trenutačno ispario. Plinoviti uzorci se unose pomoću plinskih (dozirnih) ventila, dok se čvrsti uzorci najčešće unose nakon otapanja u pogodnom otapalu.²²

Za plinsku kromatografiju koriste se kolone s punilima ili kapilarne kolone. Kapilarne kolone, za razliku od kolona s punilima, imaju nepokretnu fazu nanесenu na stjenke kolone. Kolone su uglavnom izrađene su od staklenih, metalnih (čelik, bakar, aluminij) ili teflonskih cijevi, kapilarne i od kvarca, uobičajene duljine 2-3 m za punjene i 10-100 m za kapilarne, te

unutarnjeg promjera 2-4 mm za punjene i 0,1-1 mm za kapilarne kolone. Kolona je smještena u termostatiranom prostoru te je za precizan rad potrebno temperaturu održavati u granicama nekoliko desetinki stupnja. Da bi se mogla smjestiti u termostatirani prostor, kolona mora biti savijena u obliku spirale. U njih se stavlja jednoliko, sitnozrno punilo ili čvrsti nosač na koji je nanesen tanki sloj nepokretne tekuće faze. Za izradu čvrstih nosača najčešće se upotrebljavaju posebno obrađene prirodne dijatomejske zemlje.

Većina detektora koji se koriste u plinsko-tekućinskoj kromatografiji su osmišljeni isključivo za tu upotrebu. Moraju pokazati brz odziv na male promjene koncentracije komponenata tijekom njihove elucije iz kolone jer one nisu veće od nekoliko promila (nerijetko čak i manje od toga). Također, vrijeme prolaska pika kroz detektor najčešće iznosi 1 s (ili manje), pa je u tom vremenu potrebno prikazati potpun odziv. Najčešće se upotrebljavaju: detektor toplinske vodljivosti (TCD, engl. *Thermal Conductivity Detector*; temelji se na promjenama toplinske vodljivosti struje plina nositelja koja nastaje zbog prisutnosti komponente), plamenoionizacijski detektor (FID, engl. *Flame Ionization Detector*; radi na principu ionizacije u plamenu vodik/zrak) i detektor apsorpcije elektrona (ECD, engl. *Electron Capture Detector*; struja elektrona nekog beta emitera ionizira plin nositelj te se u prisutnosti komponente struja smanjuje).^{22,23} Plinski kromatografi često se povezuju sa spektroskopskim i elektrokemijskim tehnikama analize čije kombinacije pružaju velike mogućnosti za određivanje komponenti pojedinih smjesa jer je plinska kromatografija sama po sebi dosta ograničena po pitanju kvalitativne analize. Osobito bih ovdje istaknula masenu spektrometriju.

3.4 Detektori

Kromatografija bez detekcije je isključivo separacijska tehnika. Zbog uvođenja identifikacijskih mogućnosti, na kromatografske uređaje se vežu razni detektori. Ovdje će se spomenuti neki od najčešće primjenjivanih.

3.4.1 Elektrokemijski detektor

Djelovanje elektrokemijskog detektora (ED) temelji se na mjerenju neke električne veličine, npr. struje, otpora, napona ili naboja, koja je izravno proporcionalna koncentraciji komponente u uzorku. Tako su metode elektrokemijske detekcije amperometrija, konduktometrija, voltometrija, kulometrija ili potenciometrija. Amperometrijski detektori se

najčešće spajaju s HPLC kromatografima.²⁷ Amperometrijska detekcija zasniva se na mjerenju jakosti struje elektrokemijske (redoks) reakcije na elektrodama. Koristi se detektorska ćelija s tri elektrode: radnom, referentnom i protuelektrodom. Referentna elektroda ima stalni kemijski potencijal (npr. srebrna, kalomel, ugljikova elektroda) te se između nje i radne elektrode uspostavi razlika potencijala zbog čega na radnoj elektrodi dolazi do elektrokemijske reakcije. Jakost struje elektrokemijske reakcije predstavlja signal detektora koji je proporcionalan koncentraciji komponente.²⁴ Elektrokemijske metode detekcije pružaju vrlo veliku osjetljivost i selektivnost te su kao takve izrazito korisne za detekciju vrlo niskih koncentracija komponenata u uzorcima.

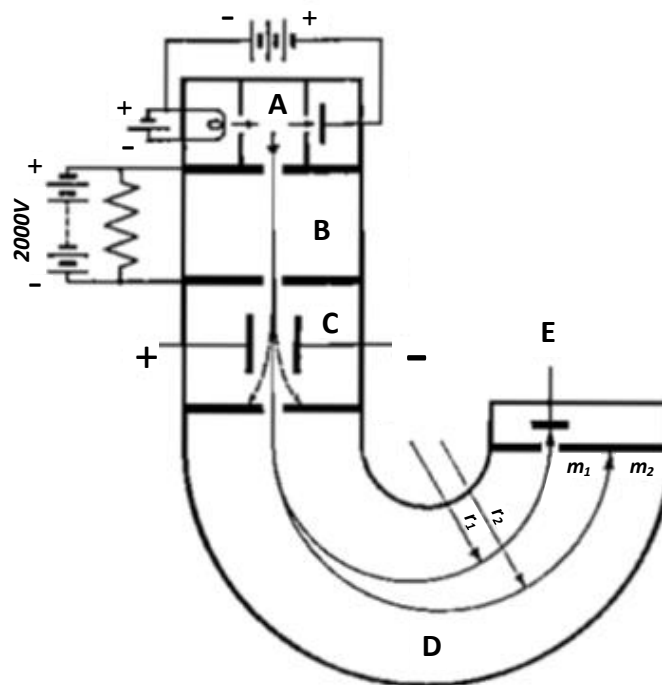
3.4.2 Detektor s nizom dioda

Detektor s nizom dioda (DAD, engl. *Diode Array Detector*) temelji se na osvjetljivanju uzorka polikromatskim zračenjem (najčešće iz deuterijeve lampe), pri čemu dolazi do interakcije svjetlosti s uzorkom te apsorpcije zračenja. Nakon toga slijedi disperzija propuštenog zračenja na optičkoj rešetki na snopove svjetlosti koji istodobno padaju na niz od oko 1000 dioda. Svaka od dioda je zadužena za mjerenje apsorpcije pri određenoj valnoj duljini: tako se dobiva i pohranjuje apsorpcijski spektar svake komponente. Prednost ovog detektora je ta što u kombinaciji sa računalom ima pristup podacima o cijelom spektru te omogućava izvršavanje raznih zadataka kao npr. određivanje čistoće pika, kvalitativne analize komponenata...^{23,24}

3.4.3 Maseni spektrometar

Osnovni princip rada masenog spektrometra (MS) je takav da se uzorak pod vakuumom ionizira (A) nakon čega se ioni ubrzavaju u električnom polju (B) te odlaze u odabirač brzina (C). U njemu se kombiniranom primjenom električnog i magnetskog polja omogućava prolaz ionima iste brzine. Nakon toga ioni prolaze kroz konstantno magnetsko polje (D) kružnim putanjama čiji se radijusi odnose kao njihove mase, tj. ioni bivaju razdvojeni ovisno o omjeru njihove mase i naboja (m/z). Na kraju dolaze do pretvornika- detektora (E) koji pretvara broj iona određene vrste u električni signal.²⁸ Spektar masa (ukupni odziv) se dobiva kao ovisnost dobivenog električnog signala o m/z omjeru, te može poslužiti i za kvalitativnu i za

kvantitativnu analizu. Kako je iznos naboja iona (z) uglavnom $+1$, m/z omjer je zapravo jednak masi tog iona.²³



Slika 13. Shematski prikaz masenog spektrometra²⁸

Prvi dio procesa je ionizacija uzorka. Ovisno o načinu ionizacije razlikujemo: ionizaciju elektroraspršenjem (ESI, engl. *Electrospray Ionization*), ionizaciju termoraspršenjem (TSI, engl. *Thermospray Ionization*), kemijsku ionizaciju (CI, engl. *Chemical Ionization*), te ionizaciju elektronskim udarom (EI, engl. *Electron Impact ionization*). S plinskim kromatografima se koriste EI i CI, a sa HPLC kromatografima TSI i ESI.

Najčešći analizatori masa koji se pojavljuju su: kvadrupolni analizator koji se sastoji od četiri štapa pod elektromagnetskim poljem (Q, engl. *Quadrupole*), analizator koji zarobi ion u šupljini ili ionska klopka/linearna ionska klopka (IT/LIT, engl. *Ion Trap/Linear Ion Trap*), analizatori koji mjere vrijeme prolaska iona kroz cijev nakon pobude elektrostatskom silom (TOF, engl. *Time Of Flight*), analizatori gdje ioni ulaze u ciklotron te nakon elektromagnetske pobude ovisno o masi izlaze iz komore do detektora (FT-ICR, engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*).²³

Maseni spektrometar se vrlo efikasno spaja kako sa plinskim, tako i sa HPLC kromatografima. Takve kombinacije su izrazito korisne i za kvalitativne i za kvantitativne analize. Modernizacijom uređaja te korištenjem računala s pristupom bazi podataka,

kombinacije kromatografskih metoda sa masenim spektrometrom koriste se gotovo na svakodnevnoj bazi te su iznimno efikasno sredstvo za određivanje nepoznatih uzoraka.

3.4.4 Plameno-ionizacijski detektor

Plameno-ionizacijski detektor, kao što je već ranije spomenuto, koristi se u kombinaciji s plinskim kromatografom. Princip rada temelji se na ionizaciji uzorka u struji vodika i zraka. Mala količina uzorka se unese u plamen gdje komponente sagorijevaju uz stvaranje struje iona i elektrona. Ta se struja mjeri kolektorskom elektrodom, gdje je jakost struje proporcionalna koncentraciji komponente u uzorku.

Plameno-ionizacijski detektor primjenjiv je na sve organske spojeve.²³

4. Praktična primjena u detekciji droga

Izbor metode analize kod toksikoloških ispitivanja ovisi o specifičnostima problema koji se stavlja pred analitičara.

Najčešće su uzorci potpuno nepoznatog sadržaja, pa je osnovni zadatak potvrditi (ili opovrgnuti) postojanje psihoaktivnih komponenti. Kako su uzorci različitog podrijetla, često i biološkog, potrebno je napraviti dobru i kvalitetnu pripremu uzorka kako bi on bio prikladan za instrumentalnu analizu. Iako postoji više matrica iz kojih se mogu detektirati psihoaktivne komponente, najčešće matrice su dijelovi krvi (plazma ili serum), urin i slina. Kako se radi o kompleksnim matricama pri analizi se često koristi metoda unutarnjeg standarda, a poželjno je i korištenje baza podataka (ukoliko postoje) kao referentnih okvira.

Zbog kompleksnosti problema analize postojećih droga, ali i neprestanih pojava novih psihoaktivnih supstanci, potrebno je kontinuirano razvijati metode analiza.

4.1 HPLC analiza THC-a

HPLC metode imaju važnu ulogu u analizi THC-a. Thompson i Cone²⁹ su koristili HPLC kao separacijsku tehniku koja im je omogućila pročišćavanje THC-a iz bioloških uzoraka bez složene prethodne obrade uzoraka (što je bila prednost naspram GC analiza). Thompson i Cone su pročišćavanje provodili na trima različitim biološkim uzorcima: krvnoj plazmi, serumu i slini osoba koje su pušile marihuanu.

Iz uzoraka su najprije uklonjeni proteini dodatkom metanola i perkloratne kiseline, nakon čega je uslijedila ekstrakcija dodatkom metanola i 4-dodecilresorcinola (koji je dodan da bude unutarnji standard). Smjesa je ostavljena u kontaktu na tresilici 15 minuta i potom centrifugirana. Odvojenoj otopini dodana je zasićena otopina NaCl i toluena. Smjesa je ponovo miješana na tresilici te zatim centrifugirana nakon čega je provedena HPLC analiza organske faze.

Za razdvajanje korištena je kolona C₁₈ (Waters, μ Bondapak C₁₈, 15 cm \times 3,9 mm). Mobilna faza pripremljena je kombinacijom dviju otopina: puferske otopine natrijevog monokloracetata i monokloracetatne kiseline u vodi te smjesom metanola i vode omjera 77,5 : 22,5. Elucija je provedena izokratno pri sobnoj temperaturi i protoku eluenta od 3 mL/min, a ove dvije otopine miješane su na način da se u eluentu dobije krajnja koncentracija natrijevog monokloracetata 0,10 M, a monokloracetatne kiseline 0,025 M. Komponente su

detektirane amperometrijskim detektorom koristeći staklenu ugljičnu (engl. *glassy carbon*) radnu elektrodu i Ag/AgCl referentnu elektrodu. Radna elektroda je imala potencijal +90 V s obzirom na referentnu Ag/AgCl elektrodu.

Korišteni elektrokemijski detektor pokazao se dovoljno osjetljivim za detekciju niskih fizioloških koncentracija THC-a u biološkim uzorcima.

Pri ovom istraživanju analizirane su i druge komponente marihuane, kao i ostali metaboliti THC-a kako bi se ocijenila selektivnost metode. Na dobivenim kromatogramima nisu primijećeni nikakvi interferencijski pikovi pri vremenima zadržavanja THC-a i unutarnjeg standarda, što se vidi i iz vrijednosti relativnih vremena zadržavanja u odnosu na THC (prikazana u tablici 1). Budući da se pokazalo kako ostale nečistoće iz matrice eluiraju tek 4-5 h nakon unošenja uzoraka, bilo je moguće analizirati oko 12 uzoraka prije njihove pojave. Zbog toga se nakon 12 analiziranih uzoraka kolona ispirala metanolom kako bi se iz nje uklonili zaostaci.

Tablica 1. Relativna vremena zadržavanja (*RRT*) komponenata marihuane i metabolita THC-a u odnosu na THC²⁹

KOMPONENTA	<i>RRT</i>
11-hidroksitetrahidrokanabinol	0,469
Kanabidiol	0,511
9-karboksi-11-nor- Δ^9 -tetrahidrokanabinol	0,526
Kanabigerol	0,543
Kanabinol	0,829
THC	1,000
Heksahidrokanabinol	1,180
4-dodecilresorcinol (unutarnji standard)	1,240
Kanabikromen	1,340

4.2 HPLC analiza *ecstasy* tableta

McFadden i suradnici³⁰ koristili su HPLC uz monolitne kolone za separaciju i kvantitativno određivanje MDMA i ostalih amfetamina u tabletama *ecstasy*-ja. Razvijanje jedinstvenog sustava koji omogućava razdvajanje MDMA i njegovih metabolita bilo je vrlo poželjno zbog toga što se u uzorcima *ecstasy*-ja najčešće nalazi upravo njihova kombinacija. Metoda se pokazala vrlo brzom i selektivnom.

Korištene monolitne kolone zbog svoje velike propusnosti omogućavaju veće protoke pokretne faze bez znatnijeg pada tlaka. Time se postižu brže separacije bez gubitka efikasnosti kolone. U odnosu na kolone s punilima, na monolitnim kolonama se jednako zadovoljavajuća separacija može provesti u dvostruko kraćem vremenu.

Otopine uracila (koji je bio korišten kao nezadržana komponenta) i metoklopramida HCl (otopina unutarnjeg standarda) pripremljene su otapanjem tvari u etanolu. Uzorci tableta *ecstasy*-ja su smrvljeni u fini, homogeni prah, te je 10 mg svake tablete otopljeno u 10 mL otopine unutarnjeg standarda. Kao pokretna faza koristila se mješavina otapala fosfatnog pufera koncentracije 20 mM (kalijev dihidrogenfosfat i fosfatna kiselina) i acetonitrila u odnosu 97 : 3. Elucija se provodila izokratno pri protoku od 3 mL/min te pH 2,5.

Analiza se provodila na Shimatzu HPLC sustavu sa separacijom na monolitnoj koloni Chromolith SpeedROD RP-18e (50 mm × 4,6 mm) te spektrofometrijskom detekcijom pri 200 nm.

Analizirana su 183 uzorka *ecstasy* tableta. Analize su jasno pokazale postojanje amfetamina, MDMA, MDEA (metildietanolamin), i kofeina u 98,3% analiziranih uzoraka.

Primijenjena kromatografska tehnika pokazala se zadovoljavajućom za separaciju amfetamina i tipičnih punila *ecstasy* tableta. Mobilna faza koja se sastojala od fosfatnog pufera i acetonitrila je u zadovoljavajućoj mjeri separirala MDMA od ostalih metabolita amfetamina. Korištenje metode na velikom broju uzoraka ukazalo je na prikladnost metode za rutinsku analizu *ecstasy* tableta.

4.3 GC analiza heroina

Plinska kromatografija odgovarajuća je tehnika za analizu uzoraka heroina, jer za razliku od HPLC tehnike, GC omogućava razdvajanje i detekciju velikog broja komponenti u uzorku, što je najčešće slučaj kod uzoraka heroina.

Sperling³¹ je koristio GC-FID za analizu uzorka heroina s nepoznatim punilima. Praškasti uzorci heroina pripremljeni su za analizu otapanjem u metanolu uz dodatak kloroforma i unutarnjeg standarda, te po potrebi dodatno profiltrirani. Kao unutarnji standard koristila se otopina tetrakosana u kloroformu. Analiza se provodila na Perkin-Elmer plinskom kromatografskom sustavu sa FID detektorom. Korištena je kapilarna kolona DB-1 (silikagel debljine 0,25 µm, 30 m × 0,25 mm, J&W Scientific) jer kolone s punilima nisu bile prikladne za analizu tako složenih uzoraka (uzoraka s tolikom brojem komponenata). Kao pokretna faza

korišten je vodik, a vodik je korišten i za plamen FID detektora. Koristio se isparivač s mogućnošću temperaturnog programiranja (PVT, engl. *programmable temperature vaporizer*) koji je omogućavao injekciju uzorka pri niskoj temperaturi uz naglo povišenje temperature nužno za isparavanje uzorka, što je pomagalo očuvanju komponenti osjetljivih na visoke temperature.

Analizom je ostvareno dobro razdvajanje komponenata uzorka, a uz kokain potvrđene su i sljedeće komponente: nikotinamid, fenacetin, kofein, fenobarbital, prokain, metakvalon, N-fenil-2-naptilamin, tetrakosan, acetilkodein, monoacetilmorfin, heroin, papaverin i noskapin. Heroin, kokain i prokain je moguće analizirati i HPLC-om, dok za ostale komponente uzorka to nije moguće jer dolazi do preklapanja pikova uslijed vrlo sličnih vremena zadržavanja.

Zbog kompleksnosti uzorka, kolona s punilima nije bila prikladna za analizu uzoraka heroina zbog velikog broja komponenti. Nasuprot tome, kapilarne kolone pokazale su se odgovarajućima za kvalitativnu i kvantitativnu analizu takvih uzoraka. Dobiveni su izvrsni rezultati separacije i kvantifikacije što je dokaz da je metoda primjenjiva na širok spektar (kompleksnih) uzoraka heroina.

4.4 GC analiza benzodiazepina

Borrey i suradnici³² koristili su plinsku kromatografiju sa masenim spektrometrom za istovremenu analizu 15 osnovnih benzodiazepinskih spojeva te njihovih metabolita niskih koncentracija u uzorcima urina. Benzodiazepini se često susreću u kliničkim i forenzičkim toksikološkim analizama. Urin je preferirana matrica za benzodiazepine jer se u njemu nalaze veće koncentracije nego u krvnoj plazmi, što je izrazito bitno za komponente koje se nalaze u vrlo niskim koncentracijama. Kako benzodiazepini u organizmu metaboličkim reakcijama mijenjaju svoj izvorni oblik, enzimatskom hidrolizom obrađuje se uzorak te benzodiazepini ostaju nepromijenjeni (za razliku od moguće obrade uzorka kiselom hidrolizom što razlaže benzodiazepine na benzofenone).

Analiza se provodila na instrumentu koji se sastojao od plinskog kromatografa sa masenim spektrometrom kao detektorom (GC-MS). Kao pretkolona koristila se *Restek hydroguard column* (5 m × 1,32 mm) dok je separacijska kolona bila SGE BP1 kapilarna kolona (30 m × 0,25 mm) sa nepolarnim polidimetilsiloksanom kao nepokretnom fazom debljine 0,25 μm. Kao pokretna faza koristio se helij. Detektor je bio maseni spektrometar sa EI ionizacijom.

Uzorci urina su prvo bili obrađeni enzimatskom hidrolizom što je rezultiralo zadovoljavajućim oporavkom benzodiazepina iz uzorka te ekstrahirani na fenilnim kolonama (*phenyl-type solid-phase extraction columns*). Nakon toga uslijedila je plinska kromatografija gdje se pokazalo zadovoljavajuće razdvajanje komponenata.

Kako bi se pokazala primjenjivost metode na realnim uzorcima, analiza je provedena na 300 uzoraka urina osoba koje su konzumirale određene benzodiazepinske lijekove. Metoda je pokazala pozitivan ishod te se nije naišlo na nikakve probleme tijekom analize. Bilo je moguće analizirati najmanje 15 uzoraka prije nego što je pretkolona izgubila svoju funkcionalnost. Do onečišćenja separacijske kolone nije došlo.

Optimirani uvjeti enzimatske hidrolize nakon koje je slijedila ekstrakcija, omogućili su zadovoljavajuće oporavke svih ciljanih benzodiazepina iz urina. Dobiveni ekstrakti bili su prikladni za injekciju u kolonu. GC-MS metoda pokazala se vrlo osjetljivom i selektivnom za određivanje 15 najčešće korištenih benzodiazepina u niskim koncentracijama u uzorcima urina.

4.5 TLC analiza kokaina

Paul i Conine³⁴ koristili su tankoslojnu kromatografiju za razdvajanje kokaina iz smjese sa kodeinom i morfinoidnim alkaloidima (heroin, 6-monoacetilmorfin, morfin i kinin). Nepokretna faza bila je silikagel impregniran natrijevim hidroksidom, a kao pokretna faza (razvijatelj) koristila se mješavina acetona i benzena u omjeru 1:1.

Staklene podloge veličine $7,5 \times 2,5$ cm pripremljene su umakanjem u mješavinu otopine natrijevog hidroksida i praškastog silikagela (sadržavao je 13 % kalcijeva sulfata).

Kromatogrami su razvijani u zaklopljenim posudicama veličine $9,5 \times 5,5$ cm u 2 mL pokretne faze, u vremenu od 3 minute. Nakon razvijanja, na pločicama je odmah označena fronta otpala te su pločice ostavljene da se posuše na sobnoj temperaturi. Kako bi se detektirale željene komponente, pločica je prskana otopinom kalijevog jodoplatinata.

Na kromatogramu su detektirane dvije razmaknute mrlje, gdje je kokain detektiran kao zasebna mrlja koja pokazuje rapidnu migraciju. Ostale komponente prikazale su se u obliku jedne velike mrlje koja se nije značajno odmaknula od mjesta nanošenja na pločicu. U tablici 2 su prikazane R_f vrijednosti komponenti dobivene separacijom navedene smjese.

Rezultati pokazuju da je kokain u zadovoljavajućoj mjeri separiran od ostalih komponenti, te je metoda uspješna za detekciju kokaina u sličnim smjesama. Također, zbog

vrlo velike uspješnosti razdvajanja kokaina, moguće ga je u potpunosti izdvojiti nakon separacije.

Tablica 2. R_f vrijednosti komponenti dobivenih TLC razdvajanjem smjese kokaina, kodeina, heroina, 6-monoacetilmorfina, morfina i kinina

KOMPONENTA	R_f
Kokain	0,80
Kodein	0,06
Heroin	0,06
6-monoacetilmorfin	0,06
Morfin	0,06
Kinin	0,06

5. Zaključak

Kromatografija se razvila zahvaljujući svojoj brzini, relativno niskoj cijeni pojedine analize i jednostavnosti njene provedbe te mogućnosti istovremene primjene za separaciju i detekciju komponenti. Omogućava analizu širokog spektra tvari, kao i analizu nepoznatih uzoraka što ju čini izrazito korisnom prilikom analize droga čije se podrijetlo i sastav najčešće tek moraju otkriti. Jer kada se kromatografska separacija spoji s prikladnim i osjetljivim detektorom, kromatografi su sposobni obavljati visoko efikasne kvalitativne i kvantitativne analize.

Kroz dosadašnju primjenu, kromatografske tehnike pokazale su se vrlo osjetljivima i prikladnima za analizu psihoaktivnih supstanci te se njima dobivaju izvrsni rezultati. Danas je kromatografija najraširenija tehnika za analizu psihoaktivnih tvari, no njen potencijal zasigurno nije do kraja iskorišten. Težnja za njenim daljnjim razvijanjem i usavršavanjem u smislu poboljšanja separacije i detekcije povećat će i njen potencijal na području analize psihoaktivnih supstanci. S druge pak strane, svakodnevna pojava novih droga, generira nove izazove i samim time zahtijeva daljnji razvoj kromatografskih tehnika.

6. Literatura

1. *Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga*, Narodne Novine 10/2016, 258
(http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016_01_10_258.html, pristupljeno 19. kolovoza 2017.)
2. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 4. izd., Pharmaceutical Press, London, 2011.
3. H.M. Maurer, *Sistematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography- mass spectrometry*, Journal of Chromatography **580** (1992) 3–41
4. H.M. Maurer, *Liquid chromatography–mass spectrometry in forensic and clinical toxicology*, Journal of Chromatography B **713** (1998) 3–25
5. https://www.sciencedaily.com/terms/psychoactive_drug.htm (pristupljeno 21. lipnja 2017.)
6. United Nations Office on Drugs and Crime, *Multilingual Dictionary of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances under International Control, Explanatory Notes and Part One*, United Nations Publication, New York, 2006.
7. <http://www.emcdda.europa.eu/> (pristupljeno 24. lipnja 2017.)
8. A.L. Danforth, C.M. Struble, B. Yazar-Klosinski, C.S. Grob, *MDMA-assisted therapy: A new treatment model for social anxiety in autistic adults*, Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry **64** (2016) 237–249
9. B. Sessa, *MDMA and PTSD treatment: “PTSD: From novel pathophysiology to innovative therapeutics”*, Neuroscience Letters **649** (2017) 176–180
10. <https://drogeiovisnosti.gov.hr/> (pristupljeno 24. lipnja 2017.)
11. K. Bachi, V. Mani, D. Jeyachandran, Z.A. Fayad, R.Z. Goldstein, N. Alia- Klein, *Vascular disease in cocaine addiction*, Atherosclerosis **262** (2017) 154–162
12. B. Bowser, R. Fullilove, C. Word, *Is the New Herion Epidemic Really New? Racializing Heroin*, Journal of the National Medical Association **109** (2017) 28–32
13. M.J.E. Loflin, K.A. Babson, M.O. Bonn-Miller, *Cannabinoids as therapeutic for PTSD*, Current Opinion in Psychology **14** (2017) 78–83
14. M.B. Amar, *Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential*, Journal of Ethnopharmacology **105** (2006) 1–25

15. D.J. Rog, *Cannabis-based medicines in multiple sclerosis – A review of clinical studies*, *Immunobiology* **215** (2010) 658–672
16. F. Gonzalez- Rosales, D. Walsh, *Intractable nausea and vomiting due to gastrointestinal mucosal metastases relieved by tetrahydrocannabinol (Dronabinol)*, *Journal of Pain and Symptom Management* **14** (1997) 311–314
17. A. Mead, *The legal status of cannabis (marijuana) and cannabidiol (CBD) under U.S. law*, *Epilepsy & Behavior* **70** (2017) 288–291
18. <http://www.marinol.com/> (pristupljeno 14. srpnja 2017.)
19. B. Mills, A. Yepes, K. Nugent, *Synthetic Cannabinoids*, *The American Journal of the Medical Sciences* **350** (2015) 59–62
20. J. Znaleziona, P. Ginterová, J. Petr, P. Ondra, J. Ševčík, J. Chrastina, V. Maier, *Determination and identification of syntetic cannabinoids and their metabolites in different matrices by modern analytical techniques- a review*, *Analytica Chimica Acta* **874** (2015) 11–25
21. M. Kelek, M. Kudumija Slijepčević, Z. Puharić, R. Kiralj, T. Salaj, *Liječenje benzodiazepinima i potencijalno ovisničko ponašanje*, *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* **12** (2016) 36–39
22. D.A. Skoog, D.M. West, J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, 1. izd., Školska knjiga, Zagreb, 1999.
23. J.M. Miller, *Chromatography Concepts and Contrasts*, 2.izd., Wiley, New Jersey, 2009.
24. T. Bolanča, Š. Ukić, *Ionska kromatografija*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.
25. G. Zweig, J. Sherma, *Handbook of Chromatography, General Data and Principles*, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton Florida, 1972.
26. <http://www.chromatographer.com/gas-chromatography/> (pristupljeno 16. srpnja 2017.)
27. M. Trojanowicz, *Recent developments in electrochemical flow detections—A review, Part II. Liquid chromatography*, *Analytica Chimica Acta* **688** (2011) 8–35
28. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija, I. dio*, 9. izd, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
29. L.K. Thompson, E.J. Cone, *Determination of Δ^9 - tetrahydrocannabinol in human blood and saliva by high- performance liquid chromatography with amperometric detection*, *Journal of Chromatography* **421** (1987) 91–97

30. K. McFadden, J. Gillespie, B. Carney, D. O'Driscoll, *Development and application of a high- performance liquid chromatography metoda using monolithic columns for the analysis od ecstasy tablets*, Journal of Chromatography A **1120** (2006) 54–60
31. A. Sperling, *Determination of heroin and some common adulterants by capillary gas chromatography*, Journal of Chromatography **538** (1991) 269–275
32. D. Borrey, E. Meyer, W. Lambert, C. Van Peteghem, A.P. De Leenheer, *Simultaneous determination of fifteen low- dosed benzodiazepines in human urine by solid- phase extraction and gas chromatography- mass spectometry*, Journal of Chromatography B **765** (2001) 187–197
33. T.R. Fiorentin, F.B. D'Avila, E. Comiran, A. Zamboni, J.N. Scherer, F. Pechansky, P.E.M. Borges, P.E. Fröhlich, R.P. Limberger, *Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users*, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **86** (2017) 60–66
34. J. Paul, F. Conine, *Rapid Thin-Layer Chromatographic Separation of Cocaine from Codeine, Heroin, 6-Monoacetylmorphine, Morphine and Quinine on Microscope Slides*, Microchemical Journal **18** (1973) 142–145

Životopis

Viktorija Prevarić [REDACTED] Osnovnu školu pohađala je u Vrbovcu, te paralelno uz nju osnovnu glazbenu školu pri POU Vrbovec. 2010. godine upisuje opću gimnaziju u Zagrebu (VI. gimnazija) i srednju glazbenu školu Glazbenog učilišta Elly Bašić u Zagrebu za zanimanje glazbenik teoretičar. Maturirala je 2014. godine u obje srednje škole. Studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine. Nakon završene druge godine studija odradila je stručnu praksu u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ (služba kemijsko-fizikalnih i toksikoloških vještačenja, odjel Forenzične toksikologije).