Kvantitativno određivanje sintetskih kanabinoida

Kostrić, Lorena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:767463

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Lorena Kostrić

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE SINTETSKIH KANABINOIDA

Diplomski rad

Akademska godina: 2017./2018.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Lorena Kostrić

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE SINTETSKIH KANABINOIDA

Diplomski rad

Akademska godina: 2017./2018.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. DavorkaSutlović
Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE SINTETSKIH KANABINOIDA

Lorena Kostrić, broj indeksa: 103

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Cilj ove eksperimentalne studije bio je razviti GC-MS metodu za kvantitativno određivanje sintetskih kanabinoida JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-210 i ADB-PINACA te razvijenu metodu potom primijeniti na kvantitativno određivanje navedenih sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće.
Materijal i metode: Standardne otopine sintetskih kanabinoida, pripremljene razrijeđivanjem osnovnih standarda u metanolu, dodane su u biološki uzorak mokraće, dokazano negativan na prisustvo sredstava ovisnosti, kako bi se dobile umjerne krivulje analiziranih sintetskih kanabinoida. Koristeći nepoznate volumene tih standardnih otopina, pripremljena su dva biološka uzorka mokraće. Uzorci su pripremljeni za analizu ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE), a potom analizirani GC-MS metodom koja omogućuje istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma u području od 50-600 m/z vrijednosti i snimanje samo odabranih iona. Optimiran je i temperaturni program.
Rezultati: ADB-PINACA, JWH-019 i JWH-210 potvrđeni su u oba analizirana uzorka, dok su JWH-073 i JWH-018 potvrđeni samo u uzorku 1, u koji je dodan veći volumen pripremljenih standardnih otopina. Masene koncentracije detektiranih sintetskih kanabinoida izračunate su pomoću prethodno izrađenih umjernih krivulja.
Zaključci: Rezultati ovog istraživanja potvrdili su izbor GC-MS tehnike za kvantitativno određivanje sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće. Radi povećanja stabilnosti analiziranih spojeva, uzorke je potrebno prethodno derivatizirati. Zbog sve veće pojavnosti novih analoga, strukturno sličnih ishodišnim molekulama, potrebno je razvijati nove analitičke metode za identifikaciju sintetskih kanabinoida i njihovih metabolita u biološkim uzorcima.

Ključne riječi: sintetski kanabinoidi, biološki uzorak mokraće, GC-MS metoda

Rad sadrži: 52 stranice, 26 slika, 4 tablice, 58 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. Marija Definis-Gojanović	predsjednica Povjerenstva
2.	doc. dr. sc. Branka Polić	član
3.	prof. dr. sc. Davorka Sutlović	član-mentor

Datum obrane: 26. rujna 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Pharmaceutical toxicology
Thesis subject	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine.
Mentor:	DavorkaSutlović. PhD, full prof.
Technical assistance:	MajaVeršićBratinčević, PhD

QUANTITATIVE DETERMINATION OF SYNTHETIC CANNABINOIDS

Lorena Kostrić, index number: 103

Summary:
Objectives: Aim of this experimental study was to develop a GC-MS method for quantitative determination of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-210 and ADB-PINACA. Also, our objective was to quantitatively determine these synthetic cannabinoids in urine samples using the developed method.
Materials and methods: Standard solutions of synthetic cannabinoids prepared by diluting original standards in methanol were added to the biological sample of urine, that tested negative for substances of abuse, to obtain calibration curves for analyzed synthetic cannabinoids. Using unknown volumes of standard solutions, two urine samples were prepared. The samples were prepared for analysis by liquid-liquid extraction (LLE) and then analyzed by a GC-MS method using mode that simultaneously records total ion chromatogram in the area of 50-600 m/z values and single ion monitoring scanning mode. The temperature program was also optimized.
Results: ADB-PINACA, JWH-019 and JWH-210 were confirmed in both analyzed samples, while JWH-073 and JWH-018 were only confirmed in sample 1, to which a larger volume of prepared standard solutions was added. The mass concentrations of detected synthetic cannabinoids were calculated using previously prepared calibration curves.
Conclusion: This study confirmed the GC-MS technique for quantitative determination of synthetic cannabinoids in biological samples of urine. In order to increase the stability of the analyzed compounds, it is necessary to include the derivatisation step prior to GC-MS analysis. Due to the increasing presence of new analogues, structurally similar to origin molecules, there is a need for development of analytical methods for the identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in biological samples.

Key words: synthetic cannabinoids, biological sample of urine, GC-MS method

Thesis contains: 52 pages, 26 figures, 4 tables, 58 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1.	Marija Definis-Gojanović , PhD, full professor	Chair person
2.	Branka Polić, PhD, assistant professor	Member
3.	Davorka Sutlović, PhD, full professor	Supervisor

Defence date: 26th September 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na stručnom vodstvu i pruženom znanju.

Zahvaljujem komentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević na pomoći i savjetima pri izradi i pisanju diplomskog rada.

Veliko hvala kolegici Martini Bošnjak na nesebičnoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada, ali i na svim lijepim trenucima koji su naše studentske dane učinili uspomenom koje ću se uvijek rado sjećati.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima i baki na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh, koji su mi bili neophodan oslonac tijekom studija i bez kojih sve ovo što sam postigla ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Sintetski kanabinoidi 3
1.1.1. Podjela sintetskih kanabinoida 4
1.1.2. Farmakokinetika sintetskih kanabinoida 7
1.1.3. Farmakodinamika sintetskih kanabinoida 7
1.2. Uzorci za toksikološku analizu 8
1.3. Metode ekstrakcije 9
1.3.1. Ekstrakcija tekuće – tekuće 9
1.4. Kromatografija 11
1.4.1. Plinska kromatografija 11
1.4.2. Spektrometrija masa 12
1.4.3. Vezana tehnika plinska kromatografija sa spektrometrijom masa 13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 15
3. MATERIJAL I METODE 17
3.1. Kemikalije 18
3.2. Referentni standardi sintetskih kanabinoida 18
3.3. Priprema referentnih standardnih otopina za toksikološku analizu koristeći GC-MS tehniku .. 19
3.4. Biološki uzorci za toksikološku analizu 20
3.5. Postupak pripreme bioloških uzoraka za kromatografsku analizu LLE metodom 20
3.6. Instrumentalna analiza GC-MS metodom 21
3.6.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone 22
4. REZULTATI 23
4.1. Analiza referentnih standarda sintetskih kanabinoida 24
4.2. Umjerne krivulje analiziranih sintetskih kanabinoida 26
4.3. Usporedba različitih koncentracija analiziranih sintetskih kanabinoida 28
4.4. Kvantitativna analiza sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće 32
5. RASPRAVA 35
6. ZAKLJUČCI 39
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 41
8. SAŽETAK 47
9. SUMMARY 49
10. ŽIVOTOPIS 51

1. UVOD

Sredstva ovisnosti predstavljaju tvari snažnog psihoaktivnog djelovanja čija zlouporaba dovodi do razvoja ovisnosti, kronične relapsirajuće bolesti mozga. Ovisnost, u užem smislu, predstavlja stanje fizičke potrebe za određenim stimulansom karakterizirano adaptivnim promjenama u mozgu i sindromom ustezanja u trenutku kada zlorabljena droga više nije dostupna. S druge strane, navika ili adikcija predstavlja „psihološku ovisnost" odnosno stanje snažne motivacije za ponovnim uzimanjem droge kako bi se održao osjećaj ugode, unatoč negativnim posljedicama. Kroničnim izlaganjem neizbježno se razvija ovisnost, dok je manji postotak onih koji uz ovisnost razvijaju i adikciju (1).

Zahvaljujući razvoju civilizacije i modernizacije, sredstva ovisnosti postaju svjetski trend u načinu života, ali i vodeći javnozdravstveni problem (2). Poseban izazov predstavljaju nove psihoaktivne tvari poznate i pod nazivom: „legalice" (*engl.* „legal highs"), „soli za kupanje" (*engl.*„bath salts"), „istraživačke kemikalije" (*engl.* „research chemicals") te mnoštvo drugih naziva (3). Riječ je o vrlo heterogenoj skupini spojeva koji na tržište dolaze kao „zakonite" zamjene za nezakonite droge te stoga još uvijek nisu obuhvaćeni međunarodnim kontrolama droga (4). Proizvode se različitim modifikacijama u strukturi ranije poznatih psihoaktivnih tvari te se prema tome najčešće svrstavaju u nekoliko skupina: sintetski kanabinoidi, sintetski katinoni, fenetilamini, piperazini te spojevi slični ketaminu i fenciklidinu (5).

Najčešće dolaze u obliku mješavina s drugim zakonski dozvoljenim spojevima, te su označeni kao proizvodi koji nisu za ljudsku upotrebu, a sve kako bi se izbjegli zakoni i zakonski propisi (6). Njihovi farmakološki i toksikološki učinci još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, a neke od tih tvari mogu imati više štetnih učinaka nego ishodni spoj zbog čega je rizik za razvoj ovisnosti, dugotrajnih posljedica na zdravlje, predoziranja i smrtnih ishoda veći (7).

Kao izvor novih psihoaktivnih tvari vrlo često navodi se Kina, zemlja u kojoj se te tvari proizvode u velikim količinama, a zatim europskim putevima šalju na druge kontinente (4). Visokoj stopi globalizacije novih psihoaktivnih tvari, osim zaobilaženja regulatornih okvira, doprinosi i njihova raznolikost, brzi razvoj, niska cijena te široka dostupnost (8). Dok su neke od tih tvari dostupne u specijaliziranim prodavaonicama i javnom „*površinskom*" dijelu interneta, druge se mogu pronaći samo na skrivenim „*mračnim*" mrežama i ilegalnim tržištima. Najčešće dolaze u obliku praha, tableta ili kapsula, a mogu se pronaći i u formi tekućine (4). Danas je poznato više od 700 različitih novih psihoaktivnih tvari, a jednu od

najvećih i najbrže rastućih skupina čine sintetski kanabinoidi (9). O raširenosti zlouporabe ove skupine novih tvari govori i podatak Europskog centra za praćenje droga i ovisnosti o drogama (*engl.* European monitoring centre for drugs and drug addiction, EMCDDA) prema kojem je tijekom 2015. zaplijenjeno više od 2,5 tone sintetskih kanabinoida, a najčešće zaplijenjeni bili su ADB-FUBINACA, AB-CHMINACA, UR-144, 5F-AKB48 i ADB-CHMINACA (4).

1.1. Sintetski kanabinoidi

Sintetski kanabinoidi su tvari koje oponašaju učinke delta-9-tetrahidrokanabinola (Δ-9-THC-a), a prvotno su sintetizirani u svrhu medicinskih istraživanja, kao obećavajući terapijski pristup u liječenju različitih patoloških stanja (10). Ipak, kako je njihov psihotropni učinak dokazano snažniji i dugotrajniji u odnosu na prirodne kanabinoide, ovi su spojevi vrlo brzo postali jedna od najpoznatijih rekreacijskih droga (11). Osim pravne dostupnosti i niske cijene, kao motiv za njihovu zlouporabu navode se i njihovi prepoznatljivi subjektivni učinci poput snažnog osjećaja ugode, stimulacije i znatiželje (12).

Prvi spojevi iz ove skupine identificirani su 2008. godine u biljnim mješavinama (*engl.* „herbal mixtures“ ili „herbal blends“) označenim kao biljni tamjan ili osvježivač zraka (13,14). Biljne mješavine sadrže suhe, sitno narezane dijelove biljaka (cvjetove, listove, stabljike) koji su natopljeni ili poprskani sintetskim kanabinoidima, prethodno otopljenim u organskom otapalu. Vrlo su ugodna mirisa i okusa (npr. na med i vaniliju) te dolaze u privlačnim šarenim paketićima, težine od 1-3 grama, sa jasno naznačenim uputama da su mješavine zabranjene za ljudsku konzumaciju. Na tržistu su poznati pod različitim egzotičnim nazivima: „Spice“, „K2“, „Cloud 9“, „Zohai“, „Yucatan Fire“, „Moon Rocks“ „Black Mamba“ i drugi (12,15).



Slika 1. Biljne mješavine s dodatkom sintetskih kanabinoida (16).

Uobičajeni način zlouporabe je pušenje biljnih mješavina uvijenih u cigaretu takozvanu *joint* ili pomoću lule, e-cigareta, vaporizatora i drugih naprava. Učinci su vidljivi vrlo brzo nakon inhalacije, a slični su učincima kanabisa, čije se prisustvo ne može dokazati postojećim analitičkim tehnikama dokazivanja. Mogu se pronaći i u oblicima za oralnu, sublingualnu i intranazalnu primjenu. Do intoksikacije dolazi zbog nehomogenosti biljnih mješavina i varijabilnosti njihova sastava (biljne mješavine mogu sadržavati različite kombinacije i količine sintetskih kanabinoida), nepotpunog označavanje proizvoda (često sadrže i psihoaktivne biljke koje nisu navedene na deklaraciji) kao i veće potentnosti sintetskih kanabinoida u odnosu na THC (17,18).

1.1.1. Podjela sintetskih kanabinoida

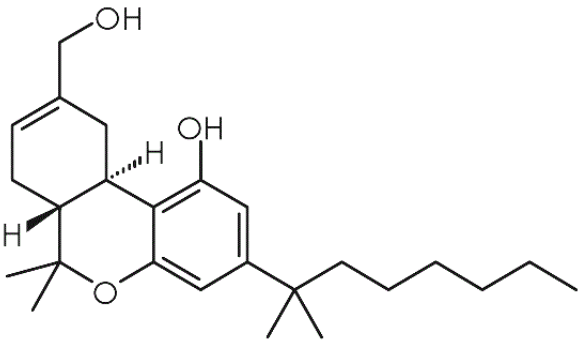
Skupinu sintetskih kanabinoida čine strukturno različiti spojevi. Ipak, većina spojeva je lipofilna i nepolarna, bicikličke strukture te se sastoji od 22 do 26 ugljikovih atoma. Zajednička strukturna značajka svih sintetskih kanabinoida je bočni lanac, gdje optimalna aktivnost zahtijeva više od 4 (do 9) zasićenih ugljikovih atoma (19,20). Kemijske strukture sintetskih kanabinoida najčešće pronađenih u biljnim mješavinama prikazane su na slici 2.

Prema kemijskoj strukturi, sintetski se kanabinoidi dijele u četiri glavne skupine (3,21):

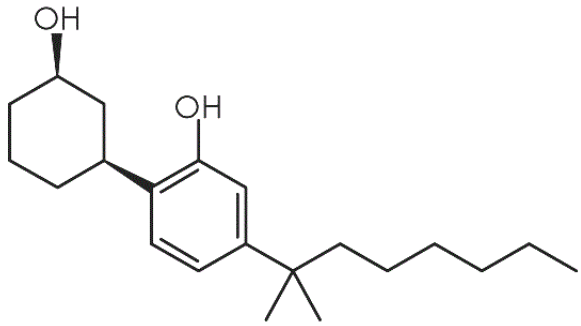
- Klasični kanabinoidi, analozi THC-a, derivati su dibenzopirana. Razvijeni su 1960-ih godina, nakon izolacije THC-a. Najpoznatiji predstavnik skupine je spoj HU-210, koji je naziv dobio prema hebrejskom sveučilištu na kojem je i otkriven, a njegov je učinak

i do 100 puta snažniji u odnosu na THC. U ovu skupinu pripadaju još spojevi poput nabilona, dronabilona i drugi.

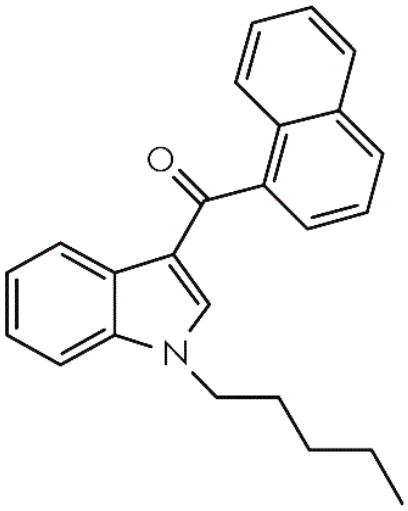
- Neklasični kanabinoidi ili cikloheksilfenoli su spojevi strukturno različiti od prekursorske molekule THC-a, a razvila ih je tvrtka Pfizer 1970-ih godina. Najznačajniji predstavnik je spoj CP 47,497, jedan od prvih sintetskih kanabinoida pronađenih u „Spice“ proizvodima.
- JWH spojevi ili aminoalkilindoli najbrojnija su skupina sintetskih kanabinoida, a uključuju 5 podskupina: naftoilindoli, naftilmetilindoli, naftoilpiroli, naftilmetilindeni i fenacetilindoli. Otkriveni su 1990-ih godina, a naziv su dobili prema Johnu W. Huffmanu, koji ih je i otkrio prilikom istraživanja endokanabinoidnog sustava i utjecaja kanabinoida na mozak. Najznačajniji spoj ove skupine je JWH-018, koji je ujedno i najviše proučavani te nedvojbeno najpoznatiji sintetski kanabinoid. Zbog svoje visoke farmakološke aktivnosti i lakoće sinteze, jedan je od prvih zloupotrebljavanih spojeva te glavni sastojak biljnih mješavina.
- Ostali spojevi, uključujući i amide masnih kiselina (npr. oleamid). Iako je struktura oleamida vrlo slična strukturi endogenog kanabinoida anandamida, nije poznato posjeduje li kanabinoidnu aktivnost. Poznata je njegova primjena u industriji kao sredstvo protiv klizanja, te je čest onečišćivač u plastici.



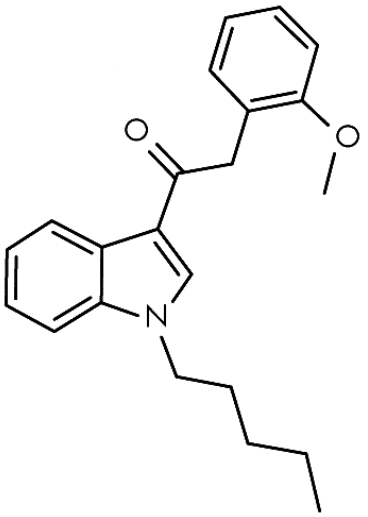
HU-210



CP 47,497



JWH-018



JWH-250

Slika 2. Kemijske strukture HU-210, CP 47,497, JWH-018 i JWH-250 (22).

1.1.2. Farmakokinetika sintetskih kanabinoida

U skupinu sintetskih kanabinoida spada veliki broj raznolikih spojeva, a o njihovoj se farmakokinetici malo zna i smatra se dosta nepredvidljivom u odnosu na prirodne kanabinoide. Ipak, nekoliko objavljenih farmakokinetičkih studija pokazalo je da su sintetski kanabinoidi, baš kao i THC, visoko lipofilne molekule te da se vrlo brzo raspodjeljuju u mozak i masno tkivo. Njihova apsorpcija uvelike ovisi o načinu primjene te se vršne koncentracije u serumu postižu vrlo brzo nakon inhalacije, dok je za apsorpciju oralno uzetih pripravaka potrebno nekoliko sati. Glavnina metabolizma odvija se u jetri pri čemu su od reakcija prve faze najzastupljenije reakcije oksidacije, dok su metaboliti druge faze gotovo isključivo glukuronidi. Za razliku od THC-a koji se metabolizira do samo jednog aktivnog metabolita, metabolizam sintetskih kanabinoida dovodi do stvaranja većeg broja farmakološki aktivnih spojeva čime se produžuje psihotropni učinak ishodnog spoja, što doprinosi povećanju toksičnosti. Eliminacija se najvećim dijelom odvija putem mokraće te je značajno produžena u slučaju kronične zlouporabe. Ishodišni su spojevi često prisutni u krvi i oralnoj tekućini u manjoj koncentraciji nego u mokraći. Identifikacija ishodišnih spojeva i njihovih metabolita jako je zahtjevna te rezultate nije moguće interpretirati pretražnim testovima i tehnikama,već samo potvrdnim tehnikama, obzirom da su to novosintetizirani spojevi koji su u većini slučajeva još uvijek nepoznati i neidentificirani (23-25).

1.1.3. Farmakodinamika sintetskih kanabinoida

Sintetski kanabinoidi, u usporedbi s THC-om koji je parcijalni agonist kanabinoidnih receptora, mogu djelovati kao puni agonisti, antagonisti ili inverzni agonisti kanabinoidnih CB1 i CB2 receptora. CB1 receptori čine vrlo zastupljenu skupinu neuromodulatornih receptora u mozgu, a njihova stimulacija odgovorna je za učinke kanabinoida na kognitivne funkcije kao što su pamćenje, pažnja, emocije, ali i za snažne psihoaktivne učinke. CB2 receptori dominantno su smješteni na periferiji i imaju važnu ulogu u imunološkom sustavu. Iako sintetski kanabinoidi djeluju putem istih receptora, u usporedbi s prirodnim kanabinoidima pokazuju znatno veću toksičnost. Tome doprinosi i činjenica da pripravci sintetskih kanabinoida ne sadrže kanabidiol, jedan od prirodnih kanabinoida koji antagonizira psihogene učinke THC-a (26-28). U Tablici 1. navedeni su neki od ozbiljnih štetnih učinaka sintetskih kanabinoida.

Tablica 1. Štetni učinci sintetskih kanabinoida (29-33).

Zahvaćeni sustav	Učinci
Središnji živčani sustav	Poremećaj pamćenja i koncentracije, konfuzija, agitacija, razdražljivost, sedacija, nesanica, agresija, vrtoglavica, halucinacije, psihoze
Respiratorni sustav	Dispneja, pneumonija, depresija disanja
Kardiovaskularni sustav	Tahikardija, tahiaritmija, hipertenzija, bol u prsima, srčani udar, zatajenje srca
Gastrointestinalni sustav	Mučnina, povraćanje, abdominalna bol, proljev
Urinarni sustav	Akutna tubularna nekroza, akutni intersticijski nefritis, zatajenje bubrežne funkcije

1.2. Uzorci za toksikološku analizu

Uzorci za toksikološku analizu mogu biti biološki: biološka tkiva i tekućine, i nebiološki. Za toksikološku analizu kliničkih bioloških uzoraka na prisutnost droga i sredstava ovisnosti najčešće korišteni biološki uzorci su krv i mokraća. Uz najčešće analizirane uzorke, mogu se analizirati i uzorci sline, kosa ili nokti. U poslijesmrtnoj toksikologiji broj uzoraka je veći pa tako uključuje i analizu bioloških tkiva i ostalih bioloških tekućina. Iako se uzorak krvi pokazao kao kvalitetan i pouzdan uzorak za kvalifikaciju i kvantifikaciju droga i njihovih metabolita, kao uzorak izbora za toksikološko probiranje ipak se izabire uzorak mokraće. Naime, mokraća sadrži više od 99% vode i mali udio endogenih tvari koje mogu interferirati s analitom i primjenjenom analitičkom tehnikom. Olakšanoj

identifikaciji sredstava ovisnosti doprinosi i činjenica da se droge i njihovi metaboliti nakupljaju u mokraći te im je koncentracija u tom uzorku najveća, kao i veći volumen uzorka koji omogućuje proširenje broja analiza. Glavni nedostatak mokraće kao uzorka za analizu jest mogućnost jednostavne manipulacije uzorkom. Dodavanjem različitih sredstava ili razrijeđivanjem uzorka, značajno se otežava analiza i prikriva eventualna prisutnost sredstava ovisnosti u mokraći (34,35).

1.3. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je analitička metoda odjeljivanja željenih analita iz matrice uzorka i uklanjanja svih ostalih spojeva koji s njima mogu interferirati. Ekstrakcijskim tehnikama uzorci se pripremaju za analitičke metode identifikacije i kvantifikacije analita nekom od sljedećih tehnika: plinska kromatografija (*engl.* gas chromatography, GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC), vezanim tehnikama plinska kromatografija–spektrometrija masa (*engl*. gas chromatography–mass spectrometry, GC–MS) i tekućinska kromatografija–spektrometrija masa (*engl.* liquid chromatography– mass spectrometry, LC–MS) i slično (36).

Prilikom odabira ekstrakcijske metode, važno je poznavati matricu uzorka, kao i vrstu i svojstva analita te prema tome prilagoditi uvjete samog procesa ekstrakcije (37).

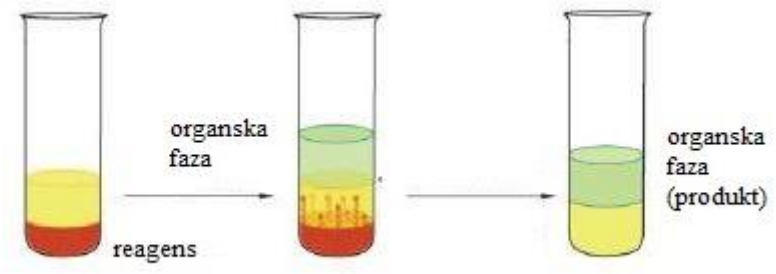
1.3.1. Ekstrakcija tekuće – tekuće

Ekstrakcija tekuće – tekuće (*engl.* Liquid–liquid extraction, LLE) jedna je od najčešće korištenih ekstrakcijskih metoda za pripremu uzorka u toksikološkim laboratorijima (36). LLE predstavlja postupak kojim se uzorak raspodjeljuje između dviju tekućina koje se ne miješaju ili dviju faza u kojima analit i matrica pokazuju različitu topljivost. Pri tome je obično jedna faza vodena (često gušća, teža faza), a druga je organsko otapalo. Do razdvajanja analita dolazi jer polarni, hidrofilni spojevi preferiraju vodenu (polarnu) fazu, a nepolarni, hidrofobni spojevi organsko otapalo (38). Princip same metode prikazan je na slici 3.

Na topljivost analita utječu i temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije. Viša temperatura istodobno povećava topljivost i brzinu prijelaza analita te smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala što doprinosi većem stupnju ekstrakcije (39).

Učinkovitost procesa ovisi i o pH vrijednosti uzorka koju je važno regulirati kako bi se izbjegla ionizacija ekstrahirane smjese. Kiseli su spojevi uglavnom netopljivi u kiselom mediju i mogu se ekstrahirati iz kiselih vodenih otopina u organsko otapalo, dok su bazični spojevi uglavnom netopljivi u alkalnim otopinama i mogu se ekstrahirati iz alkalnih vodenih otopina u organsko otapalo. Stoga bi za ekstrakciju kiselih spojeva pH medija trebao biti 2 pH jedinice ispod pK_a analita, a za ekstrakciju bazičnih spojeva 2 pH jedinice iznad pK_a analita. Neutralni spojevi uglavnom ostaju u topljivijoj fazi te na njih ne utječe promjena pH vrijednosti. Najčešće korištena otapala su heksan, toluen, dietileter, klorobutan, diklormetan, kloroform ili njihove smjese (40).

Kao glavne prednosti ove metode ekstrakcije navode se njena široka primjenjivost, dostupnost organskih otapala visokog stupnja čistoće te aparatura niske cijene (39). No, potreba za relativno velikim volumenima organskih otapala kao i nastajanje emulzije uslijed čega se gubi granica dviju faza, smatraju se velikim nedostatcima (36,38).



Slika 3. Princip ekstrakcije tekuće – tekuće (41).

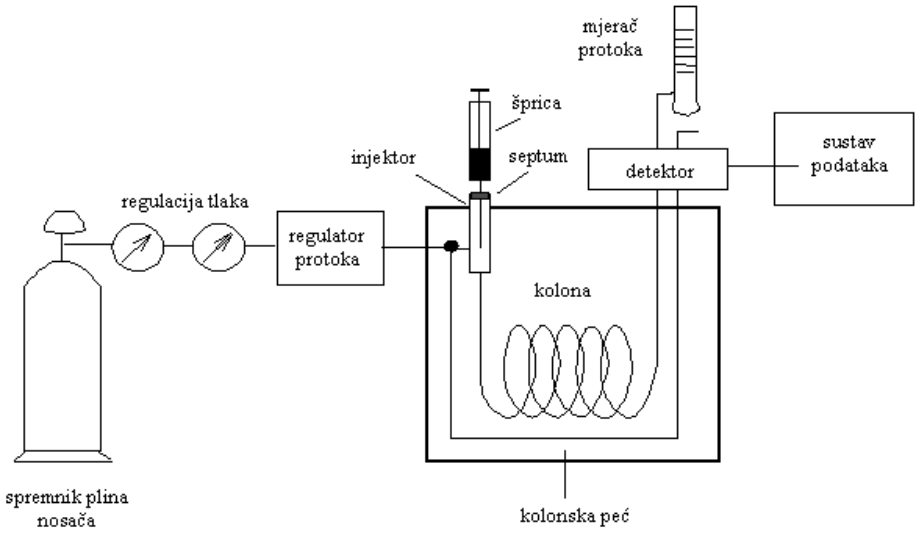
1.4. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda kojom se komponente uzorka raspodjeljuju između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Pokretna faza može biti tekućina, plin ili superkritični fluid, a stacionarnu fazu čine čvrste čestice ili tanki sloj tekućine adsorbiran na čvrstu podlogu velike površine. Osnovu kromatografskog odjeljivanja čini odjeljivanje komponenata uzorka vođenim mobilnom fazom kroz stacionarnu u kojoj se pojedine komponente različito zadržavaju (42,43).

Postoji više podjela kromatografskih metoda. Jedna od glavnih podjela je s obzirom na način ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze, prema kojoj razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju. Kromatografije se mogu podijeliti i s obzirom na prirodu ravnoteže između dviju faza, i to na razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu, kromatografiju isključenjem te kromatografiju ionske izmjene. Konačno, prema agregatnom stanju pokretne faze, razlikujemo plinsku i tekućinsku kromatografiju. Kod plinske kromatografije pokretna faza je inertan plin, a kod tekućinske kromatografije tekućina male viskoznosti. Pokretna faza može biti i gusti plin (fluid) iznad svoje kritične temperature i tlaka, što je karakteristika fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima (44).

1.4.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (*engl.* Gas chromatography, GC) često je korištena instrumentalna tehnika za odjeljivanje komponenti iz matice uzorka, ali i ispitivanju čistoće tvari (45). Prednost plinske kromatografije pred drugim kromatografskim tehnikama je u relativno kratkom vremenu analize, ali i vrlo malom volumenu uzorka potrebnom za analizu (46). Odjeljivanje komponenti odvija se u plinskom kromatografu, čiji su osnovni dijelovi prikazani na slici 4.



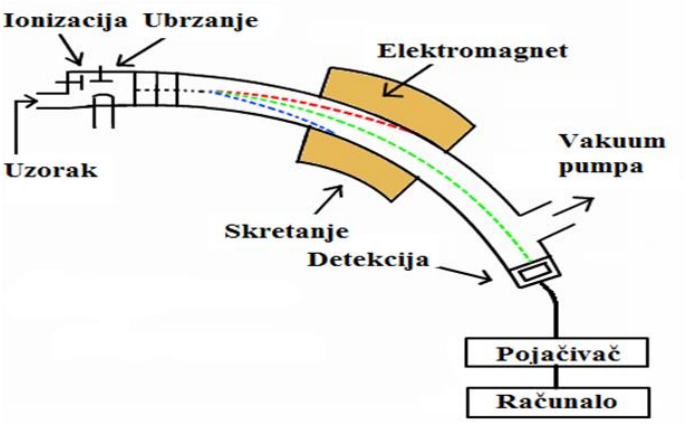
Slika 4. Shematski prikaz plinskog kromatografa (47).

Uzorak za analizu prevodi se u plinovito stanje, injektira se na početak kolone, te nošen inertnim plinom nosiocem prolazi kroz kolonu. Komponente uzorka razdvajaju se temeljem različitih fizikalno-kemijskih svojstava te u različitom vremenu dolaze do detektora. Kao plinovi nosioci najčešće su korišteni inertni plinovi i to: helij, dušik, argon ili ugljikov dioksid. Izbor uglavnom ovisi o vrsti detektora. Odabir injektora ovisi o karakteristikama uzorka i samog analita, ali i o vrsti kolone i njene stacionarne faze. Kolone za plinsku kromatografiju mogu biti punjene i kapilarne. Kromatografski detektori moraju omogućiti osjetljivo i/ili selektivno dokazivanje, a kao poželjna svojstva navode se i niska granica detekcije, odziv u širokom koncentracijskom rasponu kao i neosjetljivost na promjene u temperaturi i brzini protoka otapala. Najčešće korišteni su plameno-ionizacijski detektor i spektrometar masa (46,48,49).

1.4.2. Spektrometrija masa

Spektrometar masa instrument je kojim se mjere molekulske mase uzorka, shematski je prikazan na slici 5. Uzorak se uvodi u ionizator gdje se molekule i/ili fragmenti molekula ioniziraju, a potom se u analizatoru razdvajaju prema odnosu mase i naboja (m/z). Tako

razdvojeni ioni dolaze na detektor koji proizvodi električni signal i potom ga pohranjuje u obliku masenog spektra odnosno omjera m/z (48).

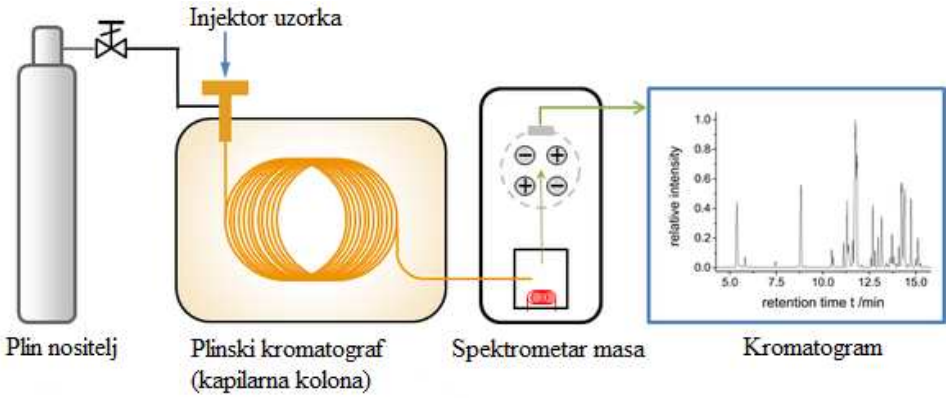


Slika 5. Shematski prikaz osnovnih dijelova spektrometra masa (50).

1.4.3. Vezana tehnika plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Dok plinska kromatografija predstavlja metodu odjeljivanja i omogućuje kvantitativnu analizu, spektrometrija masa olakšava identifikaciju nepoznatog analita i služi za kvalitativnu analizu. Povezivanjem ovih dvaju procesa u jedan instrument, razvijena je vezana tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (*engl.* Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) koja danas predstavlja zlatni standard u brojnim analizama (36,51).

Prednosti GC-MS tehnike su visoka osjetljivost, preciznost, pouzdanost, selektivnost, te male količine uzoraka potrebnih za analizu. S druge strane, visoka temperatura injektora, potrebna da bi se uzorak preveo u plinovito stanje, predstavlja veliki nedostatak ove metode jer pri takvim uvjetima dolazi do razgradnje termički nestabilnih komponenti uzorka. Hlapljivost i termostabilnost komponenti mogu se povećati postupkom derivatizacije. Dodatni nedostatak je dugotrajan i skup postupak pripreme (52).



Slika 6. Shematski prikaz osnovnih dijelova vezane GC-MS tehnike (53).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada su:

1. Razviti metodu za simultano kvantitativno određivanje sintetskih kanabinoida: JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-210 i ADB-PINACA.

2. Primijeniti razvijenu metodu za simultano određivanje sintetskih kanabinoida na kliničke biološke uzorke mokraće.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

Acetatni pufer (pH=4,0), Merck, Darmstadt, Njemačka

BSTFA + 1% TMCS, Supelco, Sigma Aldrich, SAD

Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev hidroksid, 4M, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev volframat dihidrat, Merck, Darmstadt, Njemačka

Octena kiselina, koncentrirana, Merck, Darmstadt, Njemačka

Voda, redestilirana, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

3.2. Referentni standardi sintetskih kanabinoida

U ovom radu korišteno je 5 standardnih otopina sintetskih kanabinoida. Uz njihovo skraćeno ime, u tablici 2 naveden je i kemijski naziv te čistoća.

Tablica 2. Popis korištenih standardnih otopina sintetskih kanabinoida.

	Skraćeno ime	Kemijsko ime	Čistoća
1.	JWH-018	(1-pentil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥98%
2.	JWH-019	[5-(2-fluorofenil)-1-pentil-1H-pirol-3-il]-1-naftalenilmetanon	≥96%
3.	JWH-073	(1-butil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanon	≥97%
4.	JWH-210	(4-etil-1-naftalenil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanon	≥98%
5.	ADB-PINACA	N-[1-(aminokarbonil)-3,3-dimetilpropil]-1-pentil-1H-indazol-3-karboksamid	≥98%

3.3. Priprema referentnih standardnih otopina za toksikološku analizu koristeći GC-MS tehniku

Osnovne standardne otopine sintetskih kanabinoida prvotno su razrijeđene u metanolu kako bi dobili standardne otopine nižih koncentracija (prikazano u tablici 3). JWH-018, JWH-019 i JWH-073 standardi su početne koncentracije 5 mg/mL (5000 mg/L), dok početna koncentracija preostala dva standarda, JWH-210 i ADB-PINACA, iznosi 1 mg/mL (1000 mg/L). Razrijeđenjem početnih standardnih otopina dobivene su koncentracije 500 mg/L odnosno 100 mg/L, te su daljnjim razrjeđivanjem dobivene koncentracije od 50 mg/L odnosno 10 mg/L, do konačne koncentracije od 5 mg/L. Dodatkom tako pripremljenih standardnih otopina u biološki uzorak mokraće, koji je dao negativne rezultate na prisustvo kanabinoida, kao i na prisustvo ostalih sredstava ovisnosti, pripremljene su umjerene krivulje za svaki pojedini standard (prikazano u tablici 4).

Tablica 3. Priprema standardnih otopina za umjerne krivulje sintetičkih kanabinoida.

Standardi	**Početna koncentracija standarda γ_0 (mg/L)**	**Koncentracije otopina standarda nakon razrijeđenja (mg/L)**		
		γ_1	**γ_2**	**γ_3**
JWH-018	5000	500	50	5
JWH-019	5000	500	50	5
JWH-073	5000	500	50	5
JWH-210	1000	100	10	/
ADB-PINACA	1000	100	10	/

Tablica 4. Priprema točaka za umjerne krivulje sintetičkih kanabinoida.

Umjerne točke standardnih otopina (mg/L)	**Volumen pripremljenih standardnih otopina (µL)**					**Volumen mokraće (µL)**
	JWH-018 (γ_3)	**JWH-019 (γ_3)**	**JWH-073 (γ_3)**	**JWH-210 (γ_2)**	**ADB-PINACA (γ_2)**	
0,8	160	160	160	80	80	360
0,6	120	120	120	60	60	520
0,5	100	100	100	50	50	600
0,2	40	40	40	20	20	840
0,1	20	20	20	10	10	920

3.4. Biološki uzorci za toksikološku analizu

U ovom istraživanju ekstrahirani su i analizirani biološki uzorci mokraće. Za dokazivanje prisustva sintetskih kanabinoida, kao i za njihovu kvantitativnu analizu, u biološke uzorke mokraće, analizirane i dokazano negativne na prisustvo sredstava ovisnosti, dodani su nepoznati volumeni pripremljenih standardnih otopina sintetskih kanabinoida.

3.5. Postupak pripreme bioloških uzoraka za kromatografsku analizu LLE metodom

Ekstrakcija tekuće-tekuće metoda je kojom se biološki uzorci pripremaju za kromatografsku analizu. U svaku tubicu za ekstrakciju dodano je 1,8 g natrijeva volframat-dihidrata i 3 mL ekstrakcijske smjese diklormetan:etilacetat (*v*/*v*=3:1). Uzorci za analizu zaluženi su dodatkom 150 µL 4M natrijeve lužine i ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi. U uzorke je potom dodano 200 µL koncentrirane octene kiseline i 2 mL acetatnog pufera (pH=4). Tako pripremljene otopine prebačene su u prethodno pripremljene tubice za ekstrakciju. Uzorci su ekstrahirani na rotoru 10 minuta koristeći 50 rpm-a, a potom centrifugirani 15 minuta na 2600 rpm-a. Izdvojeno je 2,5 mL organske faze te evaporirano u digestoru do suha. Uzorci su razrijeđeni u 30 µL kloroforma te prebačeni u staklene tubice za

GC-MS analizu. Uzorci su derivatizirani dodatkom derivatizacijskog sredstva BSTFA + 1% TMCS.

3.6. Instrumentalna analiza GC-MS metodom

Za analizu uzoraka, kao i za izradu umjernih krivulja, korišten je plinski kromatograf sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010, prikazan na slici 7. Upotrebljena je kapilarna kolona plinskog kromatografa Restek, RTx–5MS, dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25 μm. Obrada podataka, kao i ukupan rad instrumenta, kontrolirani su GCMS Solution računalnim programom.



Slika 7. Plinski kromatograf s masenim spektrometrom, Shimadzu GCMS-QP2010 (54).

3.6.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone

Pripremljeni ekstrakti kromatografski su analizirani koristeći vezanu tehniku plinsku kromatografiju sa spektrometrom masa kojom je omogućeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (*engl. „*Total ion chromatogram“, TIC) u masenom području 50-600 m/z, kao i snimanje samo odabranih iona (*engl.* Single ion monitoring, SIM). Optimiran je i temperaturni program.

Optimalni radni uvjeti:

- Volumen injektiranja: 1 μL (splitless mode)
- Temperatura injektora: 250 ^{0}C
- Protok plina nosioca: 1 mL/min

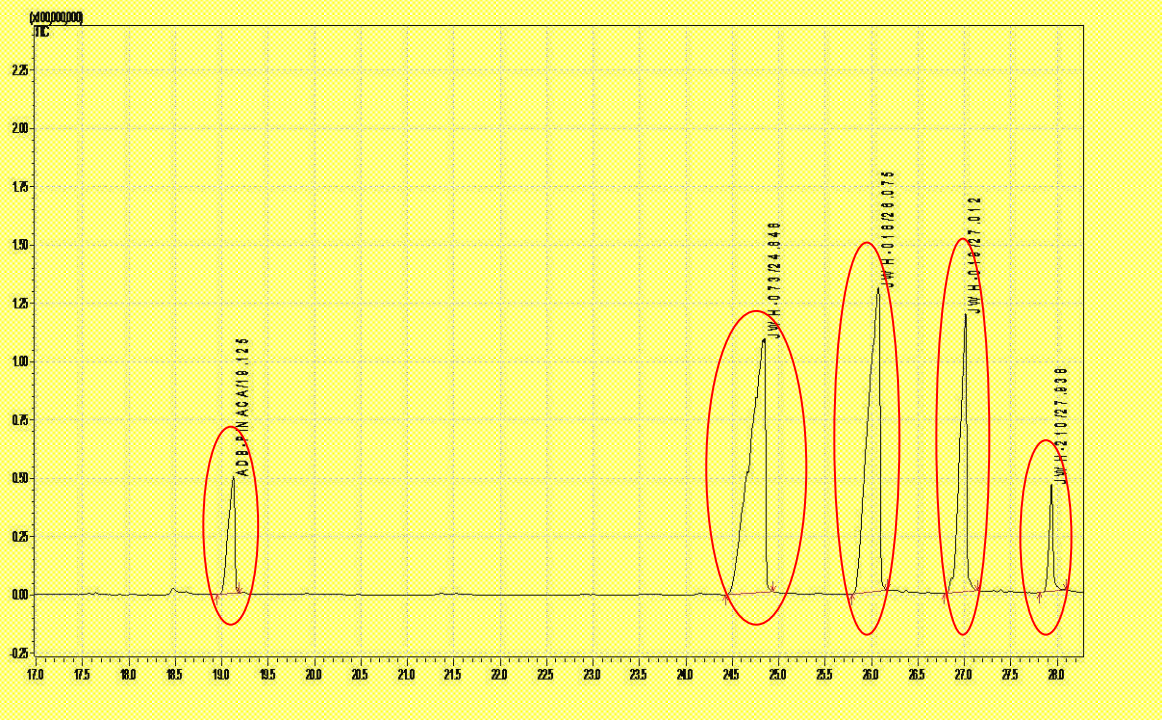
Temperaturni program:

1) 90 ^{0}C izotermno 0,5 min
2) 5 ^{0}C/min do 220 ^{0}C
3) 320 ^{0}C izotermno 5 min

4. REZULTATI

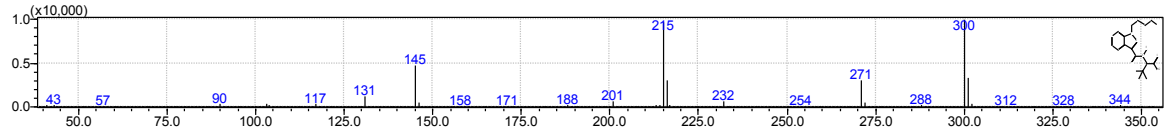
4.1. Analiza referentnih standarda sintetskih kanabinoida

Na slici 8 prikazan je ukupni ionski kromatogram dobiven GC-MS analizom referentnih standarda sintetskih kanabinoida (ADB-PINACA, JWH-073, JWH-018, JWH-019 i JWH-210). U grafičkom prikazu kromatograma na osi x prikazano je vrijeme zadržavanja standarda u koloni (retencijsko vrijeme, RT) u minutama, a na osi y odaziv detektora, odnosno intenzitet signala.

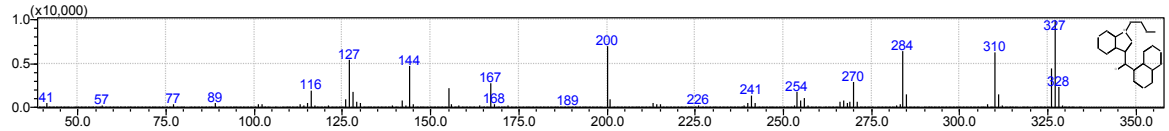


Slika 8. Uvećani prikaz dijela ukupnog ionskog kromatograma standarda sintetskih kanabinoida, analiziranih GC-MS tehnikom, s karakterističnim signalima i retencijskim vremenima izraženim u minutama: ADB-PINACA (RT=19,125), JWH-073 (RT=24,848), JWH-018 (RT=26,075), JWH-019 (RT=27,012) i JWH-210 (RT=27,936).

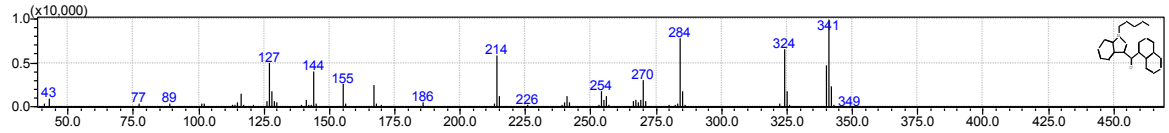
Na slikama 9-13 prikazani su spektri masa za analizirane referentne standarde sintetskih kanabinoida. Os x prikazuje vrijednost odnosa mase i naboja (m/z) dok os y prikazuje njihov intenzitet. Dobiveni spektri masa uspoređeni su sa spektrima pohranjenim u bazama podataka.



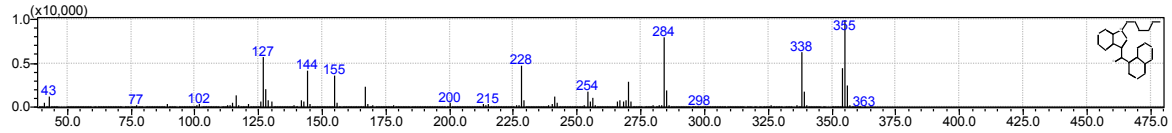
Slika 9. Karakterističan spektar masa za ADB-PINACA (m/z 215, 300, 145).



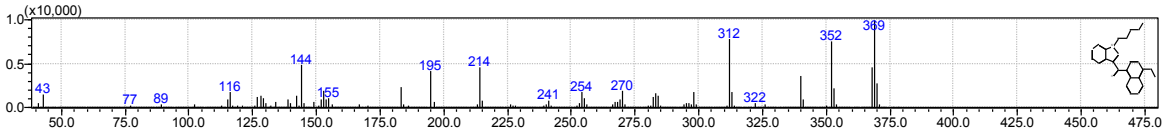
Slika 10. Karakterističan spektar masa za JWH-073 (m/z 327, 200, 284, 310).



Slika 11. Karakterističan spektar masa za JWH-018 (m/z 341, 127, 214, 284).



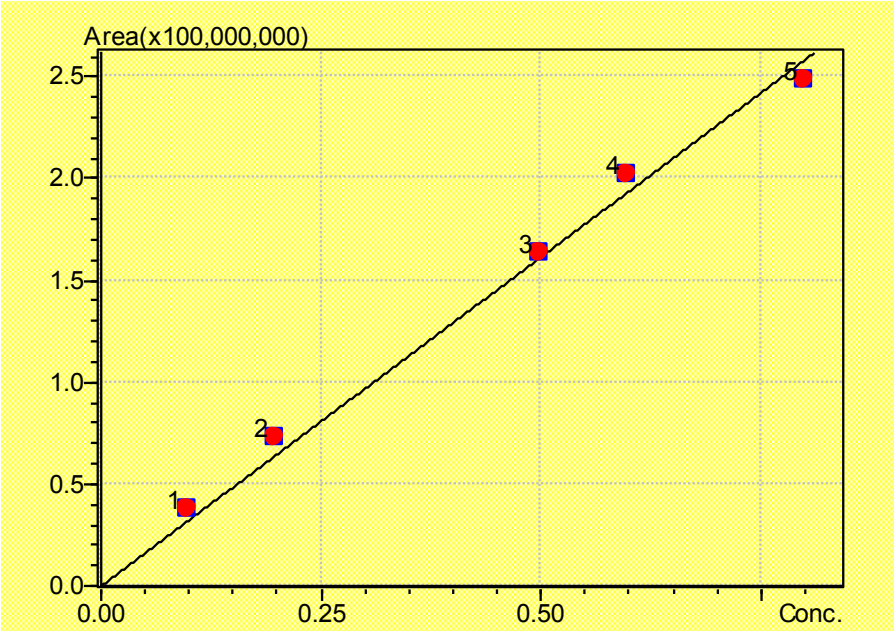
Slika 12. Karakterističan spektar masa za JWH-019 (m/z 355, 284, 338, 127, 214).



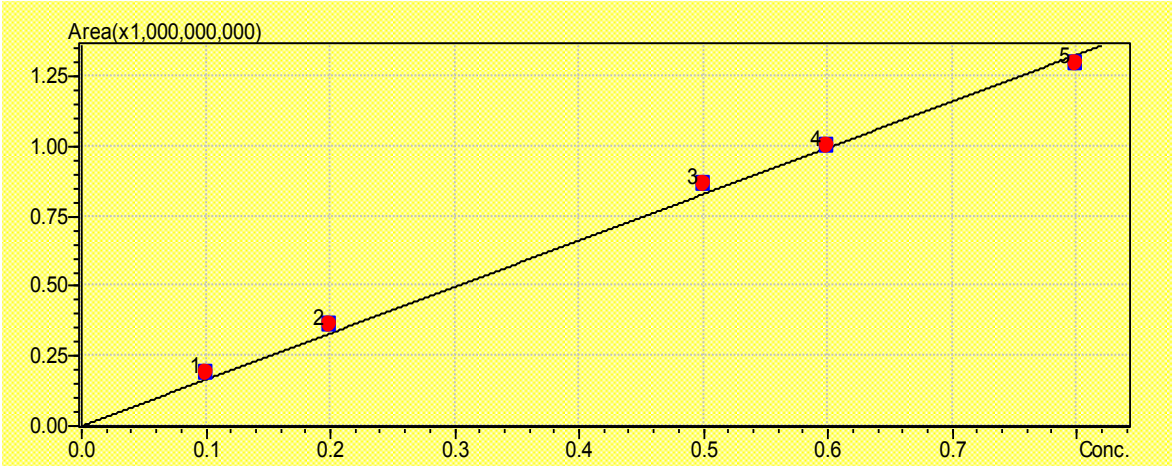
Slika 13. Karakterističan spektar masa za JWH-210 (m/z 369, 352, 312, 214).

4.2. Umjerne krivulje analiziranih sintetskih kanabinoida

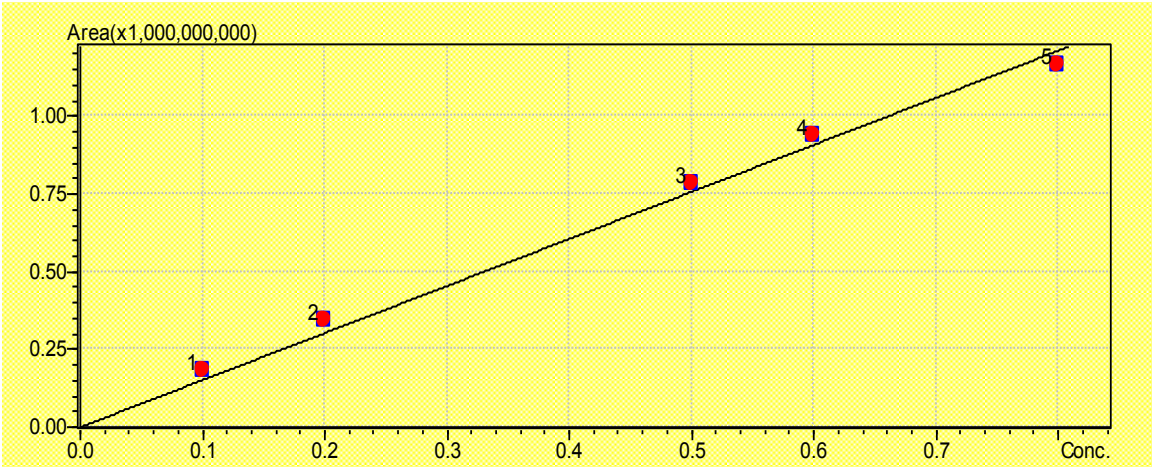
Dodatkom pripremljenih standardnih otopina sintetskih kanabinoida u analizirane negativne uzorke mokraće izrađene su otopine sljedećih koncentracija: 0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L i 0,1 mg/L (detaljnije opisano u *Materijal i metode*, Poglavlje 3). Korištenjem zadanih radnih uvjeta i navedenih koncentracija pripremljenih umjernih otopina, određene su umjerne krivulje za analizirane sintetske kanabinoide, prikazane na slikama 14-18. Korištenjem izrađenih umjernih krivulja moguće je odrediti različite koncentracije sintetskih kanabinoida u biološkim i nebiološkim uzorcima.



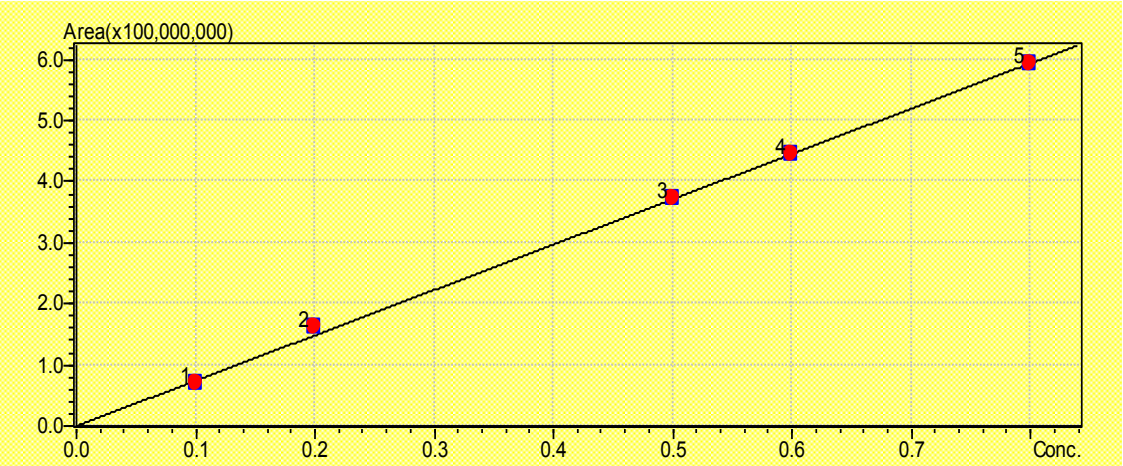
Slika 14. Prikaz dobivene umjerne krivulje za ADB-PINACA (koncentracije 0,1;0,2;0,5;0,6;0,8 mg/L).



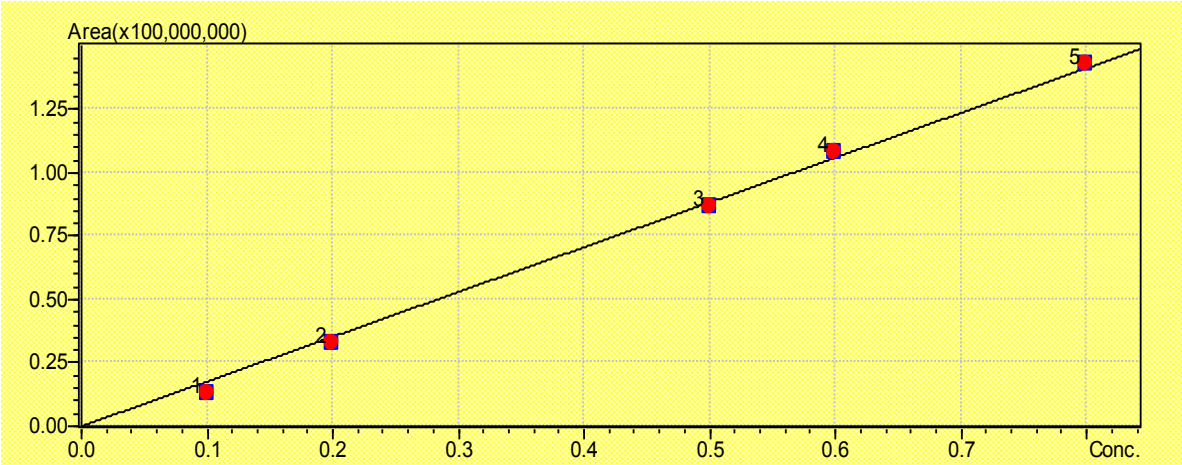
Slika 15. Prikaz dobivene umjerne krivulje za JWH-073 (koncentracije 0,1;0,2;0,5;0,6;0,8 mg/L).



Slika 16. Prikaz dobivene umjerne krivulje za JWH-018 (koncentracije 0,1;0,2;0,5;0,6;0,8 mg/L).



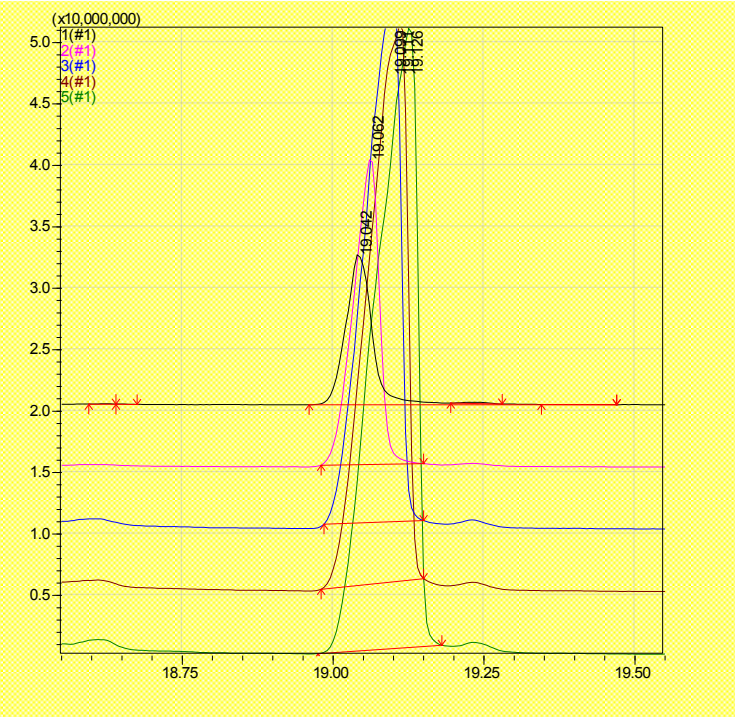
Slika 17. Prikaz dobivene umjerne krivulje za JWH-019 (koncentracije 0,1;0,2;0,5;0,6;0,8 mg/L).



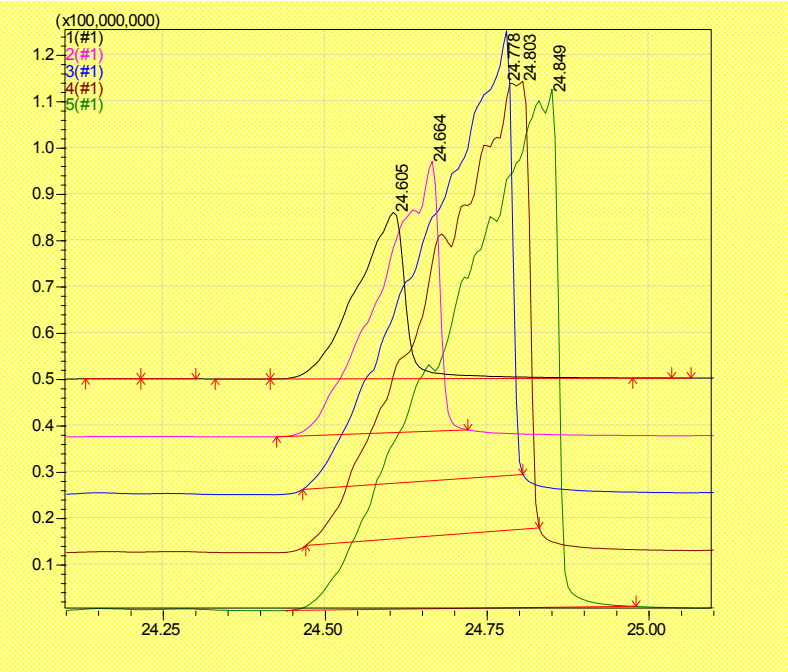
Slika 18. Prikaz dobivene umjerne krivulje za JWH-210 (koncentracije 0,1;0,2;0,5;0,6;0,8 mg/L).

4.3. Usporedba različitih koncentracija analiziranih sintetskih kanabinoida

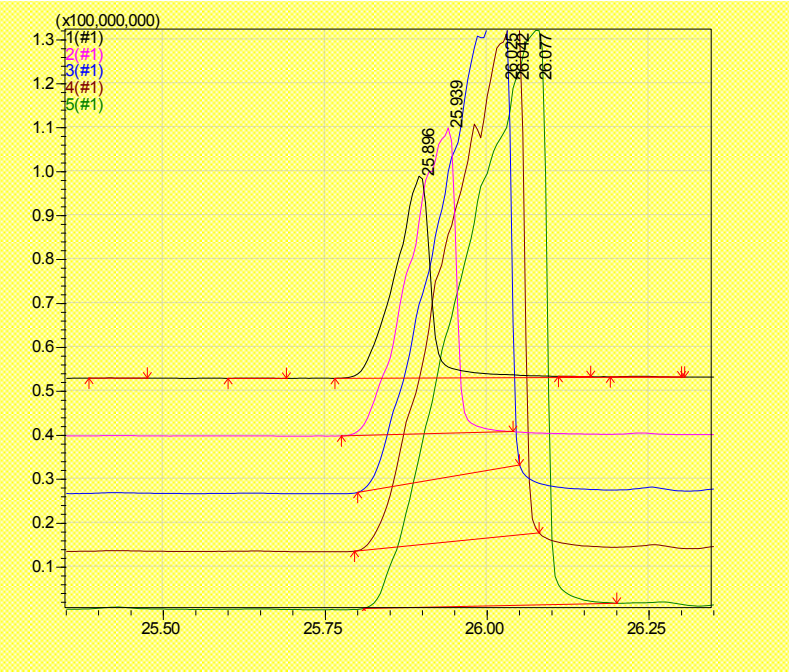
Na slikama 19-23 prikazana je usporedba različitih koncentracija analiziranih sintetskih kanabinoida (0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L). Iz grafičkog prikaza može se uočiti da se standard JWH-210 (slika 23), pri svim analiziranim koncentracijama, detektira na gotovo istom retencijskom vremenu, dok preostali standardi, a posebice JWH-073 (slika 20), pri nižim koncentracijama daju nešto kasniji odziv na detektoru, koji nema utjecaja na visinu, odnosno površinu signala.



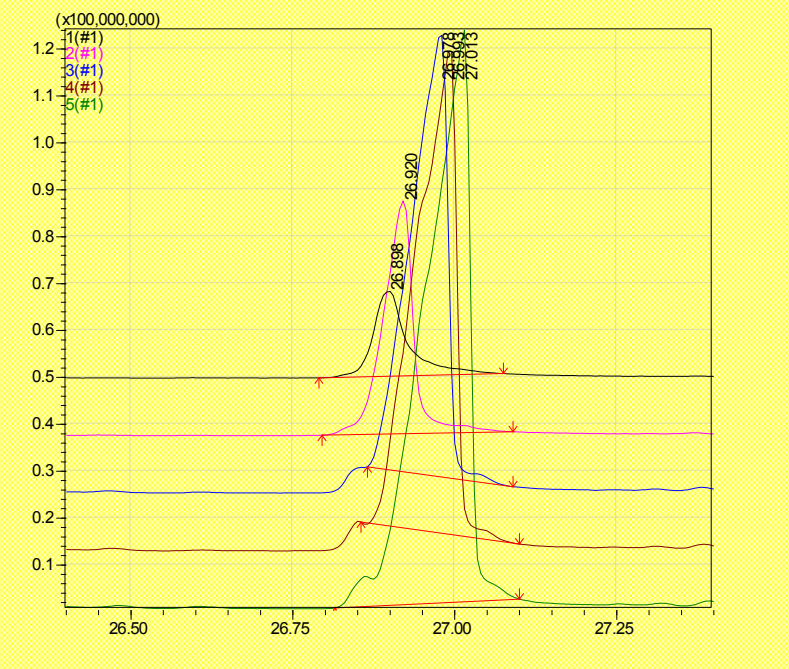
Slika 19. Prikaz usporedbe 5 različitih koncentracija standarda ADB-PINACA (0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L).



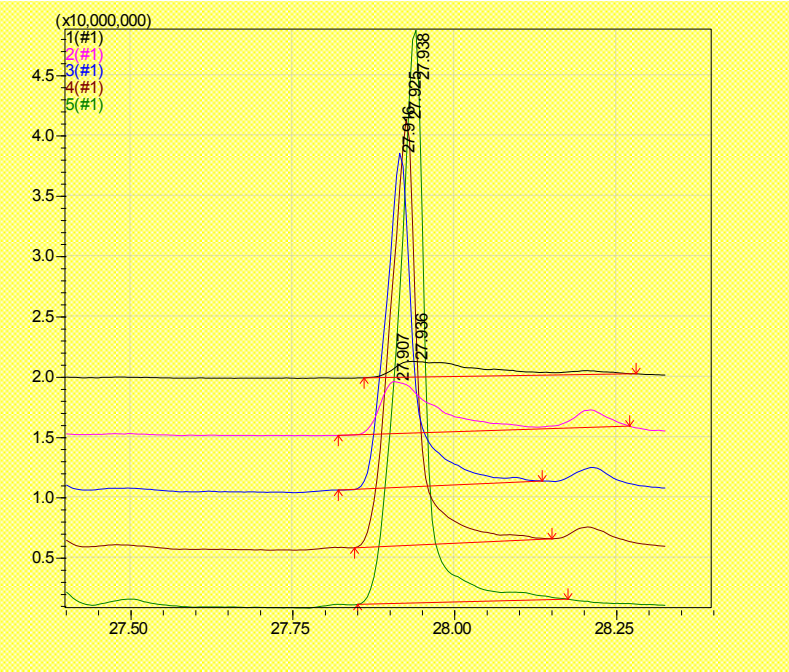
Slika 20. Prikaz usporedbe 5 različitih koncentracija standarda JWH-073 (0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L).



Slika 21. Prikaz usporedbe 5 različitih koncentracija standarda JWH-018 (0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L).

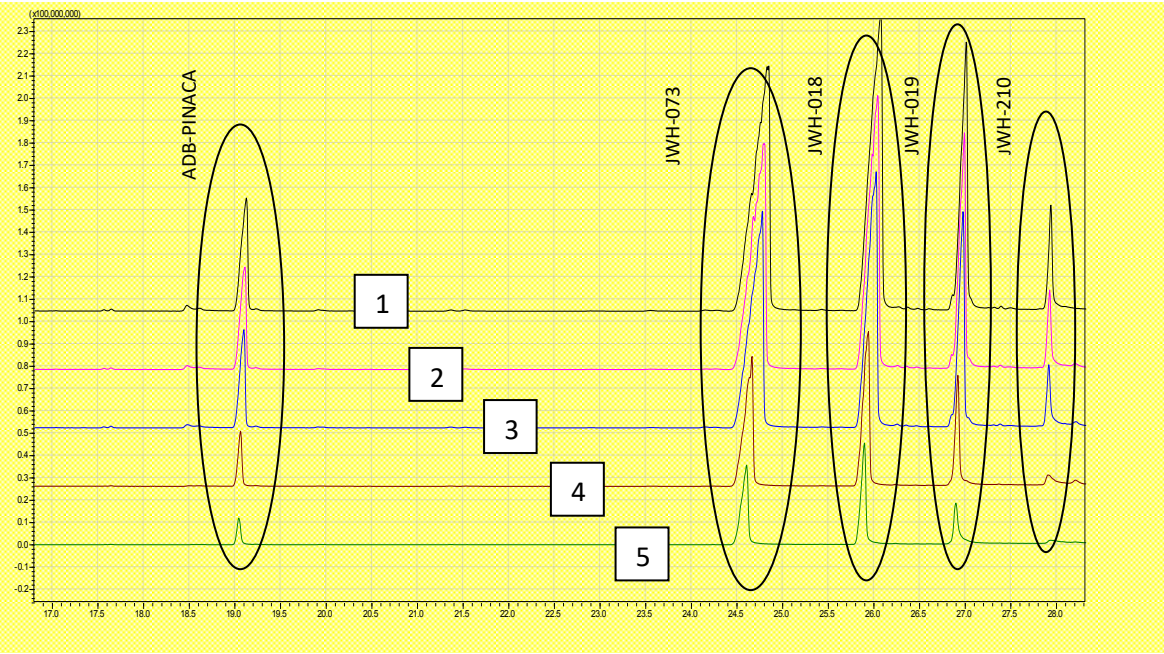


Slika 22. Prikaz usporedbe 5 različitih koncentracija standarda JWH-019 (0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L).



Slika 23. Prikaz usporedbe 5 različitih koncentracija standarda JWH-210 (0,8 mg/L, 0,6 mg/L, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,1 mg/L).

Usporedbom rezultata analize različitih koncentracija analiziranih sintetskih kanabinoida (slika 24) vidljivo je da standardi JWH-073 i JWH-018 pri najnižoj koncentraciji od 0,1 mg/L daju puno izražajnije pikove nego standardi ADB-PINACA i JWH-019. Također je vidljivo da se standard JWH-210 vrlo teško detektira pri tako niskim koncentracijama.

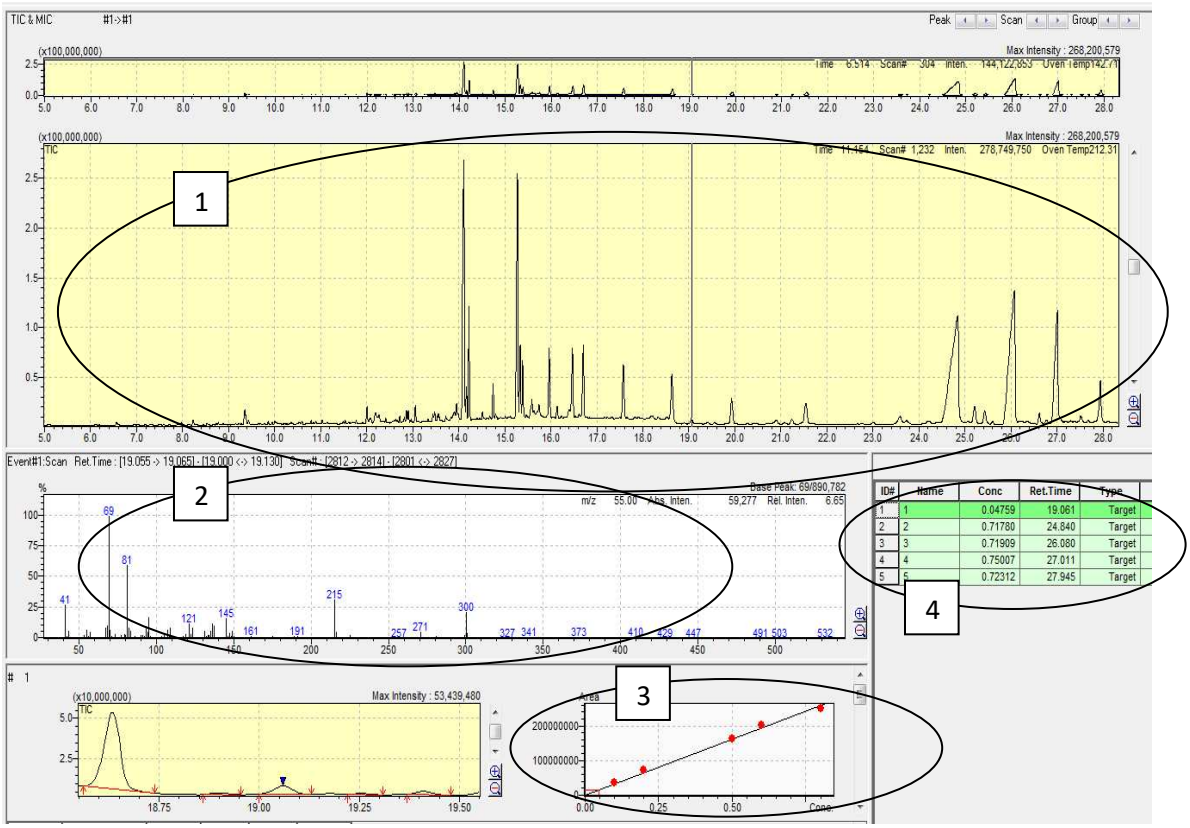


Slika 24. Prikaz usporedbe pet kromatograma dobivenih analizom pripremljenih kalibracijskih otopina različitih koncentracija. Kromatogrami su označeni brojevima 1-5 i to: 1-koncentracija 0,8 mg/L; 2-koncentracija 0,6 mg/L; 3-koncentracija 0,5 mg/L; 4-koncentracija 0,2 mg/L i 5-koncentracija 0,1 mg/L.

4.4. Kvantitativna analiza sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće

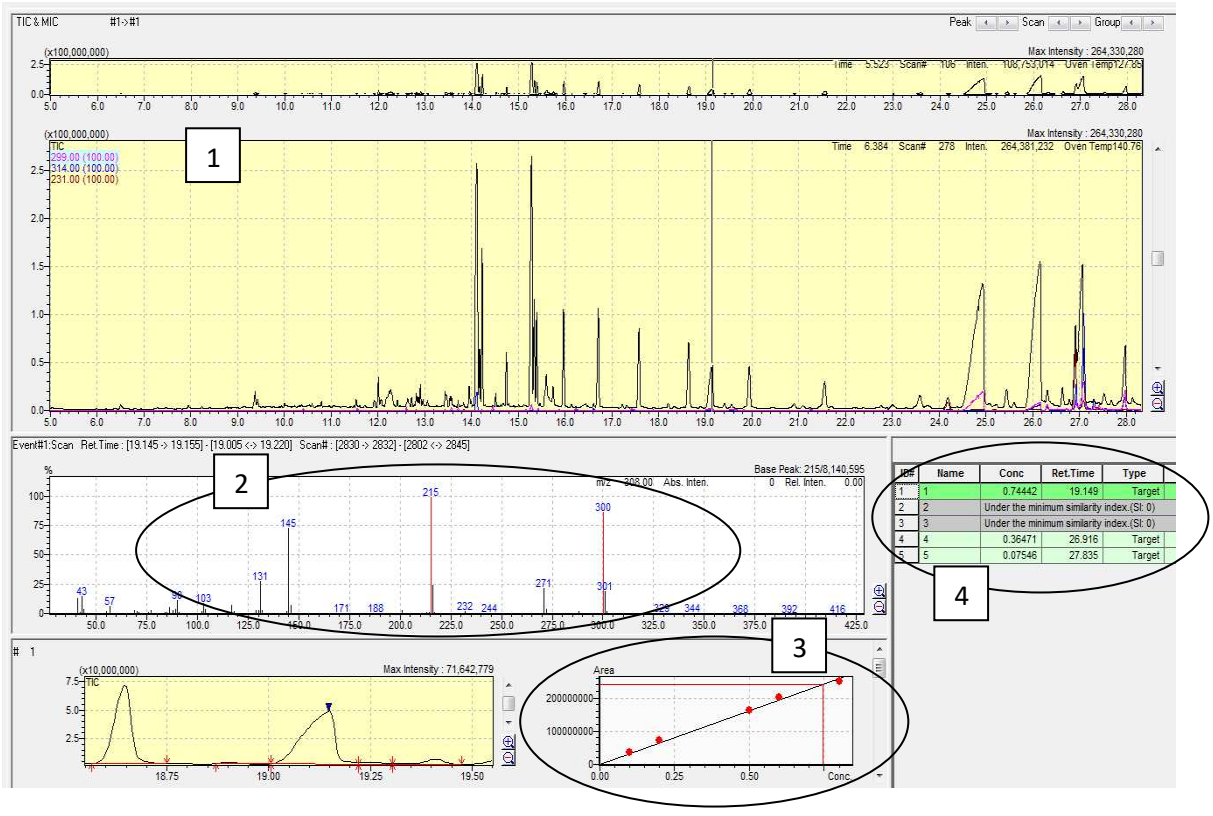
Nakon GC-MS analize referentnih standarda sintetskih kanabinoida i izrade umjernih krivulja, analizirani su biološki uzorci mokraće pripremljeni i obrađeni kako je opisano u *Materijal i metode* (Poglavlje 3). Dobiveni kromatogrami prikazani su na slikama 25 i 26. Detektirani sintetski kanabinoidi zabilježeni su na svojim karakterističnim retencijskim vremenima koja su prikazana na osi x, a intenzitet signala, proporcionalan njihovoj koncentraciji u ispitivanom uzorku, prikazan je na osi y. Pomoću prethodno izrađenih umjernih krivulja, izračunate su masene koncentracije pronađenih sintetskih kanabinoida, također prikazano na slikama 24 i 25.

U ispitivanom uzorku 1 dokazano je prisustvo svih 5 sintetskih kanabinoida od interesa: ADB-PINACA (RT=19,061), JWH-073 (RT=24,840), JWH-018 (RT=26,080), JWH-019 (RT=27,011) i JWH-210 (RT=27,945). Masene koncentracije pronađenih sintetskih kanabioida u analiziranom uzorku iznosile su: 0,04759 mg/L za ADB-PINACA; 0,71780 mg/L za JWH-073; 0,71909 mg/L za JWH-018; 0,75007 mg/L za JWH-019 i 0,72312 mg/L za JWH-210.



Slika 25. Prikaz dobivenih rezultata (oznake 1-4) analize biološkog uzorka broj 1: kromatogram (1), spektar masa sintetskog kanabinoida na određenom retencijskom vremenu (2), umjerna krivulja (3) i masena koncentracija dokazanog sintetskog kanabinoida (4).

U ispitivanom uzorku 2 detektirano je i potvrđeno prisustvo ADB-PINACA (RT=19,149), JWH-019 (RT=26,916) i JWH-210 (RT=27,835). Preostala 2 sintetska kanabinoida od interesa, JWH-073 i JWH-018, nisu dokazana u uzorku 2. Masene koncentracije potvrđenih sintetskih kanabinoida u analiziranom uzorku iznosile su: 0,74442 mg/L za ADB-PINACA; 0,36471 mg/L za JWH-019 i 0,07546 mg/L za JWH-210. Iz navedenog proizlazi da su koncentracije JWH-073 i JWH-018 bile niže od njihovog limita detekcije te stoga nisu detektirani i identificirani u ovom uzorku.



Slika 26. Prikaz dobivenih rezultata (oznake 1-4) analize biološkog uzorka broj 2: kromatogram (1), spektar masa sintetskog kanabinoida na određenom retencijskom vremenu (2), umjerna krivulja (3) i masena koncentracija dokazanog sintetskog kanabinoida (4).

5. RASPRAVA

U ovom radu prikazana je GC-MS metoda za simultano kvantitativno određivanje pet sintetskih kanabinoida (ADB-PINACA, JWH-073, JWH-018, JWH-019 i JWH-210) u biološkim uzorcima. Kao što je vidljivo iz dobivenih rezultata, u uzorku 1 (slika 25) dokazano je prisustvo svih pet sintetskih kanabinoida od interesa, dok je u uzorku 2 dokazano prisustvo ADB-PINACA, JWH-019 i JWH-210. Preostala 2 sintetska kanabinoida od interesa, JWH-073 i JWH-018, nisu određeni u uzorku 2 (slika 26). Detektirani sintetski kanabinoidi potvrđeni su usporedbom dobivenih spektara masa sa spektrima masa iz baze podataka, a njihove masene koncentracije izračunate su pomoću prethodno određenih kalibracijskih krivulja. Dobiveni se rezultati mogu pripisati niskim koncentracijama standarda JWH-073 i JWH-018 u uzorku 2, ali i činjenici da GC-MS, iako predstavlja metodu izbora za identifikaciju i kvantifikaciju sintetskih kanainoida u biološkim uzorcima, ipak ima neke nedostatke.

Jedan od glavnih nedostataka ove metode je ograničena mogućnost ispitivanja termički labilnih spojeva. Stoga identifikacija nekih spojeva, napose ciklopropilnih i esterskih analoga, gotovo nije moguća. Kromatogrami takvih spojeva sadržavaju više signala, a maseni spektri za te signale imaju slične spektre masa (55). Ecre D. i suradnici analizirali su standarde spojeva koji sadrže ciklopropilni prsten, UR-144 i XLR-11 i dobili dva visoka odziva na kromatogramu. Zaključili su da je prvi signal izvorna, odnosno ishodišna molekula, a drugi termodinamički produkt s otvorenim ciklopropilnim prstenom. Pretpostavili su da do otvaranja ciklopropilnog prstena dolazi i pri toplini, koja se razvija konzumacijom pušenjem, ovih sintetskih kanabinoida što otežava njihovu detekciju u biološkim uzorcima (56). Tsujikawa K. i suradnici proučavali su utjecaj različitih parametara, kao što su odabir injektora i temperature injektiranja, na toplinsku degradaciju QUPIC-a, novog esterskog analoga sintetskih kanabinoida. Uočili su da je degradacija značajno smanjena, a osjetljivost metode povećana, pri primjeni splitless injektora, temperaturi injektiranja od 250 ^{0}C te deaktivaciji *linera* staklenom vunom *(staklena cjevčica - unutarnji dio injektora kroz koji prolazi uzorak).* Također, dokazali su da je moguće primjenom split injektora degradaciju uzorka u potpunosti izbjeći (57). Kako se u ovom radu koristio splitless injektor, a temperatura injektiranja iznosila je 250 ^{0}C, kao i u prethodno spomenutom radu, moguće je da su odabrani radni uvjeti pridonijeli dobivenim rezultatima analize.

Osim nemogućnosti detekcije termički nestabilnih spojeva, primjenom ove metode može biti otežana i detekcija spojeva s polarnom skupinom, kao što su amino ili hidroksilna skupina, zbog moguće interakcije sa stacionarnom fazom kolone (55).

Jedan od načina kako prevladati navedene probleme je primjena postupka derivatizacije. Derivatizacijom se mijenjaju funkcionalne skupine i kemijska svojstva molekula, čineći ih manje reaktivnim i stabilnijima. Stoga se postupak derivatizacije koristi za povećanje osjetljivosti i specifičnosti (55). U ovom radu, prije same GC-MS analize, uzorci su derivatizirani primjenom BSTFA + 1% TMCS derivatizacijskog sredstva. Moguće je da je to razlog što se u uzorku 2, unatoč vrlo niskoj koncentraciji dodanih standarda, dokazalo prisustvo tri sintetska kanabinoida (ADB-PINACA, JWH-019 i JWH-210). Međutim, derivatizacija uzoraka pokazuje i određene nedostatke. Postupak derivatizacije predstavlja dodatan korak kojim se produžuje vrijeme analize i zahtjeva uporaba dodatnih kemikalija. Iz tih razloga, neke studije prednost daju tekućinskoj kromatografiji sa spektrometrijom masa (*engl.* Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS). Osim što se izbjegava derivatizacija, omogućena je analiza nehlapljivih, termički labilnih i polarnih spojeva. No, kao i kod GC-MS analize, veliki problem predstavlja identifikacija strukturno sličnih i izomernih oblika novih analoga, zbog čega se često dobivaju vrlo slični ili preklapajući spektri masa što otežava analizu. Pogrešna identifikacija takvih spojeva može se izbjeći korištenjem tandemske masene spektrometrije, kao što je LC-MS/MS, čiji je osnovni cilj postići dodatnu fragmentaciju koja će omogućiti bolje odijeljivanje i kvalitetnije određivanje strukture analiziranih iona. Stoga se LC-MS/MS ističe kao metoda izbora za detekciju metabolita sintetskih kanabinoida u uzorku mokraće (55). Emerson B. i suradnici u svom su radu usporedili razvijenu GC-MS metodu s LC-MS/MS metodom za određivanje metabolita JWH-018 u uzorku mokraće. Dobiveni rezultati analize vrlo su slični, zadovoljavajuće osjetljivosti i ponovljivosti, čime su potvrdili da se i GC-MS tehnika može koristiti za detekciju metabolita JWH-018, ali i ostalih JWH spojeva, u uzorku mokraće (58).

Ovom studijom također je potvrđen izbor GC-MS tehnike za određivanje sintetskih kanabinoida (ADB-PINACA, JWH-073, JWH-018, JWH-019 i JWH-210) u biološkim uzorcima mokraće. No, dobiveni rezultati ne mogu se poistovjetiti s realnim biološkim uzorcima obzirom da su analizirani sintetski kanabinoidi izravno dodani u prethodno negativne uzorke mokraće. Stoga se u analiziranim uzorcima ne pronalaze metaboliti sintetskih kanabinoida kao što je to u realnim uzorcima, izuzetim nakon konzumacije.

Sve veća pojavnost novih sintetskih kanabinoida i njihovih nepoznatih metabolita zahtjeva kontinuirani razvoj metoda za njihovo određivanje. Obzirom da je za njih karakteristično brzo i vješto izmijenjivanje kemijske strukture, vrlo ih je teško detektirati i identificirati postojećim probirnim testovima i analitičkim tehnikama. Da bi se prilagodili

promjenama na tržištu, laboratoriji moraju vrlo brzo sintetizirati nove referentne standarde, ali i kontinuirano unaprijeđivati i validirati analitičke tehnike za detekciju i identifikaciju tih spojeva u zaplijenjenim nebiološkim i biološkim uzorcima. Detekcija sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima predstavlja izazov iz još nekoliko razloga. Naime, kako su to vrlo potentni spojevi, njihove doze i koncentracije u organizmu su vrlo niske. Opsežno se metaboliziraju tako da se u uzorku mokraće pronalaze uglavnom njihovi metaboliti, a ne ishodišni spojevi, što dodatno otežava detekciju obzirom da nebiološki uzorak često nije dostupan, a spojevi su novo sintetizirani pa se ne zna ni o kojem se početnom spoju radi. K tome, većina ovih spojeva ima zajedničke metaboličke puteve što otežava tumačenje rezultata provedene analize (55). Stoga je razvoj novih metoda za dokazivanje sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima neophodan i predstavlja veliki izazov za kliničke i forenzičke laboratorije.

6. ZAKLJUČCI

1. Prikazanom GC-MS metodom potvrđeno je prisustvo analiziranih sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće.
2. ADB-PINACA, JWH-073, JWH-018, JWH-019 i JWH-210 potvrđeni su u ispitivanom uzorku 1, dok su u ispitivanom uzorku 2 potvrđeni ADB-PINACA, JWH-019 i JWH-210.
3. Postupak derivatizacije, proveden prije same GC-MS analize, doprinosi većoj stabilnosti i detektibilnosti ispitivanih spojeva.
4. Potrebno je provesti daljnja ispitivanja usporedbe GC-MS i LC-MS metode za određivanje metabolita sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće.
5. Potrebno je razvijati analitičke metode koje se neće oslanjati na biblioteke poznatih spojeva, već omogućiti otkrivanje novih analoga sintetskih kanabinoida, kao i detekciju strukturno sličnih spojeva preklapajućih spektara masa.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Lüscher C. Opojne droge. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 553-9.
2. Ali SF, Onaivi ES, Dodd PR, Cadet JL, Schenk S, Kuhar MJ, i sur. Understanding the Global Problem of Drug Addiction is a Challenge for IDARS Scientists. Curr Neuropharmacol. 2011;9(1):2-7.
3. United Nations Office on Drugs and Crime. The Challenge of New Psychoactive Substances: A Report from the Global SMART Programme. Vienna: UNODC Laboratory and Scientific Section; 2013. Dostupno na: https://www.unodc.org/documents/scientific/NPS_Report.pdf.
4. Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama. Europsko izvješće o drogama 2017: Trendovi i razvoj. Luksemburg: Ured za publikacije Europske unije; 2017. Dostupno na: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001HRN.pdf.
5. Zawilska JB. An Expanding World of Novel Psychoactive Substances: Opioids. Front Psychiatry. 2017;8:110.
6. Khaled SM, Hughes E, Bressington D, Zolezzi M, Radwan A, Badnapurkar A, i sur. The prevalence of novel psychoactive substances (NPS) use in non-clinical populations: a systematic review protocol. Syst Rev. 2016;5:195.
7. Baumeister D, Tojo LM, Tracy DK. Legal highs: staying on top of the flood of novel psychoactive substances. Ther Adv Psychopharmacol. 2015;5(2):97-132.
8. Negrei C, Galateanu B, Stan M, Balalau C, Dumitru MLB, Ozcagli E, i sur. Worldwide legislative challenges related to psychoactive drugs. Daru. 2017;25:14.
9. Hondebrink L, Zwartsen A, Westerink RHS. Effect fingerprinting of new psychoactive substances (NPS): What can we learn from in vitro data? Pharmacol Ther. 2018;182:193-224.
10. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev. 2006;58(3):389-462.
11. Weinstein AM, Rosca P, Fattore L, London ED. Synthetic Cathinone and Cannabinoid Designer Drugs Pose a Major Risk for Public Health. Front Psychiatry. 2017;8:156.
12. Bretteville-Jensen AL, Tuv SS, Bilgrei OR, Fjeld B, Bachs L. Synthetic Cannabinoids and Cathinones: Prevalence and Markets. Forensic Sci Rev. 2013; 25(1-2):7-26.
13. Miliano C, Serpelloni G, Rimondo C, Mereu M, Marti M, De Luca MA. Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS): Focus on the Rewarding

and Reinforcing Properties of Cannabimimetics and Amphetamine-Like Stimulants. Front Neurosci. 2016;10:153.

14. Debruyne D, Le Boisselier R. Emerging drugs of abuse: current perspectives on synthetic cannabinoids. Subst Abuse Rehabil. 2015;6:113-29.
15. Zawilska JB, Wojcieszak J. Spice/K2 drugs--more than innocent substitutes for marijuana. Int J Neuropsychopharmacol. 2014;17(3):509-25.
16. https://www.psychemedics.com/blog/2017/08/psychemedics-corporation-launches-synthetic-cannabinoids-hair-test/ (pristup: 15.04.2018.)
17. United Nations Office on Drugs and Crime. Synthetic cannabinoids in herbal products. Vienna: UNODC Laboratory and Scientific Section; 2011. Dostupno na: https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf.
18. Yamanoglu A, Cakmak S, Celebi Yamanoglu NG, Sogut O. A new side effect of synthetic cannabinoid use by the bucket (waterpipe) method: Acute respiratory distress syndrome (ARDS). Turk J Emerg Med. 2017;18(1):42-44.
19. Hudson S, Ramsey J. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. Drug Test Anal. 2011;3(7-8):466-78.
20. De Brabanter N, Deventer K, Stove V, Van Eenoo P. Synthetic cannabinoids: general considerations. P Belg Roy Acad Med. 2013;2:218-34.
21. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Thematic paper-Understanding the 'Spice' phenomenon. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2009. Dostupno na: http://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/understanding-spice-phenomenon/.
22. http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids (pristup 16.04.2018.)
23. Baumann MH, Solis E Jr, Watterson LR, Marusich JA, Fantegrossi WE, Wiley JL. Baths Salts, Spice, and Related Designer Drugs: The Science Behind the Headlines. J Neurosci. 2014;34(46):15150-8.
24. Castaneto MS, Wohlfarth A, Desrosiers NA, Hartman RL, Gorelick DA, Huestis MA. Synthetic cannabinoids pharmacokinetics and detection methods in biological matrices. Drug Metab Rev. 2015;47(2):124-74.
25. Fantegrossi WE, Moran JH, Radominska-Pandya A, Prather PL. Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ9-THC: Mechanism underlying greater toxicity? Life Sci. 2014;97(1):45-54.

26. Morales P, Reggio PH. An Update on Non-CB1, Non-CB2 Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. Cannabis Cannabinoid Res. 2017;2(1):265-73.
27. Kronstrand R, Roman M, Andersson M, Eklund A. Toxicological findings of synthetic cannabinoids in recreational users. J Anal Toxicol. 2013;37(8):534-41.
28. Wiley JL, Marusich JA, Huffman JW. Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. Life Sci. 2014;97(1):55-63.
29. Cohen K, Weinstein A. The Effects of Cannabinoids on Executive Functions: Evidence from Cannabis and Synthetic Cannabinoids-A Systematic Review. Brain Sci. 2018;8(3).
30. Hassan Z, Bosch OG, Singh D, Narayanan S, Kasinather BV, Seifritz E, i sur. Novel Psychoactive Substances-Recent Progress on Neuropharmacological Mechanisms of Action for Selected Drugs. Front Psychiatry. 2017;8:152.
31. Niaz K, Khan F, Maqbool F, Momtaz S, Ismail Hassan F, Nobakht-Haghighi N, i sur. Endo-cannabinoids system and the toxicity of cannabinoids with a biotechnological approach. EXCLI J. 2017;16:688-711.
32. Goyal H, Awad HH, Ghali JK. Role of cannabis in cardiovascular disorders. J Thorac Dis. 2017;9(7):2079-92.
33. Zarifi C, Vyas S. Spice-y Kidney Failure: A Case Report and Systematic Review of Acute Kidney Injury Attributable to the Use of Synthetic Cannabis. Perm J. 2017;21.
34. Riha B. Uzimanje uzoraka za toksikološke analize živih osoba. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 303-10.
35. Horvat V, Mandić S, Nestić M, Sutlović D, Veršić M. Biološki uzorci. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 335-6.
36. Veršić-Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. 2015.
37. De Monte C, Carradori S, Granese A, Di Pierro GB, Leonardo C, De Nunzio C. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of Serenoa repens extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. BMC Urol. 2014;14:63.
38. Dean JR. Classical Approaches for Aqueous Extraction. U: Dean JR. Extraction Techniques in Analytical Sciences. Wiley; 2009. str. 39-44.

39. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. Molecules. 2016;21(7).
40. Horvat V, Mandić S, Nestić M, Sutlović D, Veršić M. Priprema uzoraka. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 342-4.
41. http://www.fluorous.com/journal/?p=1948 (pristup: 07.05.2018.)
42. Luterotti S. Temelji kromatografskih odjeljivanja. U: Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. 3. izd. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2009. str. 204.
43. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanb. 2016;3(2):156-160.
44. Radić Nj, Kukoč Modun L. Kromatografska odjeljivanja. U: Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 560-2.
45. http://www.gas-chromatography.net/gas-chromatography.php (pristup: 12.05.2018.)
46. Radić Nj, Kukoč Modun L. Plinska kromatografija. U: Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 576-7.
47. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm (pristup: 12.05.2018.)
48. Horvat V, Mandić S, Nestić M, Sutlović D, Veršić M. Analiza uzoraka. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 346-57.
49. Luterotti S. Plinska kromatografija. U: Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. 3. izd. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2009. str. 213-6.
50. http://images.tutorvista.com/cms/images/46/mass-spectrometer1.png (pristup: 17.05.2018.)
51. http://www.gas-chromatography.net/mass-spectrometry.php (pristup: 17.05.2018.)
52. Riha B. Potvrdna analitička metoda, plinska kromatografija - spektrometrija masa. U: Sutlović D i sur. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. str. 394-6.
53. http://www.skz.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4870.Gas-Chromatography-coupled-with-Mass-Spectrometry-GCMS.html (pristup: 09.06.2018.)
54. https://www.shimadzu.com/an/gcms/qp2010se.html (pristup: 20.06.2018.)
55. http://eprints.gla.ac.uk/118499/1/118499.pdf (pristup 01.07.2018.)
56. Eckre D, Fadness L, Rankin G, Bridge C. Thermal Degradation of Synthetic Cannabinoids Containing a Cyclopropyl Group. Dostupno na: http://www.marshall.edu/forensics/files/Eckre-David-Paper.pdf

57. Tjusikawa K, Yamamuro T, Kuwayama K, Kanamori T, Iwata JT, Inoue H. Thermal degradation of a new synthetic cannabinoid QUPIC during analysis by gas chromatography–mass spectrometry. Forensic Toxicol. 2014;32(2):201-207.
58. Emerson B, Durham B, Gidden J, Lay JO Jr. Gas chromatography – mass spectrometry of JWH-018 metabolites in urine samples with direct comparison to analytical standards. Forensic Sci Int. 2013;229(0):1-6.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Cilj ove eksperimentalne studije bio je razviti GC-MS metodu za kvantitativno određivanje sintetskih kanabinoida JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-210 i ADB-PINACA te razvijenu metodu potom primijeniti na kvantitativno određivanje navedenih sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće.

Materijal i metode: Standardne otopine sintetskih kanabinoida, pripremljene razrijeđivanjem osnovnih standarda u metanolu, dodane su u biološki uzorak mokraće, dokazano negativan na prisustvo sredstava ovisnosti, kako bi se dobile umjerne krivulje analiziranih sintetskih kanabinoida. Koristeći nepoznate volumene tih standardnih otopina, pripremljena su dva biološka uzorka mokraće. Uzorci su pripremljeni za analizu ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE), a potom analizirani GC-MS metodom koja omogućuje istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma u području od 50-600 m/z vrijednosti i snimanje samo odabranih iona. Optimiran je i temperaturni program.

Rezultati: ADB-PINACA, JWH-019 i JWH-210 potvrđeni su u oba analizirana uzorka, dok su JWH-073 i JWH-018 potvrđeni samo u uzorku 1, u koji je dodan veći volumen pripremljenih standardnih otopina. Masene koncentracije detektiranih sintetskih kanabinoida izračunate su pomoću prethodno izrađenih umjernih krivulja.

Zaključci: Rezultati ovog istraživanja potvrdili su izbor GC-MS tehnike za kvantitativno određivanje sintetskih kanabinoida u biološkim uzorcima mokraće. Radi povećanja stabilnosti analiziranih spojeva, uzorke je potrebno prethodno derivatizirati. Zbog sve veće pojavnosti novih analoga, strukturno sličnih ishodišnim molekulama, potrebno je razvijati nove analitičke metode za identifikaciju sintetskih kanabinoida i njihovih metabolita u biološkim uzorcima.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Quantitative determination of synthetic cannabinoids.

Objectives: Aim of this experimental study was to develop a GC-MS method for quantitative determination of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-210 and ADB-PINACA. Also, our objective was to quantitatively determine these synthetic cannabinoids in urine samples using the developed method.

Material and Methods: Standard solutions of synthetic cannabinoids prepared by diluting original standards in methanol were added to the biological sample of urine, that tested negative for substances of abuse, to obtain calibration curves for analyzed synthetic cannabinoids. Using unknown volumes of standard solutions, two urine samples were prepared. The samples were prepared for analysis by liquid-liquid extraction (LLE) and then analyzed by a GC-MS method using mode that simultaneously records total ion chromatogram in the area of 50-600 m/z values and single ion monitoring scanning mode. The temperature program was also optimized.

Results: ADB-PINACA, JWH-019 and JWH-210 were confirmed in both analyzed samples, while JWH-073 and JWH-018 were only confirmed in sample 1, to which a larger volume of prepared standard solutions was added. The mass concentrations of detected synthetic cannabinoids were calculated using previously prepared calibration curves.

Conclusion: This study confirmed the GC-MS technique for quantitative determination of synthetic cannabinoids in biological samples of urine. In order to increase the stability of the analyzed compounds, it is necessary to include the derivatisation step prior to GC-MS analysis. Due to the increasing presence of new analogues, structurally similar to origin molecules, there is a need for development of analytical methods for the identification of synthetic cannabinoids and their metabolites in biological samples.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Lorena Kostrić

DATUM ROĐENJA: 07.07.1993.

MJESTO ROĐENJA: Sisak, Hrvatska

ADRESA STANOVANJA: Bana Josipa Jelačića 33, 44253 Mošćenica

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

E-MAIL: lorena.kostric@gmail.com

ŠKOLOVANJE

2013. – 2018. Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2008. – 2012. Zdravstveno učilište Zagreb, smjer farmaceutski tehničar

2000. – 2008. Osnovna škola Dragutina Tadijanovića Petrinja, PŠ Mošćenica

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

27.02.2018. – 02.09.2018. Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Trstenik

PRIZNANJA I NAGRADE:

2014. Dobitnica Dekanove nagrade Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu za akademsku godinu 2013/14. za izvanredne rezultate postignute tijekom studija.

STRANI JEZIK:

Engleski