

## Fizičko-hemijske metode u otkrivanju sintetičkih (dizajniranih) droga

Razvoj na polju psihoaktivnih supstancija doveo je do velike primene fizičko-hemijskih metoda u njihovom otkrivanju i karakterizaciji. Na primjer, 2014. godine 101 nova supstanca je identifikovana u Evropi od strane Evropskog centra za monitoring droga i zavisnosti od droga. Za opisivanje ovih supstancija koriste se različiti izrazi koji mogu imati i po nekoliko definicija. Izrazi kao što su „dizajnerske droge“, „nove psihoaktivne supstancije“, „nove sintetičke droge“ i drugi se koriste godinama kako bi se opisale nove supstancije koje se nalaze na nelegalnom tržištu, a svojim efektima dovode do promene u psihičkom i fizičkom stanju pojedinca. Dizajnerske droge nastaju kao lekovi ili droge koje zaobilaze postojeće pravne procedure a da pri tome zadržavaju efekte kontrolisanih psihoaktivnih supstancija. Pored ovih izraza, često se sreću i oni koje koriste kupci ili prodavci najčešće na internetu. Izrazi kao što su „tablete za žurke“ („party pills“) i „legalni ekstrazi“ („legal ecstasy“) su zamenjeni sa „legalne visine“ („legal highs“). Izrazi kao što su „hemikalije za istraživanje – nije za ljudsku upotrebu“ („research chemicals – not for human consumption“), „prehrana za biljke“ („plant food“), „soli za kupanje“ („bath salts“) i „hemikalije za čišćenje bazena“ („pool cleaner“) ukazuju na prodaju hemikalija, ali iz samih naziva nije jasno o kojim se hemikalijama radi. Kupovinom ovakvih supstancija preko interneta treba imati u vidu da pakovanja i oblik mogu biti identični ali da se može značajno razlikovati sadržaj ili samo aktivna komponenta. Prikom analize dobijenih uzoraka treba obratiti pažnju da ne sadrže sve tablete „ekstazija“ MDMA i drugo, već da se prilikom forenzičkih istraživanja polazi od pretpostavke da se u tabletama mogu nalaziti i druge supstancije. Istraživanje ne treba da se zasniva na pretpostavci da oblik i veličina pakovanja ili deklaracija zaista označavaju ono što se nalazi u uzorku. Pakovanje „proizvoda od biljaka“ može sadržati zaista sintetičke kanabinoide, ali zbog postojanja velikog broja ovih supstancija nije samo na osnovu imena jasno koji mogu da budu prisutni. Ovo je posebno izraženo prilikom dobijanja belog praha koji je označen ili ne kao „hemikalija za istraživanje“) za koje je u današnjim uslovima malo verovatno da su ketamin ili kokain. Sa dostupnošću informacija u vidu radova, patenata ili uputstava na internetu, sve je veći broj laboratorija koje proizvode veoma čiste psihoaktivne supstancije koje se kasnije distribuiraju. U određenim situacijama mešanje dve ili više vrsta psihokativnih supstancija je moguće zbog želje da se izazovu različiti efekti.

Analiza psihoaktivnih supstancija je veliki izazov za toksikologe, hemičare i fizikohemičare. Ovo je posebno istaknuto kada se analiziraju složeni biološki uzorci kao što su urin, krv i kosa. Najčešće korišćene metode uključuju precizne metode masene spektrometrije, gasnu hromatografiju sa masenom spektrometrijom, tečnu hromatografiju sa masenom spektrometrijom i tečnu hromatografiju sa ulj-vid detektorom. Tradicionalne tehnike koje uključuju imunoelektrode nisu preterano korisne zbog toga što nisu razvijene za detekciju novih supstancija, a i pravljenje ovih traka bi bilo nepraktično kada je potrebno isključiti veliki broj komponenti. Ciljano traženje određenih komponenti je značajno kada se pretpostavlja koje su supstancije prisutne u uzorku, ali se često dešava da ovakve analize ne mogu da uključe veći broj supstancija, pa samim tim nove supstancije ne mogu ni biti dokazane. Važan aspekt je i granica detekcije koja treba da bude sve niža sa razvojem droga koje su vrlo potentne i koje u maloj dozi daju veoma istaknute efekte. Treba imati u vidu da se „identifikacija“ supstancija u uzorku zasniva uvek na poređenju sa bazom podataka kroz analizu spektara ili hromatograma, dok se „preliminarna detekcija“ radi sa nepoznatim supstancijama kada se po prvi put otkriju kroz skrining. Prema tome, apsolutna identifikacija zahteva referentnu supstanciju. Nedostatak standarda onemogućava identifikaciju ili kvantifikaciju. Metabolički putevi koje supstancije prolaze dodatno otežavaju zadatak forenzičkih toksikologa. Mnoge supstancije, zavisno od metaboličkog puta, prolaze izvesne promene najčešće u jetri ili su nestabilne u krvi ili urinu (na

primer mefedron). Stabilnost supstancija je zbog toga važan faktor koji treba uzeti u obzir prilikom povezivanja koncentracije u biološkim uzorcima sa unetom dozom.

Još od početka razvoja sintetičkih droga (derivati fentanila krajem 1970e) bilo je jasno da se razvoj „dizajnerskih droga“ zasniva najviše na modifikaciji struktura dodavanjem ili promenom supstituenata već poznatih aktivnih molekula. Ovim načinom se dobija mnoštvo novih struktura pri čemu male promene strukture mogu dovesti do značajnih promena u efektima koji nastaju. Ovo je takođe važno i zbog toga što male promene u strukturi mogu da odedu supstanciju isključe sa liste kontrolisanih supstancija. Iako efekti ovih supstancija mogu imati različite neurofiziološke osnove, generalna podela je na stimulanse, halucinogene i sedative. Prikazana podela značajno pojednostavljuje realnu sliku zbog toga što supstancije mogu imati niz efekata koji ih svrstava u više od jedne kategorije. U nastavku je prikazano nekoliko osnovnih klasa novih dizajnerskih droga sa posebnim osvrtom na dozu, način unošenja, efekte i toksičnost.

### **Amfetamini/Feniletilamini**

Feniletilamin (2-feniletilamin) je prirodna supstancija koja se koristi kao osnova za dobijanje velikog broja supstancija. Mnoge od „dizajnerskih droga“ nastaju modifikacijom ove supstancije. Metodologija sinteze i efekti velikog broja feniletilamina su opisani u knjizi „PiHKAL“ autora Šugin i Šugin, pri čemu je naslov akronim od „Feniletilamini koje sam poznao i voleo“ („Phenylethylamines I Have Known and Loved“). Amfetamin (metilfeniletilamin) je dostupan kao Dexedrine koji predstavlja lek na recept koji se koristi za lečenje narkolepsije i hiperkinetički poremećaj (hiperaktivni poremećaj nedostatka pažnje, „attention deficit and hyperactivity disorder“ – ADHD) kod dece. Ima nekoliko naziva u uličnoj prodaji među kojima su „spid“, „baza“ i drugi. Prah amfetamina se najčešće unosi u organizam gutanjem, ušmrkavanjem ili nanošenjem na desni. Poznato je i da se može unositi intravenski zajedno sa heroinom. Produženo korišćenje amfetamina dovodi do psihoza i paranoje.

Droga povezana sa amfetaminom je i njegov derivat metamfetamin koji je vrlo popularan u određenim zemljama Azije i Sjedinjenih američkih država, ali ne toliko u Evropi. Ovo je veoma potentno jedinjenje koje dovodi do zavisnosti. Unosi se gutanjem, ušmrkavanjem ili pušenjem. Česti ulični nazivi su „kristal met“, „ajs“ i „krank“. Manje aktivni enantiomer metamfetamina (L-metamfetamin) ulazi u sastav određenih zdravstvenih proizvoda kao što su kapi za nos zato što ima efekta na proširenje disajnih puteva.

3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA) je vrlo popularna psihoaktivna supstancija posebno među populacijom koja prisustvuje različitim žurkama ili festivalima od 1980tih godina. Poznata je i pod uličnim nazivom „ekstazi“. Postoji veliki broj oblika, veličina i oznaka na tabletama koje sadrže različite količine ove aktivne supstancije. U tabletama pored MDMA se mogu naći i amfetamin, ketamin, efedrin i kafein koji dodatno pospešuju efekte MDMA-e. Različite tablete imaju obično utisnute oznake ili se proizvode u različitim oblicima koji ukazuju na količinu aktivne supstancije.

Kao što je prethodno napomenuto, veliki problem prilikom analize novih psihoaktivnih supstancija, a posebno amfetamina je u tome što se vrlo retko nalaze samostalno u uzorcima. U tablete se dodaju punioci (glukoza, saharoza), farmaceutski proizvodi (kafein, efedrin, paracetamol) i druge psihoaktivne supstancije. Pored toga, i u psihoaktivnim supstancijama starije generacije (MDMA, ketamin, kokain, amfetamin) se takođe mogu naći novi feniletilamini. Ovo dodatno usložnjava analizu i izbor metode kako bi se na pravi način analizirala složena smeša.

Feniletilamini se najčešće nalaze u obliku tableta ili praška, ređe kao tečnosti. Zbog ovog oblika oni se najčešće ušmrkavaju ili unose oralnim putem. Ove supstancije se retko unose pušenjem, mada postoje opisani takvi načini posebno među internet zajednicom. Tablete ekstazija obično sadrže od 80 do 160 mg MDMA-e, ali je ovo promenljivo zavisno od lokacije i načina proizvodnje. Derivati feniletilamina koji se ponašaju kao halucinogeni su češće prisutni u manjim koncentracijama. Mnogi efekti zavise od doze, tako da je ovo važno uzeti u obzir prilikom analize. Tablete ekstazija svojim oblikom i bojom često označavaju količinu prisutne aktivne komponente, ali ovo nije pravilo i pri svakoj analizi treba ispitati detaljno količinu.

Feniletilamini su po prirodi stimulasni (amfetamin) sa efektom euforije (MDMA). Neko od njih imaju i halucinogene efekte (2-(4-bromo-2,5-dimetoksifenil)etilamin, 2C-B). Mehanizam delovanja ovih supstancija je komplikovan i utiče na monoaminski sistem u organizmu, posebno serotonin i dopamin, odnosno menja otpuštanje, preuzimanje ili prenos ovih neurotransmitera. Toksični efekti feniletilamina mogu biti individualni, odnosno mogu pogaćati neke pojedince više od drugih. Neki od feniletilamina imaju odloženo dejstvo (4-MTA, PMA ili PMMA) što olakšava intoksikaciju zbog unošenja većeg broja doza pre nego što postoji efekat. Ovo je posebno opasno zbog toga što postoji kumulativni efekat koji može biti fatalan po organizam. Negativni efekti mogu biti vrtoglavica, povraćanje, glavobolja, tahikardija i drugo. Korišćenje feniletilamina može takođe dovesti do pogoršanja već postojećih srčanih problema, kao i do takozvanog „serotoninskog sindroma“ odnosno povišenja telesne temperature i nevoljnog pokretanja zglobova ili vilice. Povišenje telesne temperature uz povećanu fizičku aktivnost na festivalima ili žurkama zahteva konstantnu rehidraciju i posledično izlučivanje tečnosti što smanjuje koncentraciju elektrolita, posebno natrijuma. Pored toga, halucinacije (audio ili vizuelne) takođe mogu biti odgovorne za povrede.

### **Piperazini**

Piperazin se koristi kao agens protiv parazitskih crva u organizmu, ali se derivati piperazina zloupotrebljavaju poslednjih 15 godina zbog svog stimulatornog efekta. Najčešće korišćeni su benzilpiperazin (BZP) i različiti derivati fenilpiperazina (trifluorometilfenilpiperazin (TFMPP) i m-hlorofenilpiperazin (mCPP). Neki od njih imaju i halocinogene osobine. Iako su mnogi od njih kontrolisane supstancije, piperazini se smatraju „legalnim ekstazijem“, „legalnim podizačem“ ili „biljnim ekstazijem“ i kao takvi se nalaze u tabletama kako bi oponašali pravi ekstazi. U najvećem broju prijavljenih smrtnih slučajeva nakon korišćenja piperazina smrt je nastupila zbog nekog drugog razloga ili zbog korišćenja većeg broja droga, sem u slučajevima predoziranja koje je imalo za posledicu fatalnu koncentraciju ovih supstancija u krvi. BZP je sintetički simpatomimetički agens koji se proizvodi od piperazina i 1970tih je ispitivan kao lek protiv depresije. Ali je ubrzo primećeno da izaziva euforiju i stimulaciju CNS slično amfetaminima, tako da je isključen iz dalje upotrebe. Tokom perioda kada je bio legalno dostupan, BZP je bio vrlo često zloupotrebljavana supstancija. Tokom 2004. godine njegova upotreba nije u potpunosti zabranjena i bio je dostupan korisnicima starijim od 18 godina. Takođe, bilo je zabranjeno reklamirati, pakovati i označavati ovu supstanciju, uz obavezno naglašavanje svih nuspojava. U aprilu 2008. godine zvanična služba za analizu psihoaktivnih supstancija je označila BZP i njegovih pet analoga (TFMPP, mCPP, p-fluorofenilpiperazin (pFPP), p-metoksifenilpiperazin (MeOPP) i 1-benzil-4-metilpiperazin (MBZP) i njihve analoge. Proizvođači i korisnici su smatrali da ovakva zabrana može smanjiti broj korisnika mnogo opasnijih supstancija kao što su amfetamini. Nakon zabrane, primećen je i smanjen broj korisnika prvenstveno zbog manje dostupnosti.

Piperazini se na tržištu nalaze u vidu prahova ili tableta i unose se oralno u organizam. Drugi načini unošenja uključuju ušmrkavanje ili injektovanje, ali su oni mnogo ređi. Tablete obično sadrže od 50 do 200

mg, ali postoje i značajne razlike zavisno od proizvoda. Ove supstancije u mozgu stimulišu otpuštanje i prečavaju preuzimanje dopamina i serotonina i rede noradrenalina. Piperazini imaju slabije dejstvo od MDMA-e, metamfetamina i amfetamina. Korisnici osećaju blage stimulatorne efekte, srednju euforiju i halucinacije. TFMPP se često koristi zajedno sa BZP kako bi se postigao entaktogeni efekat (efekat emocionalne bliskosti sa drugim osobama, emocionalne otvorenosti i osećaja zajednice) kao kod MDMA-e. Složene nuspojave su moguće prilikom korišćenja većeg broja piperazina ili mešanjem sa amfetaminima. Uznemirenost, tahikardija i vrtoglavice su česte uz glavobolju, znojenje, ubrzan rad srca i povišenje krvnog pritiska.

## **Triptamini**

Najčešće korišćeni triptamini dimetiltriptamin (DMT),  $\alpha$ -metiltriptamin (AMT), dietiltriptamin (DET), 5-metoksi-N,N-diisopropiltriptamin (5-MeO-DiPT), dipropiltriptamin (DPT) i derivati N,N-dialiltriptamina. Ove supstancije se dobijaju iz biljaka ili sintetišu direktno. Ekstrakti biljaka se ušmrkavaju ili puše, zbog toga što generalno nisu aktivni ukoliko se unose oralno. Alternativno, moguće su i tečne mešavine. Kao i kod feniletilamina, eksperimenti koji su uključivali dobijanje velikog broja derivata triptamina su objavljeni u knjizi „TiHKAL“ (Triptamini koje sam poznao i voleo – Triptamines I have known and loved). Komponenta sa sličnom strukturom je psilocibin koji je deo „magičnih pečurki“ koji ima halucinogeni efekat kao i ostali triptamini.

Triptamini su dostupni u obliku prahova ili pastila, ali i u tečnoj mešavini. Najčešće se unose ušmrkavanjem ili pušenjem, zbog toga što se prilikom oralnog konzumiranja veći deo razgradi u jetri uz enzim monoamin oksidazu. Deo korisnika namerno meša triptamine sa monoamin oksidazom kako bi se pojačala njihova aktivnost. AMT se ponaša prirodno kao inhibitor ovog enzima što može predstavljati opasnost po organizam kada se unosi zajedno sa drugim triptaminima, čime se onemogućava njihova razgradnja. Zbog različitih načina unošenja, triptamini se obično u tabletama nalaze u širokom opsegu koncentracija (od 1 do 400 mg). Zbog sličnosti sa serotoninom (5-hidroksitriptamin), triptamini značajno utiču na serotonininske puteve u mozgu, ali i na dopaminske i noradrenalinske sisteme. Efekti su halucinogeni i psihodelični (odnosno pojačani auditorni i vizuelni), pre nego stimulatorni. AMT takođe može proizvesti efekat euforije sličan amfetaminima. Početak delovanja je odložen 3-4 sata, ali je zato efekat trajan (12-14 sata). Fizički efekti uključuju blagi porast krvnog pritiska, disanja, tahikardiju, povraćanje, nekontrolisane pokrete, promenu u audiovizuelnom posmatranju. Pušenje triptamina može izazvati iritacije grla i pluća, anksioznost, konfuzije i glavobolju. Većina triptamina ne izaziva efekte na kardiovaskulatorni sistem, iako su oni mogući (kod korišćenja AMT). Veći problem kod korišćenja su halucinogeni efekti koji mogu dovesti do povreda ili promena ponašanja. Mešanje triptamina sa monoamin oksidazom takođe povećava rizik od intoksikacije. Halucinogeni efekti zavise prvenstveno od mesta na kome se konzumira droga, ali i od trenutnog emocionalnog stanja.

## **Katinoni**

Katinoni su po svojoj strukturi beta-ketonski oblici amfetamina (odnosno u strukturi imaju dodatni kiseonikov atom). Zajedno sa katinom (norpseudoefedrin), mogu se naći u khat lišću (iz biljke Catha edulis) u Istočnoj Africi i Arabiji. Kao i kod feniletilamina, katinon se može koristiti kao polazna supstanca za sintezu većeg broja različitih derivata kao što su metkatinon (analog metamfetamina) i metilona (3,4-metilendioksimetkatinon) (analog MDMA-e). Veliki broj derivata katinona je sada na listi kontrolisanih supstancija, ali nisu svi. Legislativa takođe treba da uključi i veliki broj poznatih pozicionih izomera kao

što su 2-metilmetkatinon (2-MMC), 3-metilmetkatinon (3-MMC) i 4-metilmetkatinon (4-MMC). Iako su u početku prodavani kao hemikalije za istraživanje i razvoj, danas u brendirani kao „hrana za biljke“, „soli za kupanje“ i „hemikalije koje nisu za ljudsku upotrebu“. Neki od uličnih naziva su mau mau („meow meow“), top cat, ivory wave, i drugo.

Katinoni se najčešće nalaze u obliku praškova, a ređe u obliku tableta ili tečnosti. Kao takvi, unose se oralno ili ušmrkavanjem, ali je poznato i injektovanje. Srednje količine mefedrona su oko 1 g, ali drugi katinoni se koriste u mnogo nižim količinama, oko 20 mg. U nekim zemljama se MDMA zamenjuje katinonima zbog veće dostupnosti. Tablete su vizuelno identične tabletama Ekstrazija tako da korsnici često nisu svesni šta uzimaju. Predoziranja katinonima su česta zbog nemogućnosti da se pravilno odredi uneta količina, ali i nepoznavanje nečistoća ili prisutnih drugih psihoaktivnih supstancija dovodi do ozbiljnih efekta po zdravlje. Većina katinona ima stimulatorni efekat, mada su poznati i oni sa halucinogenim osobinama. Ove supstancije značajno utiču na otpuštanje i ponovno preuzimanje svih neurotransmitera. Efekti uključuju euforiju, povećanje energije, osećaj empatije, povećani libido, znojenje, tahikardiju, glavobolju i škrgutanje zubima. Korisnici takođe osećaju hiperaktivnost i razgovorljivost, i imaju proširene zenice. Agresivno ponašanje, psihoze, paranoja, insomnija, halucinacije i gubitak apetita su takođe primećeni. Osobe hospitalizovane nakon korišćenja ovih supstancija najčešće imaju ubrzani rad srca, kratak dah i povišeni pritisak. Smrt usred akutne toksičnosti je zabeležena, posebno uz korišćenje drugih droga. Zloupotreba katinona može biti povezana i sa samoubilačkim mislima.

### **Aminoindani**

Razvoj aminoindana (derivata 2-aminoindana) je počeo 1990tih godina od strane naučnika koji su proučavali serotoninске agoniste slične MDMA-i. Oni predstavlja potpuno sintetičke supstancije koje sadrže prsten nastao kondenzacijom lanca feniletilamina. Slični supstituenti su prema tome mogući. Aminoindani se prodaju preko interneta na isti način kao katinoni.

Aminoindani se prodaju u obliku prahova ili, ređe, tableta ili tečnosti. Obično se unose oralno ili ušmrkavanjem. Doze u kojima se unose su između 100 i 200 mg. Nalaze se kao beli prahovi i u početku su se prodavali kao „lažni kokain“. Aminoindani su kontrolisane supstancije u malom broju država. Ove supstancije imaju stimulatorni i euforični efekat, mada neki od njih izazivaju i halucinacije. Iako postoji malo podataka o njihovoj upotrebi, poznati su efekti euforije, povećanja energije, empatije, znojenja i tahikardije. Kao što je prethodno rečeno, aminoindani su selektivni agonisti serotoninских puteva, odnosno omogućavaju otpuštanje serotonina. Ovo može dovesti do „serotoninског sindroma“ koji karakteriše povišena temperatura, stisnuta vilica i napadi panike. Za sada nisu poznati fatalni slučajevi zloupotrebe.

### **Sintetički kanabinoidi**

9-Tetrahidrokanabinol je osnovna aktivna komponenta kanabisa koja je od 1970ih godina predmet istraživanja i modifikacije kako bi se dobili sintetički kanabinoidi ili farmaceutski proizvodi protiv mučnine i povraćanja nakon hemoterapije. Sintetički kanabinoidi se jače vezuju za receptore kanabionida CB1 nego CB2 u poređenju sa THCom. Primer je CP-47 497 koji je razvijen od strane Fajzera i 3-28 puta je jači od THCa. Drugi primeri su AM-2201, JWH-018, JHW-019, AM-2201-pMe i drugi. Sintetički kanabinoidi su zbog modifikacije strukture potpuni agonisti ovih receptora, dok je THC samo delimični. CB1 receptori su od značaja za euforični i psihoaktivni uticaj kroz delovanje na oslobađanje neurotransmitera, dok je CB2 uključen u kontrolu bola. Sintetički kanabinoidi nemaju značajniju upotrebu u medicini i 2008. godine su prvi put uočeni kao psihoaktivne supstancije koje se zloupotrebljavaju. Pakovanje „Začina“ („Spice“) je

sadržao sintetičke kanabinoide, a prodavao se preko interneta od 2006. godine. Nakon toga je broj proizvoda koji su ih sadržali naglo porastao uz različita imena. Korisnici ovih supstancija su najčešće korisnici THCa ali koji žele da budu negativni na testovima. Prvi sintetički kanabinoid koji je bio okarakterisan kao supstanca koja se zloupotrebljava je bio JWH-018, nazvan po Jonu W. Huffmanu koji ih je prvi sintetisao. Od 2008. godine postoji značajno povećanje broja sintetičkih kanabinoida grupisanih u „generacije“ odnosno grupe koje uključuju dodavanje halogenih elemenata ili atomskih grupa na isti skelet. Sada postoje stotine sintetičkih kanabinoida.

Pošto su u potpunosti sintetičke, ove supstancije se prodaju preko interneta kao „hemikalije za istraživanje“, ali pored toga mogu biti i u obliku proizvoda za biljke. Sintetički kanabionidi se nanose ili prskaju na biljke kako bi se omogućilo uživanje na sličan način kao kod marihuane. Ukoliko je supstanca dostupna kao beli prah, onda se može unositi oralno ili ušmrkavati. Na ovaj način postoji opasnost od predoziranja. Količina koja se obično unosi u organizam je oko 300 mg. Analiza proizvoda koji su sadržali sintetičke kanabinoide je pokazala da su oni prisutni od 1 mg po gramu do 400 mg po gramu. Za postizanje željenih efekata potrebno je 2 do 5 mg. Sintetički kanabionidi se koriste kako bi oponašali efekte kanabisa, odnosno postizanje opuštanja i promenu stanja svesti uz smanjenu koordinaciju pokreta. Poznati su i slučajevi povećanja agresivnosti i psihoza nakon korišćenja. U poređenju sa kanabisom, hospitalizovane osobe imaju jači rad srca, alucinacije i povećani pritisak, kao i bol u grudima i promene na EKGu. Do sada je mali broj slučajeva u kojima je uzrok smrti direktno korišćenje sintetičkih kanabinoida. Sve je veći broj slučajeva razvijanja tolerancije i prekidanja uzimanja sintetičkih kanabinoida. Efekti koji prate ovo su anksioznost, umor, drhtavica, insomnija, tahikardija, hipertenzija, glavobolja, vrtoglavica i promene u radu srca i krvnih sudova.

### **Metilheksanamin**

Sa zabranom drugih supstancija, metilenheksanamin (DMAA) je našao svoju upotrebu. Ova supstanca je patentirana 1944. godine kao na lek za smanjenje kongestije. Korišćenje DMAA zajedno sa velikim dozama kofeina je imalo stimulatorni efekat, tako da se često nalazio u sredstvima za pre treninga. Pored toga, DMAA je dovodio i do agresije, povraćanja, paničnih napada i paranoje. Originalno DMAA se nalazio u obliku praha koji se dodavao u tečnost i tako pio. Tablete za žurke koje su imale DMAA su ubrzo postale vrlo popularne i prodavale su se kao „podizači na bazi biljaka“ („herbal highs“) uz navođenje da su svi sastojci prirodnog porekla. DMAA se prirodno nalazi u ulju geranijuma. Tablete su bile različitih boja i oblika, uz pakovanje koje je izgledalo vrlo privlačno, uz sadržaj aktivne komponente od 50 mg do 5 g. Mala jačina ovih proizvoda (malo jači od čistog kofeina) je dovela do naglog smanjenja korišćenja.

### **NBOMe jedinjenja**

NBOMe jedinjenja se drugačije nazivaju „sintetički“ ili „legalni“ LSD. Ove supstancije predstavljaju analoge psihodeličnih feniletilaminskih droga. Označavaju se i kao 2C analozi zbog dva ugljenikova atoma između amino grupe i benzenovog prstena substituenta. Osnovni supstituent je N-metoksibenzil grupa koja je značajna za farmakološku aktivnost. NBOMe jedinjenja se najčešće prodaju kao listovi papira natopljeni ovim supstancijama (slično kao LSD). Dozu čini kvadratić od papira dimenzija 6-8 mm<sup>2</sup> koji se postavlja ispod jezika. Pored toga, ova jedinjenja se mogu naći i u obliku tableta, tečnosti ili praškova. Ove supstancije se ne ispituju rutinski, ali se mogu odrediti LC-MS/MS tehnikom. Efekti ovih supstancija uključuju halucinacije, euforiju, tahikardiju i hipertenziju.

### **Fenilciklidin**

## GBA

### Analiza psihoaktivnih supstancija

Kako toksikolozi znaju da je osoba rekreativno koristila droge? Postoje tri grupe simptoma koji mogu ukazati na intoksikaciju rekreativnim drogama:

- **Intoksikacija stimulansima** – uključuje hipertenziju, tahikardiju, povišenje telesne temperature, agresiju, znojenje, konvulzije, aritmije i bol u grudima kao kod korišćenja kokaina, MDMA-e i drugih stimulanasa na bazi amfetamina
- **Intoksikacija depresantima** – uključuje neurološku i usporenost disanja kao kod opioda, benzodiazepina, gama-butirata i njegovih analoga
- **Intoksikacija halucinogenima** – uključuje halucinacije, slabu agresivnost, slabu hipertenziju i tahikardiju kao u slučaju korišćenja ketamina i LSD-a.

Kada se nova psihoaktivna supstancija pojavi na tržištu efekti njene zloupotrebe najčešće nisu poznati iz studija na životinjama ili ljudima. Zbog toga se pristupa procesu triangulacije, odnosno prikupljanju podataka iz različitih izvora i njihovim međusobnim poređenjem. Izvori ovakvih informacija mogu biti internet sajtovi za prodaju, iskustva korisnika, diskusije na forumima i podaci iz nacionalnih toksikoloških laboratorija ili zdravstvenih ustanova. Svaki od ovih izvora ima svoje mane i zbog toga je od presudne važnosti detaljno ispitati izvore i uporediti podatke. Na osnovu ovakvih podataka je zaključeno da se efekti korišćenja novih psihoaktivnih supstancija mogu svrstati u jednu od tri prethodno pomenute kategorije. Postoji nekoliko zanimljivih primera iz prakse koji se odnose na analizu psihoaktivnih supstancija. Prvi je Check iT! projekat u Austriji u kome se praškovi ili tablete nađene ili kupljenje na velikim rečv žurkama mogu besplatno analizirati HPLC metodom, a rezultati se prikazuju javno pod brojem ili šifrom. Na ovaj način postoji pravovremena mogućnost da se ukaže pojedincima koji ih koriste ukoliko je nađena količina aktivne supstance opasna po zdravlje. Takođe, HPLC omogućava da se u uzorku detektuju i nove supstancije čiji efekti nisu poznati, iako je za detaljniju analizu potrebno iskoristiti i druge metode. Drugi projekat se sprovodi u Holandiji (Drug Information and Monitoring System Project) i uključuje veći broj laboratorija u kojima pojedinci mogu uraditi analize uzoraka koje koriste. Na taj način dobijaju informacije o čistoći, prisutnim aktivnim komponentama i poreklu. Ukoliko korisnici donesu tablete one se odmah vizuelno upoređuju sa dostupnim uzrocima iz baze. Nakon toga se uzorci analiziraju tankoslojnom hromatografijom, gasnom hromatografijom sa detektorom za azot i fosfor, gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom i NMRom. Na ovaj način se dobijaju informacije o dostupnim psihoaktivnim supstancijama na tržištu Holandije, supstancijama koje su popularne u datom trenutku, ali i o novim psihoaktivnim supstancijama. Kada se nove supstancije pojave na tržištu, moguće je anketirati pojedince koji sebe indentifikuju kao korisnike kako bi se dobile informacije o efektima koji se postižu. Primer je 4-fluoroamfetamin (4-FA) koji su sadržale tablete za koje je većina korisnika mislila da su MDMA. Anketiranjem 474 korisnika koji su pronađeni na internet forumima dobijeni su izveštaji o željenim i neželjenim efektima. Kroz statističku obradu podataka moguće je dobiti informacije o najčešće korišćenim novim psihoaktivnim supstancijama. Za sada ne postoji obavezan skrining na psihoaktivne supstancije kada se pojedinci jave u bolnicu. Većina ovih pacijenata biva otpuštena u roku od nekoliko sati bez uzimanja uzoraka za analizu. Često se samo na osnovu efekata pretpostavi o kojoj klasi supstancija je reč, bez detaljne analize. Najčešće korišćeni testovi za pojedince za koje se smatra da su intoksikovani

psihoaktivnim supstancijama su testovi urina zasnovani na imunoesejima. Problem kod ove vrste testova je veliki broj lažno pozitivnih rezultata zbog krosreakcije lekova koji su dobijeni na recept i psihoaktivnih supstancija. Takođe, deo testova je zasnovan na određivanju prisustva metabolita, a ne same supstancije što ne mora biti povezano sa trenutnim stanjem pacijenta. Zbog toga je velika važnost u skriningu uzoraka pacijenata na prisustvo psihoaktivnih supstancija kako bi se na licu mesta povezali simptomi sa uzetim supstancijama. Takođe, ovi rezultati se mogu povezati sa rezultatima dobijenim pretragom interneta ili na osnovu razgovora sa korisnicima. Na ovaj način se mogu proveriti podaci dobijenim na osnovu samoprocene korisnika i odrediti liste nuspojava nastalih zloupotrebom psihoaktivnih supstancija.

Analiza psihoaktivnih supstancija je veoma komplikovana kada se posmatra polje forenzičke toksikologije. Pominjanje novih psihoaktivnih supstancija se najčešće dešava prvi put od strane korisnika, prodavaca ili očevidaca. Ali prilikom analize ne treba pretpostavljati da se određeno ime vezuje samo za jednu supstanciju. Proizvod treba analizirati kako bi se odredio pravi sadržaj. Nepoznavanje sadržaja je podjednako opasno i za korisnike zbog toga što i primese nekih supstancija mogu imati značajne efekte. Ušmrkavanje belog praha pod pretpostavkom da je mefedron a u stvari je 25I-NBOMe (novi sintetički halucinogen) može dovesti do predoziranja. Ukoliko ne postoje direktni dokazi, istorija korišćenja ili očigledne indikacije koja supstancija je u pitanju, ne treba donositi prevremene zaključke, odnosno isključivati mogućnost da u uzorku budu prisutne i druge aktivne komponente. Prilikom analize telesnih tečnosti kod osoba koje su koristile psihokativne supstancije, njihovo ponašanje može ukazati na određene grupe komponenti.

Analiza na psihoaktivne supstancije treba da bude sastavni deo prilikom istraživanja bilo kog zločina, posebno ukoliko je uključena vožnja, seksualno napastvovanje, ubistvo i drugo. Obično se radi ili targetirana analiza ili netargetirana, zavisno da li postoji jasna indikacija o tome koja je supstancija korišćena. Targetovano istraživanje se koristi kada se sumnja na korišćenje najčešćih psihoaktivnih supstancija ili koje su često prisutne u malim koncentracijama. Ali zbog razvoja novih supstancija svakodnevno, netargetovano ispitivanje bi trebalo da postane češće. Među metodama koje se koriste treba istaći masenu spektrometriju visoke rezolucije koja omogućava dobijanje molekulske formule i strukture supstancije. Hromatografsko razdvajanje najčešće prethodi ovoj analizi, dok se za razdvajanje izomera mogu koristiti razlike u odnosima prisutnih jona ili uv spektrofotometrija. IC i NMR nemaju mnogo značaja u ovim analizama.

Prilikom rada sa psihoaktivnim supstancijama treba imati u vidu da njihovo korišćenje nije evolucija i konstantna promena strukture, već načina korišćenja, odnosno da se neke od supstancija mogu ponovo naći na tržištu. Primeri su p-metoksiamfetamin (PMA) i p-metoksimetilamfetamin (PMMA) koje su se pojavile 1970tih i 1990tih kada su bile u tabletama označenim kao „Ekstazi“. Prethodnih nekoliko godina prisutan je porast korišćenja ovih supstancija. Dokazivanje prisustva supstancije, odnosno njena kvantifikacija zahteva postojanje standarda. Ovo je još jedan od izazova zbog nepostojanja kompanije koja proizvodi standard za ispitivanu supstanciju, posebno ukoliko je nova na tržištu. Zbog toga je pregled literature, odnosno analiza koju su uradili naučnici i objavili važna.

Iako analitičke metode danas omogućavaju da se odrede koncentracije supstancija u krvi, vrlo je teško određenu upotrebu okarakterisati kao „rekreativnu“ ili „prekomernu“. Ovo je jedino moguće sa lekovima koji se izdaju na recept i kod kojih su poznate količine unetih supstancija. Pitanje prekomernog unošenja psihoaktivne supstancije je važno kada se određuje uzrok smrti. Takođe, nedostatak informacija o farmakološkom dejstvu novih supstancija dodatno otežava anлізу. Ukoliko nema drugih razloga koji bi



doveli do smrti kao ni prisustva psihoaktivnih supstancija koje mogu izazvati neke teže efekte, onda nove psihoaktivne supstancije mogu biti glavni uzrok. Pored ovoga treba biti i svestan svih faktora koji dovode do smanjenja koncentracije supstancija u krvi kao što su metabolički putevi ili nestabilnost. Psihoaktivne supstancije mogu biti prisutne u krvi i iz drugih izvora kao što su lekovi za Parkinsonovu bolest ili antidepresanata.

## **Bojene reakcije**

Prethodno je opisano da je boja supstance posledica elektronskih prelaza i rasporeda elektronske gustine. Vidljiva oblast obuhvata talasne dužine od 350 do 750 nm, i usled apsorpcije zračenja određene talasne dužine ljudsko oko registruje boju kao mešavinu ostalih talasnih dužina. U slučaju apsorpcije crvene svetlosti (750 nm) objekat je registrovan kao zelen. Svaka promena strukture dovodi do promene u talasnoj dužini apsorbovane svetlosti. Zbog toga se u ispitivani uzorak dodaju reagensi koji specifično reaguju sa određenim klasama psihoaktivnih supstanci čime se menja njihova struktura ili mogući elektronski prelazi. Boja nastalog proizvoda je uvek različita od boje polaznih supstanci ukoliko se reakcija dešava. Većina droga je prašak bele boje, tako da se ove promene boje jasno uočavaju. Postoje četiri mehanizma na osnovu kojih se dešava promena boje. To mogu biti prelaz elektrona sa ispitivanog jedinjenja na reagens, prelaz elektrona sa reagensa na ispitivano jedinjenje, nastanak novog jedinjenja od reagensa i ispitivane droge, kao i nastanak nove strukture spajanjem većeg broja molekula ispitivane droge usled prisustva reagensa. Pored dodatka osnovnog reagensa, i drugi uslovi kao što su kiselost ili baznost sredine, prisustvo drugih supstanci, koncentracija i redosled dodavanja supstanci mogu uticati na boju i njen intenzitet. Bojeni testovi nisu specifični za određene droge, već za klase organskih molekula kojima one pripadaju. Zbog toga se ne koriste za potpuno dokazivanje prisustva, već kao preliminarni test koju ukazuje na potrebu daljih ispitivanja. Ne reaguju sve droge koje se često nalaze u uzorcima na bojene reakcije. Na primer, velika klasa novih psihoaktivnih supstanci u koju spadaju triptamin i njegovi derivati, kao i gama-hidroksibutirat nemaju reagentse koji daju karakteristične boje ili su postupci analize mnogo komplikovaniji. Ali ovo ne utiče značajno na primenljivost testova i njihov značaj za forenziku.

Bojeni testovi se izvode vrlo jednostavno i obično uključuju samo dva ili tri koraka. Odabrani deo uzorak koji treba da na pravilan način predstavlja ispitivani uzorak se prenosi u epruvetu, Petrijevu šolju ili sahatno staklo kako bi se što bolje uočila promena boje. Na uzorak se nanosi kap reagensa i zapisuje se promena boje koja nastupa. Ukoliko je potrebno dodati više reagensa, boja se zapisuje nakon svakog dodatka. Reagentse treba proveravati nakon nekoliko korišćenja u cilju ispitivanja njihove ispravnosti. Prilikom odabira količine uzorka za analizu treba imati u vidu da su ovo destruktivne metode, tako da nije moguće ponavljati testove ili izvoditi nove na istom uzorku. Dokumentovanje rezultata je važan korak kako bi se osiguralo da prilikom veštačenja postoji jasan niz postupaka koji je doveo do rezultata. Dokumenta sadrže fotografije uzorka pre i nakon dodatka reagensa, fizičke osobine, upotrebljeno stakleno posuđe i reagentse. Samo navođenje pozitivnog ili negativnog rezultata treba izbegavati zbog toga što nema dovoljno informacija kojima se može odrediti validnost postupka. U nastavku je prikazano nekoliko najčešćih testova, kao i klasa droga čije se prisustvo može dokazati.

### **Mekeov (Mecke) test**

Mekeov reagens se dobija rastvaranjem 1% selenove kiseline u koncentrovanoj sumpornoj kiselini. Na sahatno staklo se postavlja 1 do 2 mg uzorka i nanosi se jedna kap reagensa. Ovaj test se može koristiti za dokazivanje većeg broja supstanci. Ljubičasta boja ukazuje na kodein, diazepam, flunitrazepam, oksikodon i metkatinon. Zelena boja dokazuje prisustvo opijata kao što su morfijum i heroin usled građenja ortohinona.

### **Markizov (Marquis) test**

Markizov test podrazumeva primenu dva reagensa. Prvi je koncentrovana sumporna kiselina, a drugi osam do deset kapi 37% formaldehida u 10 mL glacijalne sirćetne kiseline. Boja se zapisuje nakon dodatka oba reagensa. Markizov test se, takođe, koristi za veći broj čestih droga, posebno amfetamina i alkaloida. Narandžasta do braon boja je karakteristična za amfetamin, metamfetamin, meskalin i N,N-dimetilamfetamin. Ljubičastu boju daju alkaloidi, morfin, heroin i kodein, dok opijum ima promenu boje od braon i crvene do ljubičaste. MDMA i MDA daju karakteristične boje koje zavise od redosleda dodavanja reagensa i mogu biti zelena do crne kada se prvo dodaje reagens 2 ili ljubičasta do crne ako je dodat prvo reagens 1. Prilikom dodatka reagensa najčešće nastaju nova jedinjenja koja sadrže po dva osnovna molekula droge povezana formaldehidom. Za amfetamin i slična jedinjenja, proizvod je karbokation sa delokalizovanim  $\pi$ -elektronima.

### **Test sa koncentrovanom azotnom kiselinom**

Jednostavan test za dokazivanje prisustva morfina, kodeina i heroina jeste promena boje nakon dodatka koncentrovane azotne kiseline nakon dodatka nitro grupe u orto položaj aromatičnog prstena ovih supstanci. Pri ovom postupku dolazi do zatvaranja intramolekulskog prstena kroz vodoničnu vezu. Žuta boja je karakteristična za heroin, narandžasta za kodein i narandžasta do crvene za morfin.

### **Van-Urkov (Van-Urk) test**

Van-Urkov test se koristi za dokazivanje prisustva dietilamida lisergične kiseline (LSD), ali i supstanci koje sadrže indolni prsten kao što je triptofan. Reagens se dobija rastvaranjem 1 g para-dimetilaminobenzaldehida u 90 mL etanola nakon čega se dodaje 10 ml HCl. Dokazna reakcija za LSD ima ljubičastu boju, dok je plava boja karakteristična za triptofan, indole i pirole, a žuta za benzokain i prokain.

### **Dukeno-Levinov (Duquenois-Levin) test**

Navedeni test je u upotrebi kod dokazivanja THC-a u biljkama. Bilje se prvo suše i ispiraju petrol etrom (reagens 1). Nakon toga se u test dodaje reagens 2 (97,5 mL 2% rastvora vanilina u metanolu i 2,5 mL acetaldehida) i reagens 3 (koncentrovana hlorovodonična kiselina). U slučaju pozitivnog rezultata boja treba da bude ljubičasta. Dodatkom hloroforma (reagens 4) ljubičasta boja se prenosi u ovaj sloj, dok petrol etar ostaje bezbojan.

### **Dokazne reakcije za primarne, sekundarne i tercijarne amine**

Primarna i sekundarna amino grupa su karakteristične za veći broj klasa droga kao što su amfetamini, triptamini, katinona i aminoindana. Za primarne amino grupe reagens sadrži vodeni rastvor natrijum-nitroprusid (natrijum-nitroferocijanid) sa acetonom, dok se za sekundarne amino grupe umesto acetona nalazi acetaldehid. Nakon ovog reagensa dodaje se natrijum-karbonat u vodi. Plava boja se dobija i u prvom i u drugom slučaju. Test za sekundarne amine se može koristiti za pseudoefedrin, efedrin i ketamin. Tercijarni amini se dokazuju pravljjenjem rastvora kobalt(II)-tiocijanata u vodi uz dodatak HCl. Na ovaj način se mogu dokazati kokain baza, fenilciklidin i metadon kroz pojavu plave boje.

### **Hromatografija na papiru, tankoslojna hromatografija i tankoslojna hromatografija visokih performansi**

Hromatografija na papiru je najstarija od svih hromatografskih metoda, razvijena još u 19. veku. Stacionarnu fazu čini papir koji može, ali i ne mora biti, prethodno tretiran. Papir se sastoji od celuloze (polimera glukoze) koji ima veliku specifičnu površinu. Molekuli vode iz vazduha mogu dodatno biti adsorbovani na površinu papira. Proces adsorpcije predstavlja proces tokom kojeg se supstance vezuju za površinu, ali ne prolaze kroz površinski sloj. Za postupak razdvajanja potrebno je korsiti posudu za razvijanje koja obično

predstavlja staklenu posudu u kojoj se nalazi rastvarač za razvijanje. Zatvaranjem posude se postiže uravnoteženje porcesa između molekula u tečnoj fazi i onih gasovitoj, tako da se rastvarač ne gubi procesom isparavanja. Proces razdvajanja započinje postavljanjem ispitivane supstance i standarda na dno papira u vidu tačkica, nanošenjem zasićenog rastvora. Nakon toga se povlači crta grafitnom olovkom kako bi bila poznata početna tačka svih rastvora označenih brojevima ili slovima. Za zapisivanje oznaka uvek treba koristiti grafitnu olovku kako se ne bi desilo da supstance iz mastila počnu da se razdvajaju na papiru. Rastvori se nakon toga suše, a papir se unosi u rastvarač koji ne sme da prekrije tačkice. Usled postojanja kapilarnih sila, rastvarač biva uvučen u stacionarnu fazu i stiže do pojedinačnih uzoraka koji se u njemu razdvajaju. Interakcije sa stacionarnom fazom i rastvaračem uslovljavaju kretanje supstanci kroz stacionarnu fazu i njihovo razdvajanje. Osnovni postupak razdvajanja se zasniva na polarnosti ispitivane supstance, odnosno sto je supstanca polarnija duže će se zadržavati u polarnom rastvaraču. Postupak razdvajanja se završava nakon što rastvarač stigne do kraja papira, ali bi trebalo obratiti pažnju da rastvarač nikada ne stigne do kraja. Povlačenjem olovke se označava položaj fronta rastvarača. Ukoliko rastvarač nije obojen moguće je naparavati jod postavljanjem papira u posudu sa nekoliko kristala joda. Drugi način je posmatranje pločice pod Ulj svetlom. Tamnije mrlje na papiru označavaju mesta veće koncentracije ispitivane supstance.

Hromatografija na papiru je metoda kvalitativne i kvantitativne analize. Na osnovu broja tačaka koje nastaju razdvajanjem polaznih rastvora moguće je odrediti broj komponenti koje postoje u rastvoru i, ukoliko postoji standard, identifikovati supstance. Kvantitativni rezultati predstavljaju izračunavanje retencionog faktora dobijenog deljenjem dužine pređenog puta ispitivane supstance i rastvarača. Ukoliko se izvodi na standardan način, retenciono vreme je moguće uporediti i sa tablicama. Ovaj tip hromatografije se, takođe, može klasifikovati kao čvrsto-tečna hromatografija, zbog toga što se koristi čvrsta stacionarna faza i tečna mobilna faza.

Opisani princip razdvajanja korišćenjem hromatografije na papiru je identičan razdvajanju kod tankoslojne hromatografije, samo što se kao stacionarna faza umesto papira koriste pločice sa nanetim slojem alumijum-oksida ili silicijum-dioksida. Ovi materijali se nanose na osnovu od stakla ili plastike. Bezvodni alumijum-oksid jače adsorbuje molekule i koristi se za razdvajanje nepolarnih komponenti, ali i molekule ih klasa aldehida, etara i ketona. Za razdvajanje polarnih supstanci, češća je primena silicijum-dioksida. Neke od klasa molekula koje se mogu razdvajati uključuju alkohole, amine i karboksilne kiseline. Tankoslojnu hromatografiju karakterišu osetljivost, brzina i jednostavnost, kao i niska cena dobijena razvojem metoda za jeftinu proizvodnju pločica. Konzistentnost dobijenih rezultata je znatno poboljšana u odnosu na hromatografiju na papiru. Ova metoda je veoma značajna u forenzici zbog toga što omogućava dobijanje fotografije na kojoj se uočavaju tačke koje potiču od standarda određene droge i ispitivane supstance, kao i različitih dodataka koji postoje u tabletama ili tečnom uzorku.

Poboljšanje prethodno opisanih metoda je postignuto kod tankoslojne hromatografije visokih performansi (HPTLC). Ova metoda je od značaja zbog toga što se jednostavno mogu dobiti uzorci i fotografije koje se predstavljaju tokom suđenja. HPTLC karakterišu visok nivo automatizacije, skeniranja i jednostavna priprema uzorka, ali i mogućnost povezivanja sa drugim instrumentima, kao što je IC spektrometar. Razdvajanje supstanci se postiže na osnovu interakcija ispitivane supstance sa stacionarnom i mobilnom vazom, ali zavisi i od niza eksperimentalnih faktora kao što su pH, sastav mobilne i stacionarne faze, količina uzorka i drugo. Razdvajanje zavisi, takođe, od particionog koeficijenta koji definiše koncentraciju ispitivane supstance u stacionarnoj i mobilnoj fazi. Prevelika količina uzorka dovodi do povećanja brzine supstance nezavisno od particionog koeficijenta zbog nemogućnosti postizanja ravnoteže između ove dve faze. Kvantitativni parametar je i ovde reticioni faktor koji dodatno zavisi od vlažnosti, temperature, particionog koeficijenta, debljine stacionarne faze, sastava mobilne faze i drugo. Pored određivanja retencionog faktora, računa se i reticioni faktor u odnosu na standard.

Prilikom primene metode HPTLC automatizovan je svaki korak pripreme uzorka i analize, ali se i dalje svaki od njih izvodi pojedinačno. Uzorak i standard se unose u špriceve koji se postavljaju u instrument za automatsko dodavanje supstance na pločicu sa silicijum-dioksidom. Na taj način se osigurava da je uvek ista

količina uzorka dodata. Nakon toga se uzorak unosi u komoru za razvijanje u kojoj je zasićena para rastvarača. Komora se ostavlja 30ak minuta kako bi se postiglo zasićenje parom rastvarača. HPTLC se može podeliti na normalnu i reverznu, zavisno od polarnosti stacionarne i mobilne faze. Ukoliko je silicijum-dioksid iskorišćen bez promene površine, tada se u normalnoj HPTLC koristi nepolarni rastvarač. U sličaju kada je površina funkcionalizovana komponentama sa C18 ili C12 lancima potrebno je da odabrani rastvarač bude polaran. Prilikom pripreme uzorka, rukovanja pločicom i rastvaračima treba obratiti pažnju da se smanji mogućnost kontaminacije. Pločica stoji u komori za razdvajanje 10-25 minuta tokom kojih se vrši pomeranje fronta pojedinačnih komponenti. Kada je uzorak obojen, različite komponente se jednostavno mogu uočiti. Nakon razdvajanja, pločica se prenosi u komoru za posmatranje koja sadrži lampe različitih talasnih dužina kojima se može analizirati uzorak. Usled procesa fluorescencije, apsorpcije Ulj zračenja ili prisustva reagenasa za bojenje, na pločici se pojavljuju oblasti koje izgledaju različito i omogućeno je jednostavno vizuelno ispitivanje. Pored toga, skenerima može biti određen i intenzitet emitovane ili apsorbovane svetlosti. Obično se uzorak fotografiše pod Ulj zračenjem od 254 i 366 nm, kao i belim svetlom. Razdvajanje komponenti može da prati i dodatni korak derivatizacije kako bi se dobile dodatne informacije. Na primer, dodatak fluorescentnog agensa koji specifično reaguje sa odabranim jedinjenjima može ukazati na njihov položaj na pločici. Zbog toga što je HPTLC tip planarne hromatografije, pločice se mogu povezati i sa drugim instrumentima, kao što su IC ili MS spektrometri. Pri ovom povezivanju uzorak se dalje jednostavno analizira, na pločici može biti razdvojeno i do 70 supstanci, nema gubitka količina i drugo. Kod analize IC spektrometrom, merenja se rade merenjem intenziteta reflektovanog zračenja. Za povezivanje sa MS spektrometrom važno je koristiti jonizacije izvore koji mogu raditi pod atmosferskim pritiskom i sobnim uslovima. Jedna od takvih tehnika jonizacije je matriksom potpomognuta adsorpcija i desorpcija (MALDI). Ovakve tehnike se obično označavaju na osnovu detektora koji se koriste kao HPTLC-Ulj-Vid/MALDI-MS. Nakon desorpcije sa površine, uzorak se prenosi u sistem za razdvajanje čestica po masama i dobija se maseni spektar jedinjenja sa određenog prostora na pločici. Na ovaj način se isti uzorak može analizirati većim brojem metoda, što je od značaja kod ispitivanja novih droga. Pored toga, ova tehnika se uspešno koristi za razdvajanje pigmenata na vlaknima, komponenta mastila, eksploziva i toksina.

## Imunoeseji

Imunoeseji predstavljaju jedan od inicijalnih koraka kojima se radi dokazivanje prisustva psihoaktivnih supstanci u različitim matriksima od značaja u forenzici. Danas se imunoeseji rutinski koriste prilikom analize urina, krvi i ostalih bioloških tečnosti, ali mogu biti i od koristi za dokazivanje prisustva u različitim praškovima i tabletama. Rad imunoeseja se zasniva na specifičnim antigen-antitelo reakcijama za svaku od supstanci pojedinačno, ali su mehanizmi detekcije različiti. Sa razvojem imunoeseja, na tržištu postoje različiti proizvodi koji imaju granice detekcije koje mogu biti od značaja u analizi uzoraka. Nekoliko regulatornih tela, posebno u Sjedinjenim američkim državama, ispituje i daje dozvole za njihovo korišćenje u preliminarnim istraživanjima. Za potpuno dokazivanje prisustva droga potrebno je uraditi i dodatne analize koje uključuju gasno-masenu spektrometriju i IC spektroskopiju.

Kao što je pomenuto, imunoeseji se zasnivaju na principu molekulskog prepoznavanja, odnosno specifičnim interakcijama koje potoje između antigena (droga) i antitela, odnosno principu „ključa i brave“ u kome su sturkturane karakteristike molekula odgovorne za njegovo prepoznavanje. Većina imunoeseja uključuje obeležavanje kako bi se uradila kvalitativna i kvantitativna analiza. Obeležavanjem se dodaju druge supstance ili kao analog antigena ili se direktno vezuju na antitelo, a pri tome obeleživači imaju neku od osobina koja olakšava merenje. Tipovi obeleživača koji omogućavaju povećanu osetljivost uključuju radioizotope, enzime, fluorescentne, hemiluminiscentne i fosforescentne molekule ili mikročestice. Obično je vezivanje toliko

specifično da je smanjena mogućnost bilo kakve interferencije sa nečistoćama ili drugim prisutnim česticama. Korišćenje imunoeseja podrazumeva i niz jasno definisanih koraka pripreme uzorka kako bi se osigurao validan rezultat, kao što su priprema pufera, stabilizovani rastvori i optimizovane koncentracije. Ispitivana supstanca se meša sa odabranim reagensom u okviru protokola i uslova koji postoje za svaki od imunoeseja.

Imunoeseji koji uključuju molekule male molekulске mase, kakva je većina droga, se zasnivaju na kompetitivno vezivanju za antitelo. Zbog toga se proizvode supstance (derivat droge) koje po izgledu i mogućim interakcijama liče na ispitivanu supstancu, tako da se vezuju za antitelo. Ove supstance se kompetitivno vezuju za antitelo zajedno sa ispitivanom supstancom. Promena signala koja potiče od kompleksa nastalog vezivanjem derivata droge za antitelo nastaje kada se u smeši nađe i ispitivana droga. Ova promena se koristi za kvalitativnu i semikvantitativnu analizu. Kvalitativna analiza se odnosi na identifikaciju prisustva određene količine droge koja je unapred definisana minimalnom vrednošću („cut-off value“). Semikvantitativna analiza predstavlja upoređivanje intenziteta signala nastalom dodatkom droge sa kalibracionom pravom. Svi tipovi imunoeseja se smatraju semikvantitativnim metodama zbog toga što se u rastvoru nalazi složena smeša supstanci koje se potencijalno mogu vezati za antitelo. Na osnovu potrebe da se vrše dodatna razdvajanja derivata droge koji je vezan za antitelo i slobodnog definisana je podela na homogene i heterogene imunoeseje. Kod heterogenih imunoeseja potrebno je izdvojiti slobdan derivat droge kako svojim signalom ne bi uticao na merenja, čime se snižava granica detekcije, ali postoje i dodatni koraci kao što su centrifugiranje ili ispiranje. Homogeni imunoeseji se mogu koristiti za veće količine uzorka, kao i veću automatizaciju procesa, kao što je u analizatorima sa velikim brojem obrta analiza. Na taj način se smanjuje cena analize, pouzdanost i smanjuje razlika između pojedinačnih analiza. Sa razvojem instrumenata zasnovanim na merenju osobina vrsta koje su prethodno pomenute, efikasnost testova je povećana, kao i mogućnost upotrebe u kliničkim laboratorijama. Instrument kontroliše zapreminu dodatog uzorka, čime se smanjuje mogućnost greške eksperimentatora. Promena signala obeleživača se automatski meri i matematički obrađuje, tako da se na kraju analize kao rezultat dobija količina droge u uzorku.

Postoje dva tipa antitela koja se koriste u imunoesejima, poliklonska i monoklonska. Poliklonska antitela su dobijena iz seruma životinja (miševi ili koze) i predstavljaju mešavinu antitela sa različitim specifičnostima. Kod monoklonskih antitela su proteini jedne vrste koji su dobijeni u ćelijskim kulturama i imaju samo jedno mesto vezivanja. Kod mešavine poliklonskih antitela postoji vezivanje različitih delova molekula za različita mesta na antitelima, dok se kod monoklonskih vezivanje dešava samo za jedno mesto u proteinu i to specifičnom grupom. Zbog toga monoklonska antitela ne prepoznaju strukturno slična jedinjenja, kao što su metaboliti. Mogućnost lažno pozitivnog rezultata je obično navedena na pakovanju testa. Što je veća specifičnost mesta za vezivanje manja je mogućnost da se za isto mesto veže drugi molekul.

### **Imunoeseji za detekciju kanabinoida**

Imunoeseji koji se koriste za detekciju zloupotrebe Cannabis biljke rade na principu detekcije THC-a. Nakon dospevanja u organizam THC prolazi niz strukturnih promena nakon čega nastaju metaboliti koje je potrebno detektovati u biološkim uzorcima i na kraju odrediti unete koncentracije. Zbog toga esaji koji se koriste treba da budu specifični za metabolite THC-a na osnovu poznavanja farmakokinetike i metabolizma ove supstance. Nakon pušenja marihuane, THC se dobro apsorbuje u organizmu. Nakon 30 minuta se postiže maksimalna koncentracija THC-a koja počinje da opada kada se THC raspoređuje po tkivima i deponijama masti. Većina nastalih metabolita THC-a je neaktivna i danas je poznat veliki broj ovih komponenti koje nastaju u metabolizmu. Glavni metabolit je 11-hidroksi- $\Delta^9$ -THC koji se oksiduje do 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol-9-karboksilnu kiselinu (THC-COOH). U urinu se nalazi najveća količina ovog metabolita i to u slobodnom obliku i u konjugatu sa glukuronidom. Iako je THC-COOH metabolit koji je potrebno detektovati, i konjugat može biti prisutan u značajnim koncentracijama. Dostupni imunoeseji mogu detektovati veći broj metabolita,

ali su minimalne vrednosti koje su prikazane obično određene samo za THC-COOH. Vredno dobijena ovim testom se prikazuje kao „prividna koncentracija THC-COOH“ zbog toga što su moguće reakcije odabranih antitela sa strukturno sličnim komponentama. Minimalna koncentracija koja se ovim testovima može pouzdano odrediti je 100 ng/mL. Vrednosti su relativno visoke nego u odnosu na druge supstance zbog mogućeg pasivnog ulaska THC kroz boravak u prostoriji gde se puši marihuana. Istraživanja su pokazala da je potrebna nerealno visoka koncentracija THC-a u dimu kako bi postojao pozitivan rezultat na testu. Cena i odabir testa takođe utiče na minimalnu dozvoljenu koncentraciju. Rezultati dodatnih testova su pokazali da postoji i značajna razlika između individua koje su koristile marihuanu u vrednostima koncentracije THC-a, kao i vremena potrebnog za njegovo izlučivanje kroz urin.

### **Imunoeseji za amfetamine**

Imunoeseji za amfetamine se često koriste prilikom analize bioloških tečnosti zbog toga što postoji visok stepen automatizacije, a sama analiza je veoma jednostavna. Cilj primene ovih eseja je u njihovoj specifičnosti prema određenim amfetaminima, iako među njima postoji značajna sličnost u strukturi. Struktura amfetamina je relativno jednostavna i sastoji se od aromatičnog prstena, alifatičnog lanca i nekoliko bočnih grupa na prstenu. Zbog toga je komplikovano dobiti antitela koja će selektivno vezivati određenu supstancu bez postojanja mogućnosti za lažno pozitivan rezultat. Pomenuto je prethodno da i različiti enantiomeri amfetamina često interaguju sa antitelima čime se onemogućava precizno određivanje koncentracije aktivnog oblika.

Sa razvojem imunoeseja za amfetamine postižu se sve niže vrednosti minimalnih koncentracija. Glavna prepreka razvoju je mogućnost lažno pozitivnog rezultata usled interakcije malih biolomekula koji imaju sličnu strukturu kao amfetamini sa antitelima u testu. Ukoliko su testovi previše specifični za određene supstance, na primer za amfetamin, potrebno je raditi dodatne testove kako bi se dokazao metamfetamin, što produžava vreme i povećava cenu analize. Smanjenje mogućnosti da l-enantiomer metamfetamina da pozitivan rezultat je važan u Sjedinjenim američkim državama u kojima je njegova upotreba dozvoljena u medicinske svrhe. Većina dobijenih imunoeseja je optimizovana za analizu urina. Studije su pokazale da se testovi koji su kalibrisani za urin ne mogu jednostavno koristiti za plazmu ili druge biološke uzorke.

Veći broj uređaja za dokazivanje amfetamina na licu mesta je razvijen poslednjih godina kako bi se skratilo vreme za odnošenje uzorka u laboratoriju. Ovaj proces uključuje uzimanje manje količine urina i dobijanje kvantitativnih rezultata u kraćem vremenu. Ovi uređaji daju prihvatljivo dobre rezultate, ali je preporučeno da se pozitivni rezultati dodatno potvrde drugim metodama zbog toga što se ovim uređajima u jednom pokretanju određuje veći broj psihoaktivnih supstanci.

### **Tehnika ispitivanja mikrokristala**

Tehnika dobijanja mikrokristala je značajna u forenzičkoj analizi kontrolisanih supstanci kao jednostavna i brza tehnika koja, uz određena ograničenja, može biti veoma specifična. Tehnika se zasniva na radovima hemičara sa početka 19. veka koji su razvijali metode za određivanje alkaloida u biljkama. Dodatak reagenasa dovodi do taloženja i nastanka kristala koji se potom analiziraju pod polarizujućim mikroskopom. Danas postoji značajna debata među forenzičarima o primenljivosti ovih testova posebno imajući u vidu da su razvijene metode za brzo i jednoznačno određivanje ovih supstancija. Tradicionalno se tehnika ispitivanja mikrokristala radila kao potvrda rezultata dobijenih bojenim testovima. Pozitivan rezultat dobijen obema tehnikama je bio dovoljan da se zaključi da je određena supstanca prisutna u uzorku. Kod forenzičara mlađe generacije, ova tehnika se koristi kao preliminarni korak, a nakon toga se rezultati potvrđuju gasno-masenom spektrometrijom ili infracrvenom spektroskopijom. Kod kliničara i forenzičkih toksikologa, ova tehnika nema

veći značaj zbog potrebe upotrebe brzih i jednostavnih metoda koje ne zahtevaju veće znanje iz hemije taloženja. Zbog toga se u kliničkoj praksi obično odmah pristupa korišćenju gasno-masene spektrometrije ili infracrvene spektroskopije.

Iako na prvi pogled veoma komplikovana, tehnika ispitivanja mikrokristala nudi niz prednosti. Za analizu su obično potrebne male količine reagensa (do nekoliko kapi) koji specifično reaguje sa supstancom od interesa. Analize kokaina i metamfetamina dobijanjem mikrokristala su zvanično i prihvaćene od većeg broja strukovnih udruženja. Ova tehnika je veoma ekonomična i u skladu sa idejama zelene hemije. Na primer, priprema uzorka za IC i gasno-masenu spektrometriju zahteva nekoliko mililitara rastvora što je mnogostruko veće od pomenutih. Takođe, primena ove tehnike ne uključuje prečišćavanje uzorka zbog toga što su testovi visoko specifični i nečistoće ne mogu da utiču na dobijeni rezultat. Jedna od glavnih prednosti ove tehnike je u tome da se na ovaj način mogu razdvojiti optički izomeri koje je vrlo teško razlikovati ostalim metodama zbog identičnih fizičkih i hemijskih osobina (sem posmatranjem obrtanja ravni polarizovane svetlosti korišćenjem polarimetra). Optički aktivne komponente formiraju kristale koji su različiti za dva enantiomera, što je značajno kada je jedan od enantiomera kontrolisana supstanca, dok se drugi može koristiti u medicinske svrhe. Dobijeni kristali se nakon analize mogu ponovo rastvoriti i analizirati drugim metodama zbog toga što se u procesu kristalizacije ne menja struktura supstance, što potvrđuje da ova tehnika može biti prvi korak u ispitivanju.

Glavna mana tehnike ispitivanja mikrokristala je u tome što se ne može koristiti za sve supstance koje se mogu naći u uzorcima, posebno sa razvojem sve većeg broja supstanci. Reakcije taloženja jesu specifične, ali nije moguće razviti za svaku pojedinačnu supstancu. Nastanak kristala je složen proces koji zavisi od većeg broja faktora kao i vremena koje je ostavljeno za kristalizaciju. Nakon stvaranja početne klice usled grupisanja čestica na malu površinu počinje rast kristala. Ukoliko je rast spor nastaju kristali pravilnih oblika, dok kod su kod brze kristalizacije moguće promene strukture kristala usled ugradnje molekula rastvarača ili nečistoća. Zbog toga kristali nemaju uvek identičan oblik i potrebno je odabrati dobre kristale za analizu. Nečistoće prisutne u uzorku mogu u nekim slučajevima da utiču na izgled kristala, tako da su preporučljiva razdvajanja tankoslojnom hromatografijom kada postoji potreba. Tehnika ispitivanja mikrokristala se izvodi ručno, dok posmatranje ispod mikroskopa sa sobom nosi i određenu dozu subjektivnosti. Ova dva razloga su značajna zato što od pojedinca koji izvodi test zavisi i validnost rezultata što bi trebalo izbegavati u metodama foreničke fizičke hemije. U odnosu na hromatografske metode, nije moguće analizirati veći broj supstanci istovremeno.

Ukoliko se primenjuju, ove testove je potrebno dokumentovati na pravi način. Pored detaljnog opisa izgleda mikrokristala (oblik, veličina, polimorfizam), treba opisati i korišćeni reagens, rok trajanja, postupak dodavanja, korišćeno posuđe, instrument i ostalo. Fotografije mikrokristala su sastavni deo dokumentacije. Kada se ova tehnika koristi kao preliminarni korak, onda nije potrebno da bude detaljna.

Prilikom primene ove tehnike, ispitivani uzorak se rastvara u rastvaraču u kome se već nalazi reagens ili u koji se reagens dodaje naknadno. U reakciji sa reagensom nastaje slabo rastvorno jedinjenje koje kristališe u rastvaraču nakon nanošenja na pločicu. Oblik kristala je posledica strukture molekula, tako da će novonastala jedinjenja imati različite kristale zavisno od prisutne supstance. Ovi testovi se mogu podeliti na one koji se zasnivaju na rastvaranju u vodi i one zasnovane na isparavanju. Iako je danas poznat veliki broj reagenasa, postupak ispitivanja u rastvoru ostaje nepromenjen. Mala količina uzorka se postavlja na mikroskopsku pločicu i dodaje se kap vode ili razblažene sirćetne kiseline. Nakon toga se dodaje jedna kap reagensa u vodi na drugu stranu pločice ili direktno na postavljen uzorak. Dve kapi se mešaju i posmatra se nastanak kristala pod mikroskopom. Nije potrebno preklopiti pločicu drugom pločicom. Test zasnovan na isparljivosti se koristi kada je ispitivana supstanca isparljiva ili kada to postaje dodatkom određenih rastvarača. Uzorak sa rastvaračem se postavlja u komoru za isparavanje ili pločicu sa udubljenjem. Reagens se rastvara u viskoznom rastvaraču koji se prilepljuje na zidove i nanosi se na pločicu za mikroskop. Nakon toga se pločica okreće tako da se rastvor reagensa nalazi iznad udubljenja sa uzorkom. Isparavanjem uzorka stvara se slabo rastvorno jedinjenje na

površini pločice što je moguće pratiti pod mikroskopom. Pored ispitivanog uzorka, test se izvodi istovremeno i sa standardom kako bi se potvrdila validnost testa. Ova tehnika je korisna pri ispitivanju isparljivih supstanci koje sadrže aldehidnu i keto grupu, kao i droge koje se mogu klasifikovati kao primarni i sekundarni amini. GBH kao isparljiva supstance se, takođe, može ispitivati ovom tehnikom. Treća tehnika koja uključuje korake i prve i druge se zasniva na stvaranju isparljivog proizvoda nakon dodatka rastvarača i reagensa. Tada se u udubljenje na pločici dodaju ispitivana supstanca, rastvarač i reagens, a isparljivi proizvodi kristališu na gornjoj pločici što se može posmatrati direktno pod mikroskopom. Ovaj metod se koristi za steroidne hormone i barbiturate (na primer, fenobarbital).

Iako je razvijen veći broj testova koji dovode do stvaranja mikrokristala psihoaktivnih supstanci, u praksi se koristi samo mali broj. Dobijeni reagensi obično predstavljaju presićene ili zasićene rastvore kako bi proces kristalizacije bio uspešan, iako je bolje da rastvor bude razblažen kako bi se usporio rast kristala i dobili kristali pravilnog obika. U nastavku je prikazano nekoliko testova za različite supstance.

### **Zlato(III)-hlorid test**

Rastvaranjem zlato(III)-hlorida u vodi i koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini dobija se reagens za dokazivanje kokaina u formi rozeta, odnosno kristala koji se prostiru u svim pravcima a počinju iz zajedničke tačke.

### **Zlato(III)-hlorid u fosfornoj kiselini test**

Dodatkom koncentrovane fosforne kiseline u prethodno opisani reagens moguće je dokazati metamfetamin kroz dugačke kristale sa oštrim završetkom ili d-amfetamin kao dugačak kristal sa ravnim završetkom.

### **Platina(IV)-hlorid test**

Kokain se može dokazati nakon dodatka reagensa dobijenog rastvaranjem platina(IV)-hlorida u 1 M hlorovodoničnoj kiselini. Pri ovom postupku nastaju dugi kristali sa oštrim vrhom.

### **Natrijum-acetat test**

Rastvaranjem natrijum-acetat u vodi i dodatkom u uzorak koji sadrži heroin nastaju heksagonalne ploče kao dokaz prisustva ove supstance.

### **Kalijum-permanganat test**

Fenilciklidin se može dokazati korišćenje rastvora kalijum-permanganata u vodi i fosfornoj kiselini. Ovaj test je veoma osetljiv i najbolje je koristiti razblaženi rastvor reagensa. Nastali kristali su ljubičaste boje oblika H ploče.