

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Optimalizácia screeningovej stratégie záchytu takzvaných nových drog skupiny syntetických kannabinoidov

Bc. Silvia Ozsvaldová

Vedúci diplomovej práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Viktor Voříšek

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

PODPIS ŠTUDENTA

Pod'akovanie

Ďakujem pánovi prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za odborné konzultácie a pánovi PharmDr. Viktorovi Voříškovi za odborné rady, konzultácie, pomoc pri meraní a spracovaní diplomovej práce, taktiež za priateľský prístup.

ABSTRAKT

Naša diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou screeningovej stratégie pre záchyt syntetických kannabinoidov.

V teoretickej časti popisujeme históriu syntetických kannabinoidov, ich klasifikáciu a účinky na ľudský organizmus. Ďalej sa venujeme popisu stanovenia pomocou metódy vysoko kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou, ktorá využíva ako hmotnostný analyzátor OrbitrapTM.

V experimentálnej časti sme, ako vlastné meranie, v sére spikované vzorky JWH-018 N-(4-hydroxypentyl), vykonali na troch rôznych typov kolón. Išlo o kolóny Phenyl Hexyl Kinetex®, Luna Omega® Polar C18 a Arion® Polar C18 UHPLC. Pri kolónach Luna a Arion, boli vykonané ešte dodatočné merania prostredníctvom PRM skenu. Vzorky u všetkých troch kolón boli zmerané v tripletoch, pri PRM boli zmerané duplicitne.

Na základe získaných hodnôt sme zostrojili kalibračné závislosti, z ktorých sa stanovili parametre LOD a LOQ. Následne boli tieto hodnoty porovnané a vyhodnotené.

- **Kľúčové slová:** *syntetické kannabinoidy, vysokoúčinná plynová chromatografia, hmotnostná spektrometria, OrbitrapTM, PRM, screening*

ABSTRACT

Our diploma thesis pursues the main aim of optimizing the screening strategy of the capture of synthetic cannabinoids.

In the theoretical part, we described the history of synthetic cannabinoids, their classification, and their effects on human health status. Next, we describe the determination, using the ultra-high liquid chromatography joined with mass spectrometry, which uses the principle of OrbitrapTM as a mass analyzer.

We performed on our spiked sample of the JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) on three different columns in the experimental part.

There were Phenyl Hexyl Kinetex®, Luna Omega® Polar C18 and Arion® Polar C18 UHPLC columns. Also, we performed specific PRM scans on Luna and Arion columns. Samples on all three columns were measured in triplets, in duplicate during the PRM.

We constructed calibration dependences, based on acquired values from which the parameters LOD and LOQ were calculated. Subsequently, we present these analytical control quality parameters.

- **Keywords:** *synthetic cannabinoids, ultra-high liquid chromatography, mass spectrometry, OrbitrapTM, PRM, screening.*

OBSAH

1. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	5
2. ÚVOD.....	8
3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE	9
4. TEORETICKÁ ČASŤ.....	10
4.1 Cannabis sativa.....	11
4.2 Chemická klasifikácia.....	13
4.3 Farmakológia na historickom pozadí fenoméne syntetických kannabinoidov	21
4.3.1 Endokannabinoidný systém a receptory.....	21
4.4 Účinky.....	23
5. HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA	24
5.1 Princíp	24
5.2 Orbitrap™	25
6. ANALÝZA SYNTETICKÝCH KANNABINOIDOV.....	28
6.1 Aspekty pre analýzu	28
6.1.1 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza.....	29
6.2 Vzorkovanie.....	29
6.3 Extrakcia a príprava vzorky	30
6.3.1 Kvalitatívna analýza.....	30
6.3.2 Kvantitatívna analýza	30
6.4 LC-MS/MS.....	31
7. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	37
8. VÝSLEDKY.....	49
9. DISKUSIA.....	66
10. ZÁVER	70
11. ZOZNAM TABULIEK.....	71

12. ZOZNAM OBRÁZKOV	72
13. ZOZNAM GRAFOV.....	73
14. POUŽITÁ LITERATÚRA.....	74

1. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBDA	kyselina kanabidiolová
CBD	kanabidiol
CB1	kanabinoidný receptor 1
CB2	kanabinoidný receptor 2
CP-47,497	cyklohexylphenon-47,497
C18 RP	počet uhlíkov v alifatickom reťazci, angl. reverse phase (reverzná fáza)
C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	JWH-018 N-(4-hydroxypentyl)
C ₂₄ H ₁₈ D ₅ NO ₂	JWH-018 D5-hydroxypentyl
DART-MS	angl. dart analysis in real time – mass spectrometry (priama analýza v reálnom čase – hmotnostná spektrometria)
DCM	dichlórmétán
DEA	angl. drug enforcement agency – úrad pre boj proti drogám
DESI-MS	angl. desorption electrospray ionization – mass spectrometry (desorpčná ionizácia elektrosprejom – hmotnostná spektrometria)
DPA	difenylamín
EI-MS	angl. electron ionization-mass spectrometry (elektrónová ionizácia-hmotnostná spektrometria)
EMCDDA	angl. european monitoring centre for drugs and drug addiction (európske monitorovacie centrum pre drogy a drogové závislosti)
EÚ	Európska únia

GC-FID	angl. gas chromatography – flame ionization detector (plynová chromatografia s využitím plameňovo ionizačného detektora)
GC-IRD	angl. gas chromatography-infrared detection (plynová chromatografia-infračervená detekcia)
GC-MS	angl. gas chromatography-mass spectrometry (plynová chromatografia-hmotnostná spektrometria)
GPCRs	angl. G protein coupled receptors – G proteínová rodina receptorov
HCOOH	kyselina mravčia
HCl	kyselina chlorovodíková
HPLC	angl. high pressure liquid chromatography (vysokoučinná kvapalinová chromatografia)
HRAM	angl. high resolution accurate mass (hmotnostná spektrometria s presnou hmotnosťou s vysokým rozlíšením)
HRMS	angl. high resolution mass spectrometry (vysoko rozlišovacia hmotnostná spektrometria)
HU-210	Hebrejská univerzita-210
IC-50	angl. inhibition concentration 50 (polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie)
IMS	angl. ion mobility spectrometry (iónová pohybová spektrometria)
IR	angl. infrared (infračervená spektrometria)
IS	angl. internal standard (vnútorný štandard)
JWH	John W. Huffman (iniciály)
LC-MS	angl. liquid chromatography-mass spectrometry (kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou)
LLE	angl. liquid-liquid extraction (extrakcia kvapalina-kvapalina)

MAPK	angl. mitogen activated protein kinase (mitogénom aktivovaná proteinová kináza)
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MRM	angl. multiple reaction monitoring (sledovanie viacnásobnej reakcie (mód))
MS-AIF	angl. mass spectrometry-all ion fragmentation (hmotnostná spektrometria – všetky ióny fragmentované)
m/z	hmotnosť/ náboj
NaOH	hydroxid sodný
QC	angl. quality control – kontrola kvality
QQQ	trojitý kvadrupól
RT	angl. retention time (retenčný čas)
THCA	tetrahydrokanabinolová kyselina
THC	teretrahydrokanabinol
TLC	angl. thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografia)
UHPLC	angl. ultra-high performance liquid chromatography (ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia)
UHPLC/HRMS	angl. ultra-high performance liquid chromatography/ high resolution mass spectrometry (ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou s vysokým rozlíšením)

2. ÚVOD

Syntetické kannabinoidy patria medzi najväčšiu skupinu nových psychoaktívnych látok, ktorých zoznam sa v poslednej dobe čoraz rýchlejšie rozširuje. V podstate sú legálna náhrada marihuany, avšak môžu predstavovať zdravotné, ale aj sociálne riziká pre používateľov.

Problém predstavuje aj to, že predaj týchto nových látok je možný aj online alebo v obchodoch, kde ich predávajú pod rôznymi názvami vo forme bylinného materiálu.

V diplomovej práci sa budeme zaoberať ich screeningom na aktuálne dostupnej modelovej látke rady JWH, pomocou metódy plynovej chromatografie spojenou s hmotnostnou spektrometriou, prostredníctvom technológie OrbitrapTM.

3. ZADANIE – CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo optimalizovať screeningovú stratégiu pre záchyt nových drog zo skupiny syntetických kannabinodov. Meranie prebiehalo pomocou metódy UHPLC/HRMS, na princípe technológie OrbitrapTM.

4. TEORETICKÁ ČASŤ

Syntetické kannabinoidy patria medzi najväčšie skupiny nových drog, ktoré podliehajú monitoringu Európskym monitorovacím centrom pre drogy a drogovú závislosť (EMCDDA). Medzi prvé syntetické kannabinoidy, ktoré boli uvedené na trh patrí JWH-018, respektíve jej pentylmetabolit. O dva roky neskôr bol identifikovaný vo fajčiarskej zmesi, označovanej ako Spice[1].

Dnes EMCDDA monitoruje 190 druhov syntetických kannabinooidov. Najčastejšie zaistený kannabinooid v roku 2017, bol 5F-MDMB-PINCA / 5F-ADB a viac ako 32 610 ďalších látok nahlásených do systému včasného varovania EÚ, čo predstavuje viac ako 50% z celkového počtu hlásení počas roka. Väčšina týchto detekcií bola vo forme bylinného rastlinného materiálu (159 kg) a v podobe prášku (84 kg)[2].

Európska únia v roku 2018 sa rozhodla podrobiť dva nové syntetické kannabinoidy na kontrolu v 28 členských štátoch. Na základe návrhov Európskej komisie boli prijaté ako nové psychoaktívne látky, ktoré môžu predstavovať zdravotné aj sociálne riziko. Ide o látku ADB-CHMINACA, ktorá je v EÚ k dispozícii minimálne od roku 2014, bola zistená v 17 členských štátoch, v Turecku a Nórsku. V čase posúdenia rizika došlo k 13 potvrdeným úmrtiam na expozíciu tejto látke[3].

Medzi ďalšiu látku patrí CUMYL-4CN-BINACA, ktorá je na trhu od roku 2015 a bola zistená v 11 európskych štátoch a v Turecku. Tieto dve látky sa zvyčajne nachádzajú v bylinných zmesiach na fajčenie alebo vo forme prášku, k dispozícii sú aj iné prípravky ako napríklad e-kvapaliny na vaping v elektronických cigaretách, Blotre[3].

V súčasnosti ide čoraz o viac rastúci problém, pretože kannabinoidy, ktoré podliehajú právnej kontrole, sú nahradzované novými nekontrolovanými látkami, pričom sa odhaduje, že každý rok je identifikovaných 20 – 30 ďalších nových látok[1].

Predávajú sa poväčšinou online alebo v „head shops“ (špecializované obchody, ktoré ponúkajú legálne psychoaktívne rastlinné produkty). Tieto drogy možno nájsť na predaj aj vo forme kadidla alebo ako osviežovače vzduchu, pod rôznymi názvami, napríklad ako Spice, Gorilla, Spice Gold, Spice Silver, Fire, Smoke a mnoho ďalších. Neobsahujú tabak ani konope, predávajú sa vo fóliových vreckách, ktoré obsahujú približne

3g suchého rastlinného materiálu, kde je pridaný jeden alebo viacero kannabinoidov, spolu s vitamínom E. Pridanie vitamínu slúži na zneschopnenie analýzy[4].

Jedinečnou vlastnosťou týchto látok je ich neustále sa meniace zloženie. JWH patrí medzi dominantu kannabinoidov, detekovaných v Spice a ďalšie drogy ako HU-210 (HU – Hebrejská univerzita) alebo cyklohexylphenon (CP). JWH je séria zlúčenín, ktorá bola syntetizovaná Johnom W. Huffmanom. V mnohých krajinách sú JWH-018, CP 47 (49) a ich ekvivalenty C6, C8, C9 považované ako omámne látky[4].

Keď sa syntetické kannabinoidy prvýkrát objavili na trhu, v roku 2006 boli predávané ako legálna náhrada za konope. Stále tomu tak je, ale taktiež si získali povest' so silnými intoxikačnými účinkami a v dôsledku toho, hlavne niektorí užívatelia, ich používajú pre tento efekt. Typicky sú syntetické kannabinoidy nastriekané alebo zmiešané s bylinným rastlinným materiálom a fajčené ako joint. Ich vysoká účinnosť môže predstavovať vysoké riziko ťažkých otráv, ktoré v niektorých prípadoch sú až smrteľné[2].

4.1 *Cannabis sativa*

Konopa siata je jednoročná dvojdomá rastlina. Kvety sa konzumujú na rekreačné a lekárske účely, na základe vlastností ich metabolitov. Medzi metabolity zaraďujeme kannabinoidy a terpény, ktoré sa hojne produkujú v žľaznatých trichómoch na samičích kvetoch (samčie kvety sa moc nekonzumujú, kvôli nedostatku týchto trichómov)[5][6].

Medzi kannabinoidy, ktoré sa syntetizujú v trichómoch na samičích kvetoch patria kyselina tetrahydrokannabinolová (THCA) a kannabidiolová kyselina (CBDA). Zahriatím týchto molekúl, dôjde ku dekarboxylácii na svoje aktívne metabolity, ktoré predstavujú tetrahydrokannabinol (THC) alebo kannabidiol (CBD). THC interaguje s receptormi v endokannabinoidnom systéme a dokáže vyvolať psychoaktívne a terapeutické účinky. Naopak kannabidiol má iné farmakologické vlastnosti a je netoxický[6].

Medzi terpény zaraďujeme monoterpény a seskviterpény, ktoré patria medzi prchavé látky a prispievajú k charakteristickej vôni kvetov a konopných produktov.

Na samičích kvetoch boli, pomocou povrchovej morfológie, charakterizované tri typy žľaznatých trichómov:

- baňatý,
- sediáci (nachádza sa na epidermis s krátkou stopkou a s guľovitou hlavou, zloženú z mnohobunkového disku sekrečných buniek a zásobnej dutiny podkožného metabolitu),
- stopkatý[6].

Obrázok 1: Typy žľaznatých trichómov na samičom kvete konope[6]



Na obr. 1 môžeme vidieť: a) kvitnúca samičia rastlina, izolovaný klaster s početnými kalichmi a husto osídlenými žľaznatými trichómami, b) disekčný mikroskopický obraz kalicha, c) kalich samičieho kvetu, prostredníctvom konvenčného svetelného elektrónového mikroskopu, d) sediáci žľaznatý trichóm, e) baňatý trichóm, f) stopkatý trichóm.

4.2 Chemická klasifikácia

Syntetické kannabinoidy možno rozdeliť podľa ich chemickej štruktúry na:

a) Klasické kannabinoidy

- tetrahydrokannabinol,
- ďalšie chemické zložky konope a jej štruktúrne podobné syntetické analoga (AM-906, AM-411, O-1184, HU-210)[7].

Obrázok 2: Klasické kannabinoidy(upravené)[7]

Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
THC <i>Synonym:</i> Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	(6aR,10aR)-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol	1972-08-3	$C_{21}H_{30}O_2$
HU-210 <i>Synonym:</i> 11-Hydroxy- Δ^8 -THC-DMH	(6aR,10aR)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6-dimethyl-9-(hydroxymethyl)-3-(2-methyloctan-2-yl)-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol	112830-95-2	$C_{25}H_{38}O_2$

b) Neklasické kannabinoidy

- Cyklohexylphenols.
- 3-arylcyklohexanols (CP-47,797, CP-55,244, CP-55,940) a homologa C6-9[7].

Obrázok 3: Neklasické kannabinoidy (upravené)[7]

Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
CP-47,497	<i>rel</i> -2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol	70434-82-1	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
CP-47,497-C6	<i>rel</i> -2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methylheptan-2-yl)phenol	nedostupné	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
CP-47,497-C8 Synonym: Cannabicyclohexanol	<i>rel</i> -2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methylnonan-2-yl)phenol	70434-92-3	C ₂₂ H ₃₆ O ₂
CP-47,497-C9	<i>rel</i> -2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hydroxycyclohexyl]-5-(2-methyldecan-2-yl)phenol	nedostupné	C ₂₃ H ₃₈ O ₂
CP-55,940	<i>rel</i> -2-[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol	83003-12-7	C ₂₄ H ₄₀ O ₃
Dimethyl CP-47,497-C8	<i>rel</i> -2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-hydroxy-5,5-dimethylcyclohexyl]-5-(2-methylnonan-2-yl)phenol	nedostupné	C ₂₄ H ₄₀ O ₂

c) Hybridné kannabinoidy

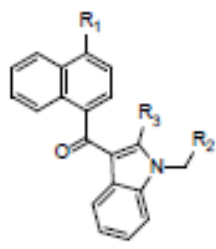
- Kombinácia klasických a neklasických kannabinooidov (AM-4030)[7].

d) Aminoalkylindoly

1. Naphtoylindoly – JWH-015, JWH-018, JWH-081, JWH-073, JWH-122, JWH-210, JWH-200 a JWH-398[7].

Obrázok 4: Aminoalkylindoly – naphtoylindoly (upravené) [7]

(a) Naphthoylindoles



$R_1-R_2=H$

AM-1220 ($R_2=1\text{-methylpiperidin-2-yl}$)
 AM-2201 ($R_2=4\text{-fluorobutyl}$)
 AM-2232 ($R_2=\text{butanenitrile}$)
 JWH-018 ($R_2=\text{butyl}$)
 JWH-019 ($R_2=\text{pentyl}$)
 JWH-020 ($R_2=\text{hexyl}$)
 JWH-022 ($R_2=3\text{-buten-1-yl}$)
 JWH-072 ($R_2=\text{ethyl}$)
 JWH-073 ($R_2=\text{propyl}$)
 JWH-200 ($R_2=4\text{-morpholinylmethyl}$)

$R_2=\text{butyl}, R_3=H$
 JWH-081 ($R_1=\text{methoxy}$)
 JWH-122 ($R_1=\text{methyl}$)
 JWH-210 ($R_1=\text{ethyl}$)
 JWH-387 ($R_1=\text{Br}$)
 JWH-398 ($R_1=\text{Cl}$)
 JWH-412 ($R_1=\text{F}$)

JWH-007 ($R_1=H, R_2=\text{butyl}, R_3=\text{methyl}$)
 JWH-015 ($R_1=H, R_2=\text{ethyl}, R_3=\text{methyl}$)
 JWH-073 4-methylnaphthyl ($R_1=\text{methyl}, R_2=\text{propyl}, R_3=H$)
 MAM-2201 ($R_1=\text{methyl}, R_2=4\text{-fluorobutyl}, R_3=H$)

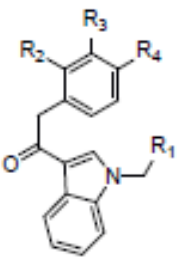
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
AM-1220	(naphthalen-1-yl)[1-[(1-methylpiperidin-2-yl)methyl]-1H-indol-3-yl]methanone	137642-54-7	$C_{28}H_{26}N_2O$
AM-1220 azepane isomer	(naphthalen-1-yl)[1-(1-methylazepan-3-yl)-1H-indol-3-yl]methanone	not available	$C_{28}H_{26}N_2O$
AM-2201	(naphthalen-1-yl)[1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]methanone	335161-24-5	$C_{28}H_{22}FNO$
AM-2232	5-(3-(1-naphthoyl)-1H-indol-1-yl)pentanenitrile	335161-19-8	$C_{28}H_{26}N_2O$
JWH-007	(naphthalen-1-yl)(2-methyl-1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone	155471-10-6	$C_{28}H_{28}NO$
JWH-015	(naphthalen-1-yl)(2-methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)methanone	155471-08-2	$C_{27}H_{24}NO$
JWH-018 Synonym: AM678	(naphthalen-1-yl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methanone	209414-07-3	$C_{28}H_{28}NO$
JWH-019	(naphthalen-1-yl)(1-hexyl-1H-indol-3-yl)methanone	209414-08-4	$C_{28}H_{28}NO$
JWH-020	(naphthalen-1-yl)(1-heptyl-1H-indol-3-yl)methanone	209414-09-5	$C_{28}H_{28}NO$
JWH-022	(naphthalen-1-yl)[1-(pent-4-en-1-yl)-1H-indol-3-yl]methanone	209414-16-4	$C_{28}H_{28}NO$

Obrázok 5: Aminoalkylindoly – naphtoylindoly pokračovanie (upravené)[7]

JWH-072	(naphthalen-1-yl)(1-propyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	209414-06-2	C ₂₂ H ₁₉ NO
JWH-073	(naphthalen-1-yl)(1-butyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	208987-48-8	C ₂₃ H ₂₁ NO
JWH-073 (4-methylnaphthyl) Synonym: JWH 122 N-butyl analogue	(4-methylnaphthalen-1-yl)(1-butyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	1354631-21-2	C ₂₄ H ₂₃ NO
JWH-081	(4-methoxynaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	210179-46-7	C ₂₅ H ₂₅ NO ₂
JWH-122 [5]	(4-methylnaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	619294-47-2	C ₂₅ H ₂₅ NO
JWH-200 Synonym: WIN 55,225	(naphthalen-1-yl)[1-[2-(morpholin-4-yl)ethyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	103610-04-4	C ₂₅ H ₂₄ N ₂ O ₂
JWH-210	(4-ethylnaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	824959-81-1	C ₂₆ H ₂₇ NO
JWH-387	(4-bromonaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	207227-49-4	C ₂₄ H ₂₂ BrNO
JWH-398	(4-chloronaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	1292765-18-4	C ₂₄ H ₂₂ ClNO
JWH-412	(4-fluoronaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	1364933-59-4	C ₂₄ H ₂₂ FNO
MAM-2201 Synonyms: JWH-122 (5-fluoropentyl); AM-2201 4-methylnaphthyl analogue	(4-methylnaphthalen-1-yl)[1-(5-fluoropentyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	1354631-24-5	C ₂₅ H ₂₄ FNO

2. Phenylacetylindoly – JWH-251 a JWH-250[7].

Obrázok 6: Aminoalkylindoly – phenylacetylindoly(upravené)[7]

(b) PhenylacetylIndoles			
			
R_2-R_4-H Cannabipiperidiethanone ($R_1=1\text{-methylpiperidin-2-yl}$, $R_2=\text{methoxy}$) JWH-203 ($R_1=\text{butyl}$, $R_2=\text{Cl}$) JWH-250 ($R_1=\text{butyl}$, $R_2=\text{methoxy}$) JWH-251 ($R_1=\text{butyl}$, $R_2=\text{methyl}$) RCS-8 ($R_1=\text{cyclohexylmethyl}$, $R_2=\text{methoxy}$)			
$R_1=\text{butyl}$, R_2-H JWH-201 ($R_2=H$, $R_4=\text{methoxy}$) JWH-302 ($R_2=\text{methoxy}$, $R_4=H$)			
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
Cannabipiperidiethanone Synonym: JWH-250 1-(2-methylene- <i>N</i> -methyl-piperidyl) derivative	2-(2-methoxyphenyl)-1-[[1-(1-methylpiperidin-2-yl)methyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl] ethanone	1345970-43-5	$C_{24}H_{28}N_2O_2$
JWH-201 Synonym: para-JWH-250	2-(4-methoxyphenyl)-1-(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl) ethanone	864445-47-6	$C_{22}H_{28}NO_2$
JWH-203	2-(2-chlorophenyl)-1-(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl) ethanone	864445-54-5	$C_{21}H_{22}ClNO$
JWH-250	2-(2-methoxyphenyl)-1-(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl) ethanone	864445-43-2	$C_{22}H_{28}NO_2$
JWH-251	2-(2-methylphenyl)-1-(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl) ethanone	864445-39-6	$C_{22}H_{28}NO$
JWH-302 Synonym: meta-JWH-250	2-(3-methoxyphenyl)-1-(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl) ethanone	864445-45-4	$C_{22}H_{28}NO_2$
RCS-8 Synonyms: SR-18; BTM-8	2-(2-methoxyphenyl)-1-(1-(2-cyclohexylethyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl)ethanone	1345970-42-4	$C_{25}H_{28}NO_2$

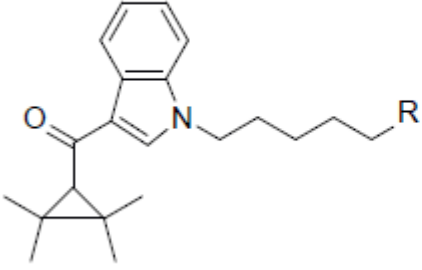
3. Benzoylindoly – AM-694, pravadolín a RSC-4[7].

Obrázok 7: Aminoalkylindoly – benzoylindoly(upravené)[7]

(c) Benzoylindoles			
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
AM-694	(2-iodophenyl)[1-(5-fluoropentyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	335161-03-0	C ₂₀ H ₁₉ FINO
AM-694 (chloro derivative)	(2-iodophenyl)[1-(5-chloropentyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	not available	C ₂₀ H ₁₉ ClINO
AM-2233	(2-iodophenyl)[1-[(1-methylpiperidin-2-yl)methyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	444912-75-8	C ₂₂ H ₂₃ IN ₂ O
RCS-4 Synonyms: SR-19; OBT-199; BTM-4; E-4	(4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	1345966-78-0	C ₂₁ H ₂₃ NO ₂
RCS-4 ortho isomer Synonym: RCS-4 2-methoxy isomer	(2-methoxyphenyl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	not available	C ₂₁ H ₂₃ NO ₂
RCS-4 butyl homologue	(4-methoxyphenyl)(1-butyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	not available	C ₂₀ H ₂₁ NO ₂
WIN 48,098 Synonym: Pravadoline	(4-methoxyphenyl)[(2-methyl)-1-[2-(morpholin-4-yl)ethyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	92623-83-1	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃

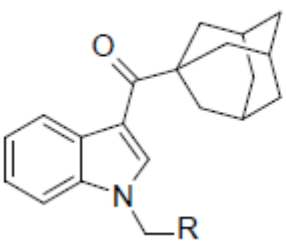
4. **Cyklopropoylindoly** – XLR-11, UR-144[7].

Obrázok 8: Aminoalkylindoly – cyklopropoylindoly (upravené)[7]

(e) Cyclopropoylindoles			
		<p>R=H UR-144</p> <p>R=F XLR-11</p>	
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
<p>UR-144 Synonym: KM-X1</p>	(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl) (1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	1199943-44-6	C ₂₁ H ₂₉ NO
<p>XLR-11 Synonyms: 5-FUR-144, 5-fluoro UR-144</p>	(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl) (1-(5-fluoropentyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl) methanone	1364933-54-9	C ₂₁ H ₂₈ FNO

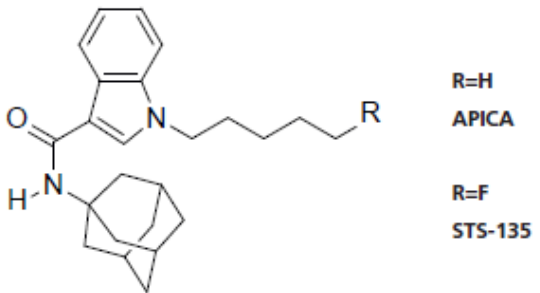
5. **Adamantoylindoly** – AM-1248 a AB-001[7].

Obrázok 9: Aminoalkylindoly – adamantoylindoly (upravené)[7]

(f) Adamantoylindoles			
		<p>R=butyl AB-001</p> <p>R=1-methylpiperidin-2-yl AM-1248</p>	
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
<p>AB-001 Synonym: JWH-018 (adamantyl)</p>	(1-adamantyl)(1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)methanone	1345973-49-0	C ₂₄ H ₃₁ NO
<p>AM-1248</p>	(1-adamantyl)[1-[(1-methylpiperidin-2-yl)methyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl]methanone	335160-66-2	C ₂₆ H ₃₄ N ₂ O

6. Karboxamid indoly – STS-135 a APICA[7].

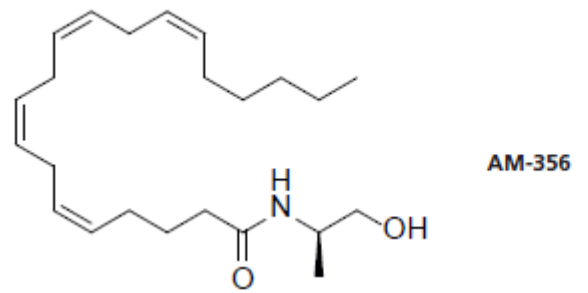
Obrázok 10: Aminoalkylindoly – karboxamid indoly (upravené)[7]

(g) Indole carboxamides			
			
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
APICA <i>Synonyms:</i> 2NE1; JWH 018 adamantyl carboxamide	<i>N</i> -(1-adamantyl)-1-pentyl-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamide	1345973-50-3	$C_{24}H_{32}N_2O$
STS-135 <i>Synonym:</i> 5-fluoro APICA	<i>N</i> -(1-adamantyl)-1-(5-fluoropentyl)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamide	1354631-26-7	$C_{24}H_{31}FN_2O$

e) Eicosanoidy

- Anandamid a syntetické analoga (methanandamid – AM-356)[7].

Obrázok 11: Aminoalkylindoly – eicosanoidy (upravené)[7]

			
Názov	Chemický názov	CAS číslo	Vzorec
AM-356 <i>Synonym:</i> Methanandamide	<i>N</i> -(2-hydroxy-1 <i>R</i> -methyl-ethyl)-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraenamide	157182-49-5	$C_{23}H_{39}NO_2$

4.3 Farmakológia na historickom pozadí fenoméne syntetických kannabinoïdov

Syntetické kannabinoïdy boli pôvodne vyvinuté na skúmanie endokannabinoïdného systému a ako nová farmakoterapia. Išlo predovšetkým o výskum v oblasti závažných neurodegeneratívnych porúch typu roztrúsenej sklerózy alebo Parkinsonovho syndrómu. Na prelome 70. a 80. rokov 20. storočia, bola u firmy Pfizer skúmaná potenciálna analgetická efektívnosť rady CP (napríklad CP-47,497), ktorá je označovaná ako neklasická kannabinoïdná skupina s chýbaním pre klasické kannabinoïdy, typickým dibenzopyranom a jeho nahradením cannabicyklohexanolom[8][9].

Výskum sa ďalej rozširoval v 90. rokoch a na začiatku 21. storočia, okolo roku 2000, prácami tímu JW Huffmana, ktorí sa zaoberali inden-, indol- a pyrrol- derivátmi. V tejto práci boli publikované výsledky experimentu s JWH-018, ktoré priniesli poznatok, že tento derivát má 10x vyššiu afinitu k receptoru CB2 a 4x vyššiu afinitu k CB1 receptoru, v porovnaní s naturálnym delta-9-THC[10][11].

Majú podobné účinky ako tetrahydrokannabinol. Pri THC a syntetických kannabinoïdov dochádza ku stimulácii rovnakých receptorov, a to predovšetkým CB1 a CB2 (kannabinoïdný receptor). Avšak podľa štúdií, boli preukázané výsledky, že syntetické kannabinoïdy majú vyššiu toxicitu a z nich plynúcu hospitalizáciu, ako v prípade prírodného konope. Čo môže byť spôsobené tým, že sú priamymi agonistami receptorov, na rozdiel od THC, ktorý patrí medzi čiastočných agonistov[3][13].

Okrem dronabinolu (THC, Marinol®), sa ako agonista syntetických kannabinoïdných receptorov našiel pre klinické využitie nabilon. Ide o derivát THC, ktorý sa používa na liečbu nevoľnosti pri chemoterapii rakoviny.

Od roku 2004, pouliční predajcovia vyrábajú fajčiteľné bylinné produkty označované ako K2 alebo Spice, ktoré sú ako legálna alternatíva k marihuane[4].

4.3.1 Endokannabinoïdný systém a receptory

V roku 1992 sa podarilo vedcom L. Hanuš a W. Devane zistiť, že na kannabinoïdný receptor sa viaže istý endogénny ligand, ktorý nazvali ako anandamid (neskôr izolovali z mozgu ďalšie štyri). Anandamid je molekula, ktorá pôsobí buď ako neuromediátor

alebo neuromodulátor, a môže súvisieť napríklad s chuťou do jedla, plodnosťou a pamäťou[14].

Endokannabinoidný systém ovplyvňuje tehotenstvo, taktiež reguluje oogenézu a prenos embrya do vajíčkovodu a mnoho ďalších[14].

Vedci v roku 1988 identifikovali kannabinoidné receptory v mozgu potkanov, na ktoré sa viaže THC. O pár rokov sa podarilo zmapovať miesto receptora v mozgu človeka, išlo konkrétne o CB1. Následne v roku 1993 boli klonované periférne kannabinoidné receptory (CB2). CB1 spolu s CB2 patria medzi rodinu receptorov p-glykoproteínu[14].

Dráha prenosu signálu zahŕňa:

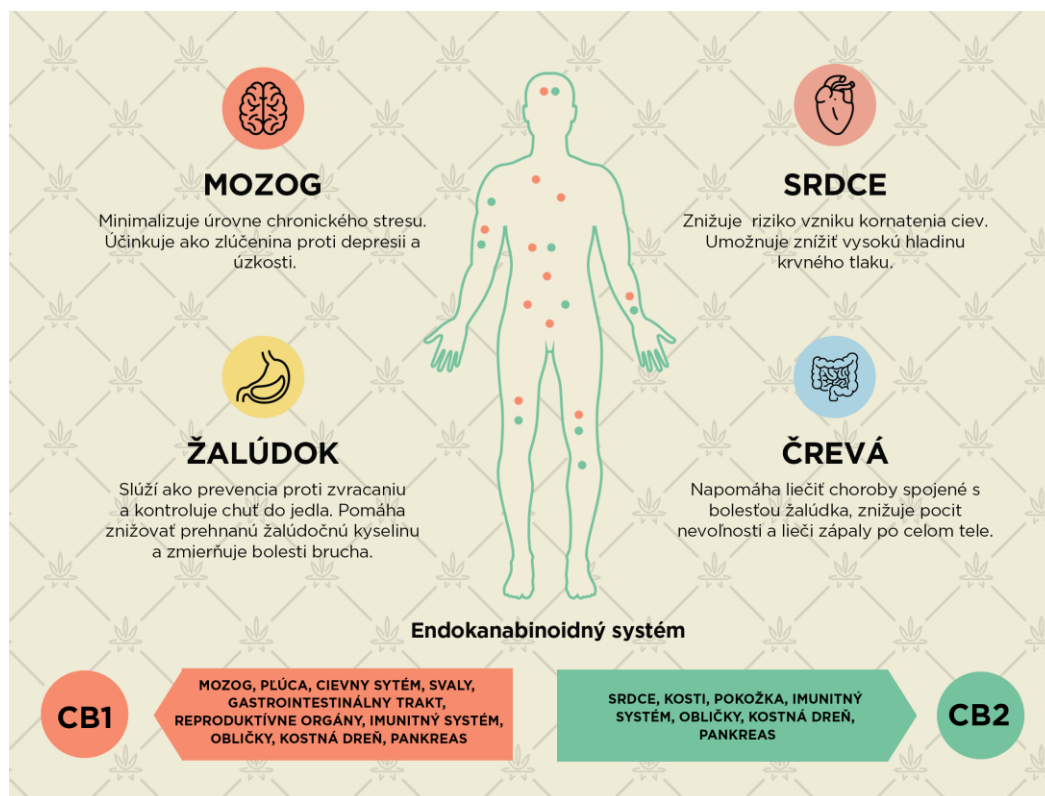
- inhibíciu produkcie cyklického adenosin monofosfátu (cAMP),
- moduláciu iónových kanálov,
- a pokračovanie aktivácie mitogén aktivovanej proteínkinázy (mitogen-activated protein kinase – MAPK)[14].

THC sa naviaže na receptor CB1, čím prejaví svoje účinky a dôjde k aktivácii G-proteínu, ktorý inhibuje sodíkové a vápnikové kanály, typu P/Q a typu N. Pomocou adenylát cyklázy inhibuje aj kanály typu A. zároveň však dôjde k aktivácii aj draslíkových kanálov, ktoré smerujú dovnútra a aj k signálnej kinázovej dráhe MAP[14].

Celkovo je receptor CB1 zodpovedný za psychotropné účinky konope. Ligand je schopný viazať sa a pôsobiť ako agonista. Nachádza sa v kôre mozgu, bazálnych gangliách, rozmnožovacom systéme a v hipokampe (obsahuje 472 aminokyselín). Nenachádza sa však v časti mozgu, ktoré ovládajú kardiovaskulárne a respiračné funkcie, preto ho možno využiť pri liečbe rôznych ochorení.

Úlohou receptoru CB2 je do značnej miery imunomodulácia a predstavuje cieľ pre potenciálne terapeutické činidlá. Vyskytuje sa v imunitných bunkách a v slezine, s počtom aminokyselín 360[14][15].

Obrázok 12: Endokannabinoidný systém[16]



4.4 Účinky

Mechanizmus účinku spočíva v aktivácii CB1 receptorov, ktoré sa následne párujú s proteínmi označovanými ako Gi/o.

Proteíny Gi/o sú rodina heterotrimérnych α proteínových podjednotiek, ktorých hlavnou funkciou je predovšetkým aktivácia intracelulárnych dráh, vzniknuté výsledkom aktivácie receptorov spojené s povrchom bunky G proteínu (G protein-coupled receptors – GPCRs)[17].

Medzi najtypickejšie účinky patria eufória, zintenzívnenie zmyslového vnímania, predovšetkým zrakového a sluchového, taktiež dochádza ku zmene emócií a zvyšuje sa sexuálna stimulácia.

Vyznačujú sa dlhším účinkom, ako je to u Δ -tetrahydrokannabinolu. Môže vzniknúť tachykardia, prípadne sucho v ústach a začervenanie očných spojiviek[18].

5. HMOTNOSTNÁ SPEKTROMETRIA

Hmotnostná spektrometria je analytická technika, ktorou môžeme určiť pomer hmotnosti a náboja (m/z), zväčša jednej alebo viacerých molekúl prítomných vo vzorke. Čiže môžeme pomocou nej identifikovať neznáme zlúčeniny a taktiež slúži na objasnenie chemických vlastností a štruktúr rôznych molekúl[19].

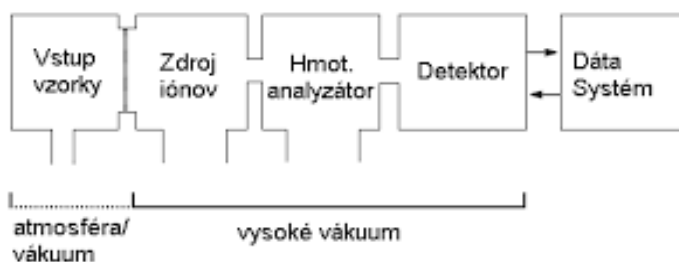
5.1 Princíp

Hmotnostný spektrometer pracuje na princípe generovania iónov z vyšetrovanej vzorky, následne ich rozdelí podľa pomeru m/z , ktoré je pre ne špecifické a zaznamená relatívne zastúpenie každého iónu[19].

Prvým krokom je produkcia iónov v plynnej fáze, dnes rôznymi metódami ionizácia, z ktorej jedna z prvých spôsobov bola elektrónová ionizácia. Vzniknuté molekulárne ióny podliehajú fragmentácií, následne sú ióny separované v hmotnostnom spektrometri, na základe pomeru m/z a dôjde k ich detekcií, ktorá je úmerná k ich množstvu. Výsledkom je hmotnostné spektrum danej molekuly, ktoré sa vyobrazí ako graf pomeru množstva a intenzity (abundancia) iónov k pomeru m/z .

Dané ióny nám poskytujú informácie ohľadom povahy a štruktúry ich prekurzorových molekúl[19].

Obrázok 13: Schéma hmotnostného spektrometra[20]



Všeobecná schéma dizajnu hmotnostného spektrometra pozostáva zo:

1. Zdroj ionizácie:

- aby sa dalo s molekulami manipulovať a pohybovať, s využitím vonkajších elektrických a magnetických polí, musí dôjsť k ich zmene na ióny v plynnej fáze.

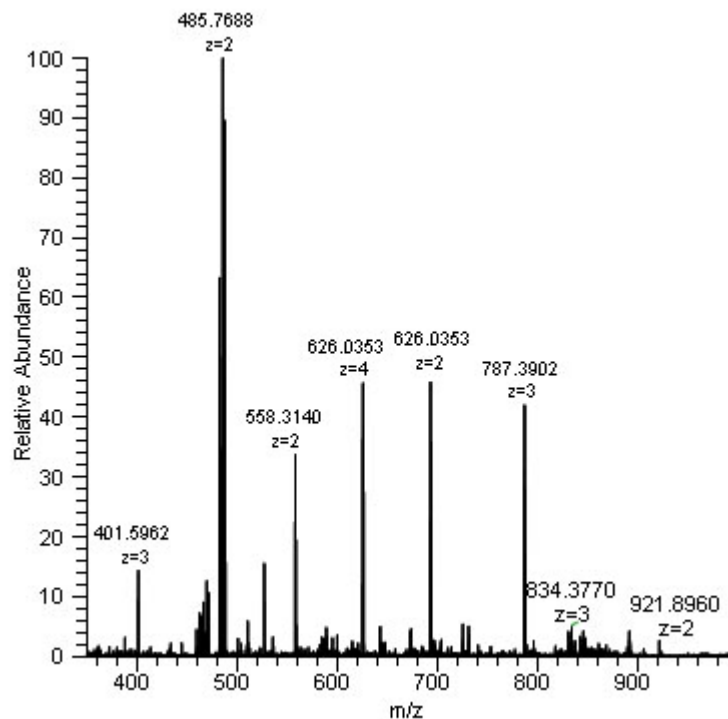
2. Hmotnostný analyzátor:

- po predchádzajúcej ionizácii sa ióny separujú podľa pomeru hmotnosti a náboja (m/z).

3. Detekcia iónov:

- oddelením iónov dochádza k ich zmeraniu a odoslaniu do dátového systému, kde sú uložené pomery m/z spolu s ich relatívnym výskytom,
- výsledkom je hmotnostné spektrum[21].

Obrázok 14: Príklad hmotnostného spektra. Na ose x je znázornený podiel hmotnosti a náboja (m/z) a na ose y relatívne zastúpenie[21]



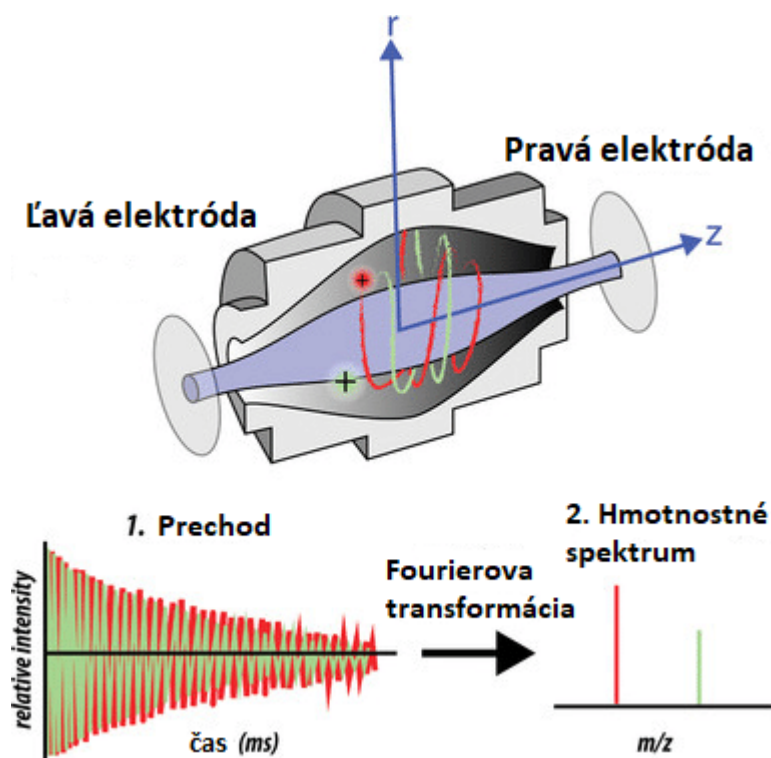
5.2 OrbitrapTM

Technológia hmotnostného spektrometra OrbitrapTM je dobre zavedená ako výkonná platforma LC-MS. Ide o lapač elektrostatických iónov, ktorý na detekciu hmoty využíva Fourierovu transformáciu spektra. Je založený na úplne novom koncepte, ktorý navrhol A. Makarov a bol opísaný v patentoch v rokoch 1996 a 2004. Prvý komerčne dostupný prístroj uviedla na trh spoločnosť Thermo Electron Corporation v júni roku 2005[27].

Jeho vysoké rozlíšenie a presná hmotnosť (HRAM – high-resolution accurate-mass) meraní, spolu s jeho vysokým dynamickým rozsahom, umožňujú dôkladnú charakterizáciu komplexných zmesí[22].

Hmotnostný analyzátor OrbitrapTM pozostáva z troch elektród. Výrezy predstavujú štandardný lapač, ktorý bol komerčne zavedený v roku 2005 a lapač kompaktný s vysokým poľom, uvedený na trh v roku 2011. Vonkajšie elektródy majú tvar kalichov, ktoré sú obrátené smerom k sebe a sú elektricky oddelené pomocou stredového krúžku z dielektra. Rotačná centrálna elektróda drží pascu pohromade a vyrovnáva ju pomocou dielektrických koncových rozpiet. Maximálny priemer centrálnej elektródy je 8 mm a vonkajšej elektródy 20 mm[19][27].

Obrázok 15: Schéma hmotnostného analyzátoru OrbitrapTM (upravené) [24]



V prípade, že je napätie aplikované medzi vonkajšiu a strednú elektródu, výsledné elektrické pole je lineárne pozdĺž osy, tým pádom budú oscilácie v tomto smere harmonické. V tom istom čase, radiálny komponent poľa, silne priťahuje ióny do centrálnej elektródy[23].

Ióny sa vstreknú do objemu medzi centrálnou a vonkajšou elektródou pozdĺž dotyčnice, cez špeciálne opracovanú štrbinu s kompenzačnou elektródou, nazývanou aj ako deflektor. Pri napätí medzi strednou a vonkajšou elektródou ohýba radiálne elektrické pole dráhu iónov smerom k centrálnej elektróde, zatiaľ čo tangenciálna rýchlosť vytvára opačnú odstredivú silu[23].

Pri správnom výbere parametrov zostávajú ióny na takmer kruhovej špirále vo vnútri pasce. Axiálne elektrické pole, ktoré je spôsobené špeciálnym kužeľovitým tvarom elektród, tlačí ióny smerom k najširšej časti pasce, ktorá iniciuje harmonické oscilácie. Vonkajšie elektródy sa následne využívajú ako platne na prijímanie detekcie obrátového prúdu axiálnych kmitov. Tento obrátový prúd sa prevedie do hmotnostného spektra[23].

6. ANALÝZA SYNTETICKÝCH KANNABINOIDOV

Pri pokusoch o zistenie totožnosti kontrolovaných drog v podozrivých materiáloch, analytický prístup by mal vyžadovať stanovenie najmenej dvoch nekorelovaných parametrov. Jeden z nich by mal poskytnúť informácie o chemickej štruktúre daného analytu, pomocou využitia hmotnostnej spektrometrie alebo tandemových metód, ako je napríklad GC-MS. Pri výbere týchto parametrov treba brať do úvahy hlavne laboratórne podmienky a charakter skúmanej drogy[7].

6.1 Aspekty pre analýzu

Syntetické kannabinoidy sa často nachádzajú vo forme prísad do bylinných zmesí. Stratégia analýzy sa odlišuje, na základe toho či sa analyzujú klasické bylinné drogy, ako je napríklad kannabis alebo drogy vo forme kokaínu, heroínu, prípadne amfetamínu[7].

Medzi dôležité aspekty analýzy patria:

1. Vzorkovanie

- bylinné produkty by bolo možné zoradiť podľa značky a obalov na odber vzoriek.

2. Homogenita

- nehomogénna distribúcia môže mať vplyv na spôsob aplikácia syntetických kannabinooidov na bylinný materiál, pre kvantitatívnu analýzu sa vyžaduje efektívna homogenizácia.

3. Extrakcia

- jednoduchá extrakcia by sa mohla použiť pre chromatografické analýzy. Extrakcia nie je potrebná pre iónovú pohybovú spektrometriu (IMS – ion mobility spectrometric), priamu analýzu v hmotnostnej spektrometrii v reálnom čase (DART-MS – direct analysis in real time mass spectrometry) a pri DESI-MS.

4. Senzitivita

- pre analýzu syntetických kannabinoidov sú potrebné citlivé metódy, ktoré sú prezentované v nízkych koncentráciách (najčastejšie 1 – 30 mg/g), prípadne môžu byť prítomné interferencie z matrice.

5. Rozmanitosť syntetických kannabinoidov

- počet a typ látok sa líšia od vzorky k vzorke,
- kvôli obrovskej škále látok, ktoré sú k distribúcií, by museli byť referenčné knižnice spektier neustále aktualizované,
- problematická dostupnosť referenčných vzoriek, kvôli rôznym druhom kannabinoidov[7].

6.1.1 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza

Kvalitatívna analýza sa môže vykonávať pomocou TLC, IMS, GC-FID alebo GC-IRD, IR a taktiež GC-MS, ktorá sa považuje za optimálnu metódu, pretože poskytuje výborné chromatografické rozlíšenie a tiež aj všeobecne umožňuje identifikáciu látky podľa ich EI-MS spektier.

Pre kvantitatívny typ analýzy sa využíva GC-FID, HPLC a LC/MS prípadne LC/MS MS. Kvôli prítomnosti veľkého množstva derivátov mastných kyselín, ktoré môžu spôsobovať interferencie v plynovej chromatografii, je lepšie využiť kvapalinovú chromatografiu[7].

6.2 Vzorkovanie

V prípade bylenných zmesí, môže byť potrebné upraviť stratégiu vzorkovania. Hlavne v prípadoch kedy sa vyskytne veľká škála rôznych druhov. Taktiež sa môže zmeniť obsah konkrétnej značky, pokiaľ je zadržané veľké množstvo rovnakých produktov alebo materiálu sypkého pôvodu, možno použiť stratégie vzorkovania, ktoré sa bežne používajú[7].

6.3 Extrakcia a príprava vzorky

6.3.1 Kvalitatívna analýza

Na prípravu vzorky pre kvalitatívnu analýzu sa používajú stredne polárne, prípadne nepolárne rozpúšťadlá, medzi ktoré patria napríklad etanol, metanol, ethylacetát, acetonitril, acetón.

1 mL rozpúšťadla sa pridá do malej časti vzorky (napr. 100 mg rastlinného materiálu alebo 1 – 2 mg pevného materiálu).

Nasleduje sonikácia extraktu a filtrácia, ak je to nutné pred analýzou je potrebná centrifugácia[7].

6.3.2 Kvantitatívna analýza

Pred vykonaním analýzy, je potrebné rozdrvenie a homogenizácia pevného/ rastlinného materiálu.

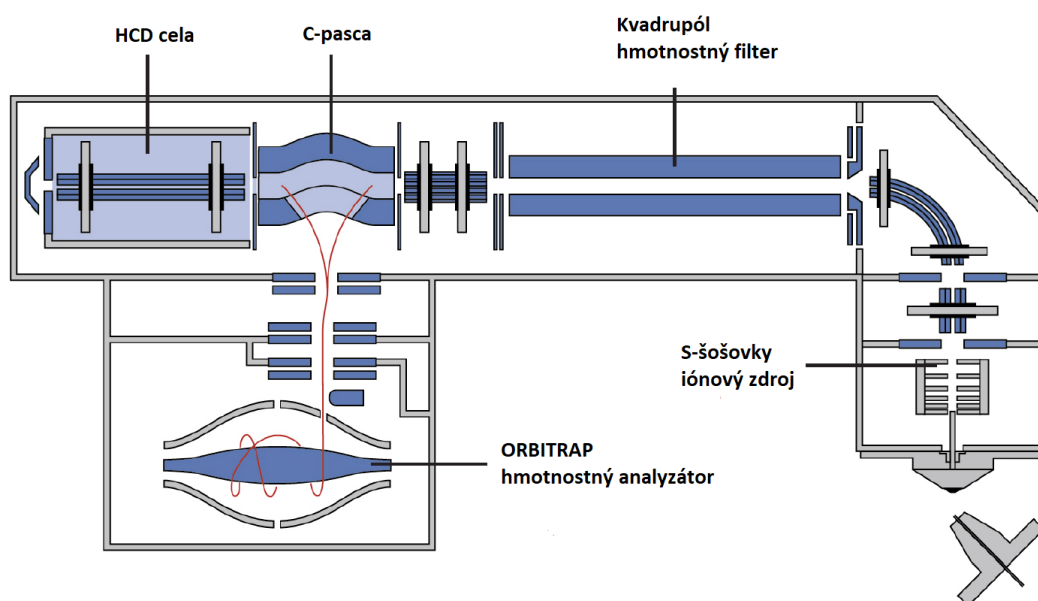
Homogenizáciu je možné uskutočniť pomocou elektrickej brúsky alebo hlbokým zmrazením s tekutým dusíkom v trecej miske. Odporúča sa vyhnúť homogenizácii iba alikvotnej časti vzorky, pretože syntetické kannabinoidy majú tendenciu usádzať sa na dne. Zo vzniknutého homogenátu, by sa mali pripraviť aspoň dve jednotlivé vzorky o homogenite a hmotnosti originálneho materiálu.

Vzorky sa extrahujú pomocou stredne polárnych alebo nepolárnych rozpúšťadiel (etanol, metanol, etylacetát, acetonitril, isooktán alebo acetón). Pomocou sonikácie zmesi je extrakcia viac efektívnejšia. Pred analýzou sa vykoná filtrácia a pre lepšiu účinnosť sa odporúča zvýšiť počet vykonaných extrakcií. Taktiež je možné využiť extrakciu podľa Soxletha, ktorá však môže byť pre bežné použitie vo forenzných laboratóriách až príliš komplikovaná[7].

6.4 LC-MS/MS

V našej práci budeme používať na stanovenie syntetických kannabinoïdov kvapalinovú chromatografiu s tandemovou hmotnostnou spektrometriou.

Obrázok 16: Schéma LC-MS/MS s použitím hmotnostného analyzátoru Orbitrap™ (upravené)[25]



Ide o výkonnú metódu, ktorá kombinuje separačné vlastnosti konvenčnej HPLC (alebo UHPLC), ktorá sa spolieha na rozdiely analytov v hydrofóbnosti alebo iných vlastnostiach medzi prúdením mobilnej a stacionárnej fázy, s detekčnými schopnosťami tandemového hmotnostného spektrometra, kde sa oddeľujú ióny podľa ich pomeru hmotnosti k náboju m/z , vo vysokom vákuu. Získa sa tým vyššia selektivita a zníži sa interferencia medzi účinnými látkami a matricou[7][26].

Vysokoučinná plynová chromatografia (UHPLC) je najnovší a najdôležitejší vývoj v HPLC. Využíva zariadenie s veľmi vysokými tlakmi spolu s kolónami, ktoré sú vyplnené malými časticami a sú schopné uľahčiť rýchlejšiu separáciu s vysokou účinnosťou.

Dnešné kvapalinové chromatografy sú dobre konštruované prístroje s vysokým výkonom a spoľahlivosťou. Typický HPLC systém sa skladá z množstva modulov

akými sú napríklad čerpadlo, injektor/ autosampler, kolónová pec, detektor a dátový systém[26].

UHPLC/MS často vyžaduje vysokú rýchlosť skenovania, aby sa zabránilo strate rozlíšenia a tvaru chromatografického píku. Pokroky v moderných hmotnostných analyzátorov umožňujú dostatočný počet skenov (>10) cez chromatografický pík, v režime úplného skenovania bez zníženia rozlišovacej schopnosti a citlivosti[26].

Podmienky pre LC-MS/MS analýzu typu QQQ:

a) LC:

- **Kolóna:** C18 analytická kolóna / C18 ochranná kolóna („guard column“)
- **Mobilná fáza:** 0,1% kyselina mravčia (A) : voda (B) : metanol (C)
- **Prietok:** 0,2 mL/min.
- **Teplota kolóny:** 30°C
- **Vstrekovaný objem:** 5 µL

b) MS/MS

- **Detekčný mód:** MRM
- **Ionizačný mód:** ESI+ a ESI-
- **Napätie na kapiláre:** 3,5 kV
- **Teplota iónového zdroja:** 120°C
- **Teplota desolvácie:** 350°C
- **Kužel'ový plyn („cone gas“):** dusík, prietok 60 l/h (pomocný oplach dusíku má za úlohu redukovať turbulenciu iónov).
- **Desolvatačný plyn:** dusík, prietok 650 l/h
- **Kolízny plyn:** argón [7]

1. Príprava vnútorného štandardu

- Do 2 litrovej odmernej banky sa naváži 200 mg difenylamínu (DPA).
- Zriedenie na objem s etanolom, s výslednou koncentráciou 100 mg/L.

2. Príprava zásobného štandardu roztoku syntetických kannabinoidov

- Obsahuje všetky analyty, ktoré sa majú kvantifikovať (JWH-019, JWH018 a ďalšie).
- Pripravený v koncentráciách 1,0 mg/L a vnútorný štandard DPA s koncentráciou 100 µg/L.
- Do 100 mL odbernej banky sa napipetuje 100 µL vnútorného štandardu o koncentrácií 100 mg/L a 100 µL roztokov a 1 g/L každého analytu (koncentrácie 1 mg/L sú komerčne dostupné).
- Zriedenie na objem s etanolom.
- Takto pripravený zásobný roztok možno skladovať po dobu najmenej 1 rok s využitím chladenia.

3. Príprava pracovného štandardného roztoku

- Vnútorný štandard o koncentrácií 100 mg/L sa zriedi 1000x na výslednú koncentráciu 100 µg/L (tzv. DIS roztok – používa sa na zriedenie štandardného zásobného roztoku na požadovanú koncentráciu).
- Pripraví sa kalibračná krivka, ktorá sa zvyčajne skladá z 5 štandardných roztokov pre dobrú linearitu kalibračnej krivky.

4. Príprava roztokov vzoriek – neznáma bylinná zmes

- Z materiálu syntetických kannabinoidov boli odobrané reprezentatívne vzorky.

- Zo vzoriek bolo navážené 100 mg do 50 mL odmernej banky a doplnené roztokom vnútorného štandardu o koncentrácií 100 mg/L.
- Po dobu 5 minút extrahujte pod ultrazvukom, aspoň 10x prevráťte banku a 2 minúty centrifugujte pri 5000 otáčkach za minútu, prípadne sa môže roztok nechať usadiť.
- Pomocou filtru s injekčnou striekačkou (<0,45 μm) sa prefiltruje alikvotná časť o veľkosti približne 2 mL.
- Napipetujte 50 μL filtrátu do 50 mL odmernej banky a zriedte na objem s etanolom.
- 5 μL roztoku vzorky nastriekajte do LC-MS/MS, je výhodné vykonať aspoň jednu duplicitnú analýzu.

5. **Identifikácia** sa vykonáva porovnaním retenčných časov analytu s roztokmi referenčného štandardu. Interný štandard nám umožňuje použitie retenčného indexu, ako jedno z ďalších kritérií pre identifikáciu. Pomer intenzít hromadných prechodov (prekurzor → produkovaný ión 1 / prekurzor → produkovaný ión 2) z analytu musia byť porovnávané s analytmi referenčných štandardných roztokov[7].

Tabuľka 1: Retenčné časy jednotlivých syntetických kannabinooidov (upravené)[7]

Analyt	Retenčné časy (min)
JWH-200	11.7
Diphenylamin (IS)	15.0
AM-2201	16.2
RCS-4	17.0
JWH-250	17.1
JWH-073	17.2
JWH-018	18.1
JWH-081	18.5
JWH-019	18.9
JWH-122	19.0
CP-47,497 (ESI)	19.2
JWH-210	19.9

6. Výpočet percentuálnej výťažnosti syntetických kannabinoïdov

- Na kalibračnú krivku sa vynesú hodnoty pomeru odozvy kalibračných štandardov, čiže plocha píku kannabinoïdného štandardu / plocha píku vnútorného štandardu, proti koncentrácii použitého štandardu kannabinoïdov (mg/mL).
- Výslednú hodnotu možno získať podľa vzorca:

$$\% SC = 100 \times \frac{V_x \frac{(R_s - b)}{a}}{W_s}$$

- V = objem použitého extrakčného rozpúšťadla (mL)
 - R_s = pomer odozvy zo vzorky (plocha píku syntetických kannabinoïdov / plocha píku vnútorného štandardu)
 - a = sklon kalibračnej krivky
 - b = prechod kalibračnej krivky
 - W_s = hmotnosť vzorky (mg)
- V dnešnej dobe, kde je LC vybavená modernou inštrumentáciou a softwarmi sa výpočet podľa vzorca prakticky nevyužíva[7].

Tabuľka 2: Hmotnostné spektrometrické údaje a parametre vybraných syntetických kannabinoïdov (upravené) [7]

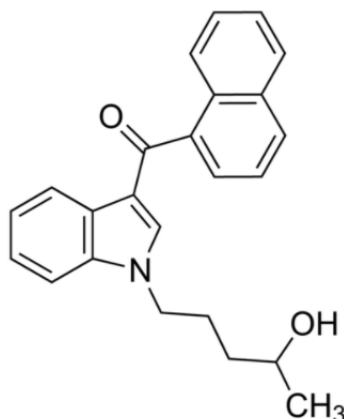
Analyt	Ionizačný mód	Prekurzorový ión (m/z)	Produktový ión (m/z)	Napätie [V]	Kolízna energia [eV]
DPA	ESI ⁺	170.17	93.26	31	28
JWH-018	ESI ⁺	342.20	154.99 145.07	30	25 42
JWH-019	ESI ⁺	356.15	154.99 126.99	34	25 44
JWH-073	ESI ⁺	328.10	155.12 126.85	33	22 50
JWH-081	ESI ⁺	372.10	185.25 214.29	33	25 25
JWH-122	ESI ⁺	356.35	169.43 214.21	29	25 25
JWH-200	ESI ⁺	385.15	154.99 114.25	25	20 25
JWH-210	ESI ⁺	370.25	183.46 214.40	33	26 26
JWH-250	ESI ⁺	336.20	120.95 188.19	25	20 16
AM-2201	ESI ⁺	360.10	155.37 145.14	30	25 40
RCS-4	ESI ⁺	322.20	135.03 76.74	25	24 50
CP-47,497	ESI ⁻	317.2	299.08 159.59	45	26 55

7. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

V našej diplomovej práci budeme používať 4 štandardy syntetických kannabinoïdov od spoločnosti SIGMA-ALDRICH, CERILLIANT.

a) JWH-018, 4-hydroxypentyl metabolit roztok

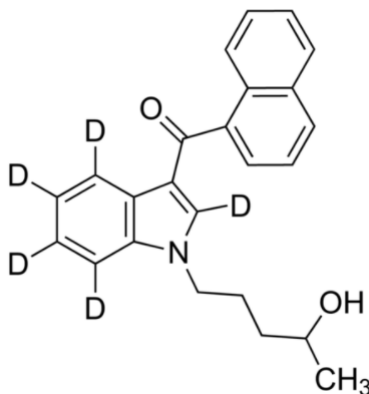
Obrázok 17: Vzorec JWH-018, 4-hydroxypentyl[28]



- 4-hydroxypentylolový analóg, je tiež známy ako Omega OH⁻¹ metabolit JWH-018,
- ide o hlavný močový metabolit JWH-018, syntetického kannabinoïdu, ktorý sa nachádza v niekoľkých verziách bylinnej zmesi Spice,
- balenie obsahuje 1 ampulku o objeme 1 mL, koncentrácia 100 µg/mL v metanole[28].

b) JWH-018, 4-hydroxypentyl metabolit roztok, D5 (indole-D5) roztok

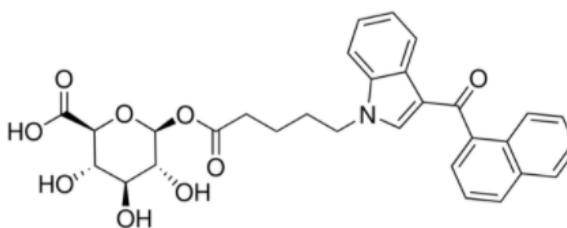
Obrázok 18: Vzorec JWH-018, 4-hydroxypentyl, D5 (indole-D5)[29]



- Stabilne značený vnútorný štandard 4-hydroxypentyl metabolit JWH-018
- Balenie obsahuje 1 ampulku o objeme 1 mL.
- Koncentrácia: 100 µg/mL v metanole[29].

c) JWH-018, 5-Pentanoic kyselina beta D-glukoronidová roztok

Obrázok 19: Vzorec JWH-018, 5-pentanoic kyselina beta D-glukoronidová[30]



- Glukuronidový metabolit sekundárneho močového metabolitu JWH-018.
- Neoprávnené používanie kannabinoidu Spice sa sústreďí na jeho psychoaktívne účinky, ktoré napodobňujú účinky Δ -9-THC v konope.
- Certifikovaný roztok „Snap-N-Spike“ je vhodný ako výstupný materiál pre kalibrátory a kontroly v metódach testovania kannabinoidov prítomných v moči, pre forenznú analýzu a aplikáciu v klinickej toxikológii.
- Balenie obsahuje 1 ampulku o objeme 1 mL
- Koncentrácia: 100 µg/mL (acetonitril : voda /90:10/)[30].

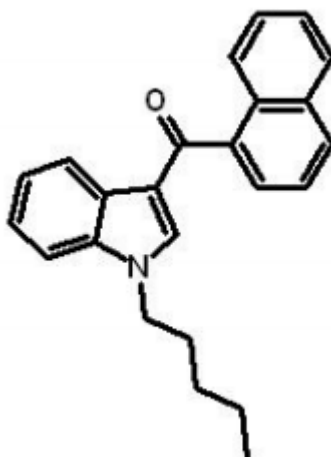
d) Spice Cannabinoid Mix roztok

- Viaczložková zmes obsahujúca Spice kannabinoidy JWH-250, JWH-200, HU-211 a CP 47,497 a tiež homológa CP 47,497 C8,

- 5 syntetických cannabinoidov klasifikovaných, podľa americkej agentúry pre vymáhanie drog (DEA – Drug Enforcement Agency), do kategórie najviac kontrolovaných substancií: JWH-018, JWH-200, JWH-073, CP-47,497 a jeho homológa C8.
- Balenie obsahuje 1 ampulku o objeme 1 mL.
- Koncentrácia: 100 µg/mL každá zložka v acetonitrile[31].

Ako modelová látka v našej diplomovej práci je JWH-018.

Obrázok 20: Vzorec JWH-018 ($C_{24}H_{23}NO$, molekulová hmotnosť 341,45 g/mol)[32]



JWH-018 je naftoylindol alkylovaný na indolovom dusíku. Chemicky ho možno považovať za relatívne inertný, pretože je substituovaná reaktívna poloha C-3 s naftoylovou časťou.

Má relatívne vysokú väzbovú afinitu (vyjadrenú ako IC_{50} – obsadenie 50% receptorov) smerom ku kannabinoidnému receptoru CB1 (9,0 nM +- 5) a ku CB2 (2,94 nM +- 2), v porovnaní s väzbovými afinitami THC (40,7 nM +- 1,7 pri CB1 a 36,4 nM +-10 pri CB2).

Chimalakonda a kolektív testovali biologické účinky s použitím in vitro guanozín-5'-O-(3-thio)-triptofosfátu. Zlúčenina vykazovala úplné agonistické vlastnosti. JWH-018 indukuje inhibíciu forskolínom stimulované cAMP akumulované v bunkových líniiach CHO, exprimujúce CB1 receptory[32].

Na základe týchto údajov a klinických pozorovaní, sa dá predpokladať, že JWH-018 vykazuje typické účinky agonistov CB1, ktoré zahŕňajú sedáciu, kognitívne dysfunkcie, tachykardiu, ataxie, sucho v ústach a psychotropné účinky.

Dva experimenty, ktoré boli vykonané na sledovanie pôsobenia účinkov na ľudí, popisujú v literatúre Auwärter a kolektív, ktorí opísali začervenanie očných spojiviek, výrazné zvýšenie frekvencie srdečného tepu, zmenu nálad, po vyfajčení bylinnej zmesi, ktorá obsahovala homológ C8 z CP47,497 a JWH-018[32].

V ďalšom experimente, Teske a kolektív, uverejnili samopokus, do ktorého boli zahrnutí dvaja dobrovoľníci, ktorí popisovali účinky ako nevoľnosť, sedácia, bezprostredne po vyfajčení približne 50 µg/kg dávky JWH-018. Maximálne koncentrácie u dobrovoľníkov boli asi 10 ng/mL[32].

Príprava analytických vzoriek v našom experimente:

Objem vzorky: 400 µL

Prídavok K/QC: 10 µL

Príprava kalibračných roztokov:

- Objem: 1400 µL.
- Zásobný kalibračný roztok (ng/mL): 100 000.
- KAN-K1 – 10 : 17,2 µL.
- Doplniť na objem 1400 µL: 1382,8 µL metanolu.

Objem rady: 300 µL.

Riedenie rady: 171 µL predchádzajúceho kalibračného roztoku a 129 µL metanolu.

Príprava kalibračného roztoku pre optimalizáciu metódy:

- 390 µL séra + 10 µL K1-10 + 40 µL 0,2M NaOH alebo 40 µL 0,1 M octový pufr s pH 5,25.
- + 1,2 mL KAN LLE s IS.

Tabuľka 3: Hodnoty výstupných kalibračných roztokov JWH-018

KAN-K1	8
KAN-K2	14
KAN-K3	25
KAN-K4	43
KAN-K5	75
KAN-K6	131
KAN-K7	230
KAN-K8	402
KAN-K9	704
KAN-K10	1231

Tabuľka 4: Výsledné hodnoty kalibračných roztokov vo vzorke

	JWH-018
Kalibračný roztok	S035 (JWH-018 4-hydroxypentyl metabolit)
Číslo	ng/mL
0	0
1	0,20
2	0,35
3	0,61
4	1,07
5	1,88
6	3,28
7	5,74
8	10,05
9	17,59
10	30,79

Tabuľka 5: Výsledné koncentrácie vo vzorke QC

KAN-QC		
	ng/mL	
MIX A	1000	10 µL do 1000 µL
MIX B	100	z MIX A
MIX C	10	z MIX B
MIX D	5	z MIX C

JWH-018 vnútorný štandard (IS):

- Objem vzorky: 400 µL.
- Prídavok IS: 10 µL.
- Výsledné koncentrácie vo vzorke: JWH-018 IS (JWH-018 D5)
→ IS: 5 ng/mL.

Hodnoty IS JWH-018 pracovný roztok:

- JWH-018-IS = 200.

Tabuľka 6: Príprava IS – JWH-018-IS

Objem	1000 µL
Zásobný roztok	10 000 ng/mL (10x predriediť)
IS	20 µL
Doplniť na objem 1000 µL	980 µL metanolu

Tabuľka 7: Príprava JWH-018 LLE s IS

Objem	60 mL
Ethylacetát	57,60 mL
DCM	2,40 mL
JWH-018-IS	0,50 mL
Isopropanol	1,00 mL

Príprava vzorky:

- 400 µL séra + 40 µL 1M HCl + 1,2 mL KAN LLE s IS.
- 10 minút vortex pri 1500 otáčkach za minútu, následná centrifugácia pri otáčkach 15 000 za minútu pri 20°C → bolo odobrané 900 µL a odparené.
- Rozpustené v 80 µL zmesi (39% metanol + 39% acetonitril + 20% voda + 2% hexan).

Na analýzu boli použité 3 typy kolón:

1. Phenyl Hexyl Kinetex[®], 100 x 2,1 mm, 1,7 µm, Phenomenex, CA, USA (screening).
2. Luna Omega[®] Polar C18, 50 x 2,1 mm, 1.6 µm, Phenomenex, CA, USA (kvantita).
3. Arion[®] Polar C18 UHPLC, 50 x 2,1 mm, 2.2 µm, Chromservis, CZ (kvantita).

Použité mobilné fázy:

- **A:** 0,1 % HCOOH + H₂O.
- **B:** MeOH/ MeCN/ HCOOH (50:50:0,1%).

Screeningový gradient na kolóne 1.:

Tabuľka 8: Podmienky pre prietok a gradient na 1.kolóne screening

	Štart	Sekunda	Prietok	Gradient	%A	%B
1.	0,00	75	0,50	Step	98,00	2
2.	1,25	540	0,50	Ramp		100
3.	10,25	130	0,50	Step		100
4.	12,42	155	0,50	Step	98	2

- Odvážací ventil A 1-2 na detektore 10 minút.

Q-Exactive Focus: MS

- **Režim skenovania:** Full MS-AIF (all ion formation – všetky iónové formácie).
- **Šírka chromatografického píku:** 6s.
- **Dĺžka metódy:** 15,00 minút.
- **Rozlíšenie:** 70 000.

- **Rozsah skenovania:** 60 – 900 m/z.
- **Kolízna energia stepped:** 17.5, 35, 52.5.
- **Automatické vyrovňovanie citlivosti (AGC targed):** 1e6.
- **H-ESI → prietok plášťového plynu:** 45,
→ prietok pomocného plynu: 15.
- **Striekacie napätie:** 3,5 kV.
- **Teplota na kapiláre:** 350 °C.
- **S-šošovky RF level:** 60,0.

Screeningový gradient na kolóne 1. (SYKAN):

Tabuľka 9: Podmienky pre prietok a gradient na 1.kolóne

	Štart	Sekunda	Prietok	Gradient	%A	%B
1.	0,00	75	0,50	Step	98,00	2
2.	1,25	540	0,50	Ramp		100
3.	10,25	130	0,50	Step		100
4.	12,42	155	0,50	Step	98	2

- Odvážací ventil A 1-2 na detektore 13 minút.

Q-Exactive Focus: MS

- **Režim skenovania:** Full MS-AIF.
- **Šírka chromatografického píku:** 6s.
- **Dĺžka metódy:** 15,00 minút.
- **Rozlíšenie:** 70 000.
- **Rozsah skenovania:** 60 – 900 m/z.

- **Kolízna energia (stepped):** 17.5, 35, 52.5.
- **Automatické vyrovňovanie citlivosti (AGC targed):** 1e6.
- **H-ESI → prietok plášťového plynu:** 45,
 → prietok pomocného plynu: 15.
- **Striekacie napätie:** 3,5 kV
- **Teplota na kapiláre:** 350 °C.
- **S-šošovky RF level:** 60,0.

Kvantitatívny gradient na kolóne 2. – grad 100 %A(90-625):

Tabuľka 10: Podmienky pre prietok a gradient na 2. kolóne

	Štart	Sekunda	Prietok	Gradient	%A	%B
1.	0,00	30	0,60	Step	99,00	1
2.	0,50	940	0,60	Ramp		100
3.	16,17	50	0,60	Step		100
4.	17	70	0,60	Step	99	1

- Odvážací ventil A 1-2 na detektore 16 minút.

Q-Exactive Focus: MS

- **Režim skenovania:** Full MS-AIF.
- **Šírka chromatografického píku:** 6s.
- **Dĺžka metódy:** 15,00 minút.
- **Rozlíšenie:** 70 000.
- **Rozsah skenovania:** 90 – 625 m/z.
- **Automatické vyrovňovanie citlivosti (AGC targed):** 1e5.
- **H-ESI → prietok plášťového plynu:** 45,

→ prietok pomocného plynu: 15.

- Striekacie napätie: 3,5 kV.
- Teplota na kapiláre: 350 °C.
- S-šošovky RF level: 60,0.

Kvantitatívny gradient na kolóne 3. – grad100%A(90-625):

Tabuľka 11: Podmienky pre prietok a gradient na 3. kolóne

	Štart	Sekunda	Prietok	Gradient	%A	%B
1.	0,00	30	0,60	Step	99,00	1
2.	0,50	940	0,60	Ramp		100
3.	16,17	50	0,60	Step		100
4.	17	70	0,60	Step	99	1

- Odvádzací ventil A 1-2 na detektore 16 minút.

Q-Exactive Focus: MS

- Režim skenovania: Full MS-AIF.
- Šírka chromatografického píku: 6s.
- Dĺžka metódy: 15,00 minút.
- Rozlíšenie: 70 000.
- Rozsah skenovania: 90 – 625 m/z.
- Automatické vyrovňovanie citlivosti (AGC targeted): 1e5.
- H-ESI → prietok plášťového plynu: 45,
→ prietok pomocného plynu: 15.
- Striekacie napätie: 3,5 kV.
- Teplota na kapiláre: 350 °C.
- S-šošovky RF level: 60,0.

Kvantitatívny gradient v skenovacom móde PRM na kolóne 2.

(MS2 m/z = 155.04546 – 155.04959, FTMS + p ESI Full MS2)

PRM sken v preklade znamená monitorovanie paralelnej reakcie. Je to cieľená metóda kvantifikácie, ktorá je uskutočňovaná pomocou hybridného hmotnostného spektrometra s vysokým rozlíšením, ako je napr. Quadrupól-Orbitrap (q-OT). Vývoj a realizácia fragmentácie disociácie, vyvolanej vysokou energiou (tzv. HCD), umožnila získanie spektier MS/MS v analyzátore OrbitrapTM s vysokým rozlíšením a vysokou presnosťou hmotnosti.

V PRM, ak sa vykonáva v q-OT, je vybraný prekurzorový ión v kvadrupóle a prenesený cez C-pascu do HCD cely na fragmentáciu. Z HCD cely sa fragmentované ióny prenesú do C-pasce a nakoniec sa vstreknú a analyzujú v hmotnostnom analyzátore OrbitrapTM[33].

Tabuľka 12: Podmienky pre prietok a gradient na 2. kolóne v PRM skene

	Štart	Sekunda	Prietok	Gradient	%A	%B
1.	0,00	30	0,60	Step	99	1
2.	0,50	940	0,60	Ramp		100
3.	16,17	50	0,60	Step		100
4.	17	70	0,60	Step	99	1

- Odvážací ventil A 1-2 na detektore od 7 – 14 minút

Q-Exactive Focus: MS

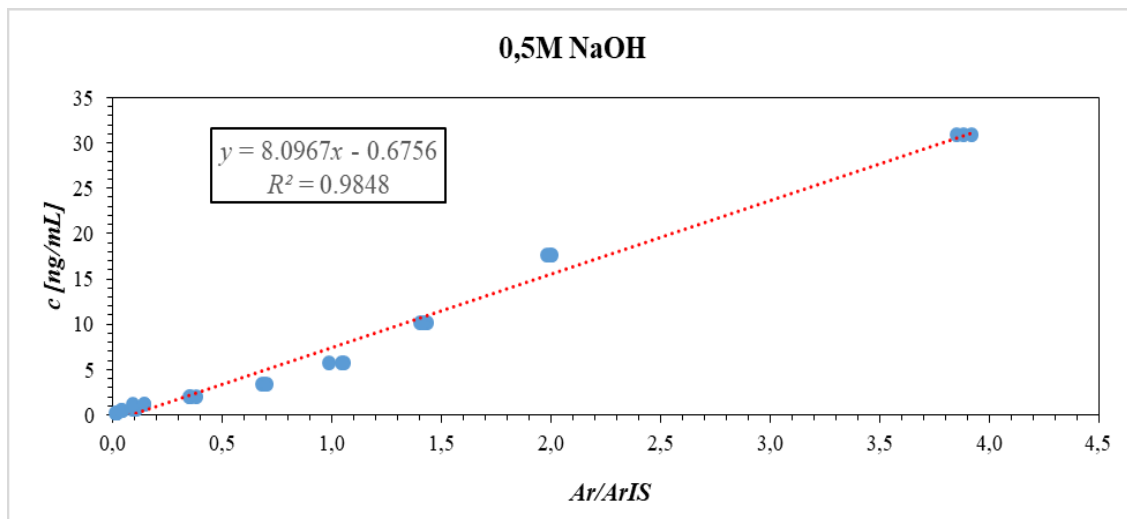
- **Režim skenovania:** Full MS-AIF.
- **Šírka chromatografického píku:** 6s.
- **Dĺžka metódy:** 15,00 minút.
- **Rozlíšenie:** 70 000.
- **Rozsah skenovania:** 90 – 625 m/z.

- **PRM:**
 - m/z 358.18016, vzorec $C_{24}H_{23}NO_2$, druh +H, pozitívna polarita
 - m/z 363.21154, vzorec $C_{24}H_{18}D_5NO_2$, +H, pozitív
- **Automatické vyrovňovanie citlivosti (AGC targeted):** 1e5.
- **H-ESI → prietok plášťového plynu:** 45,
→ prietok pomocného plynu: 15.
- **Striekacie napätie:** 3,5 kV.
- **Teplota na kapiláre:** 350 °C.
- **S-šošovky RF level:** 60,0.

8. VÝSLEDKY

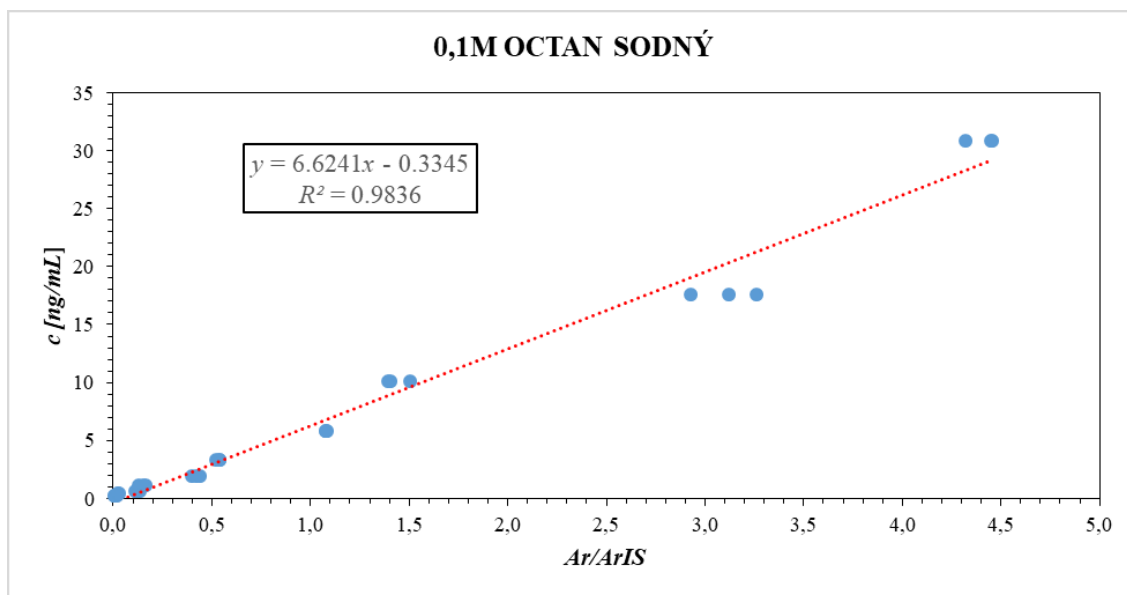
A) Meranie JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) na kolóne Arion® Polar C18 UHPLC

Graf 1: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,5M NaOH



Prostredníctvom získaných hodnôt z meraní, ktoré sa vykonali v triplete, sa zostrojila kalibračná krivka. Z nej sme následne vypočítali hodnoty LOD (0,0012 ng/mL) a LOQ (0,0036 ng/mL). Na ose x sú hodnoty pomeru Ar/ArIS a na ose y je koncentrácia v ng/mL. Pomer Ar/ArIS je vypočítaný z hodnôt pomer plochy/ pomer plochy s IS.

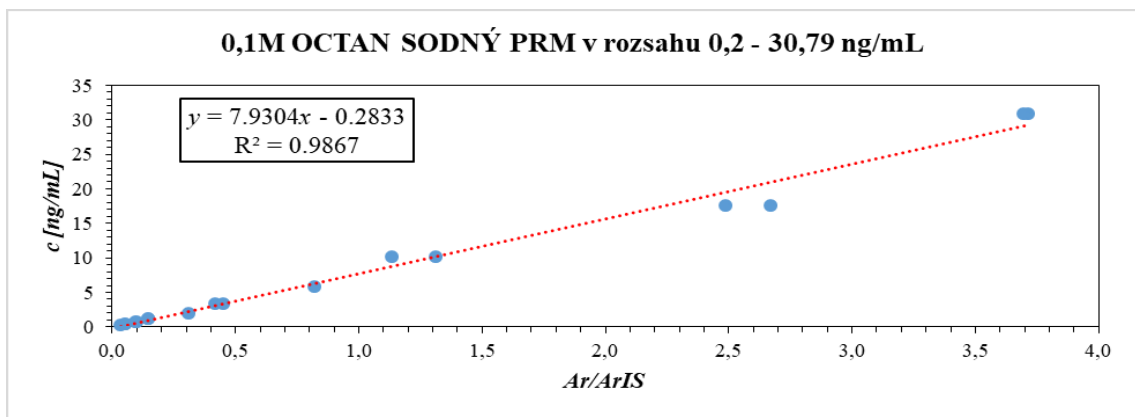
Graf 2: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný



Vypočítané hodnoty LOD (0,0025 ng/mL) a LOQ (0,0075 ng/mL). Na ose x sú hodnoty pomeru Ar/ArIS a na ose y sú koncentrácie v ng/mL.

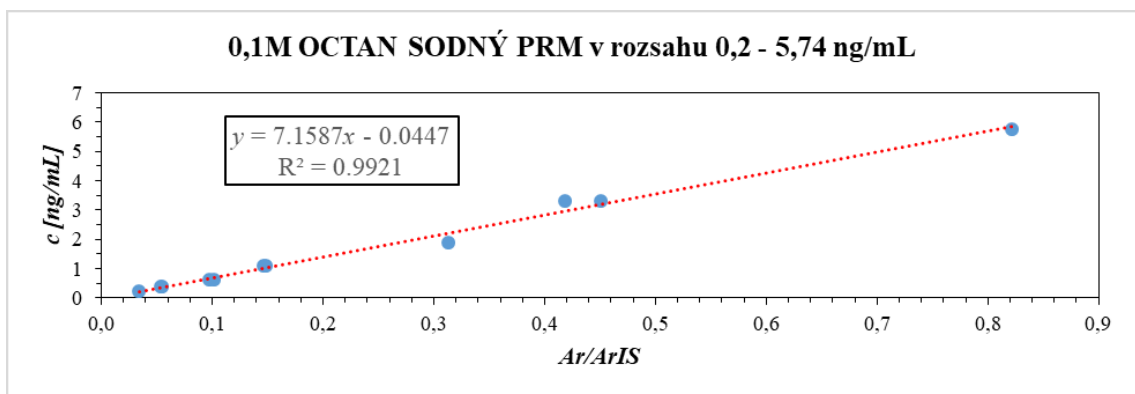
Meranie bolo následne doplnené metódou PRM sken. Interval bol vyhodnotený pomocou TIC a analyt JWH-018 N-OH pentyl na m/z 155.04546-155.04959 (presnosť okolo 2 ppm).

Graf 3: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL



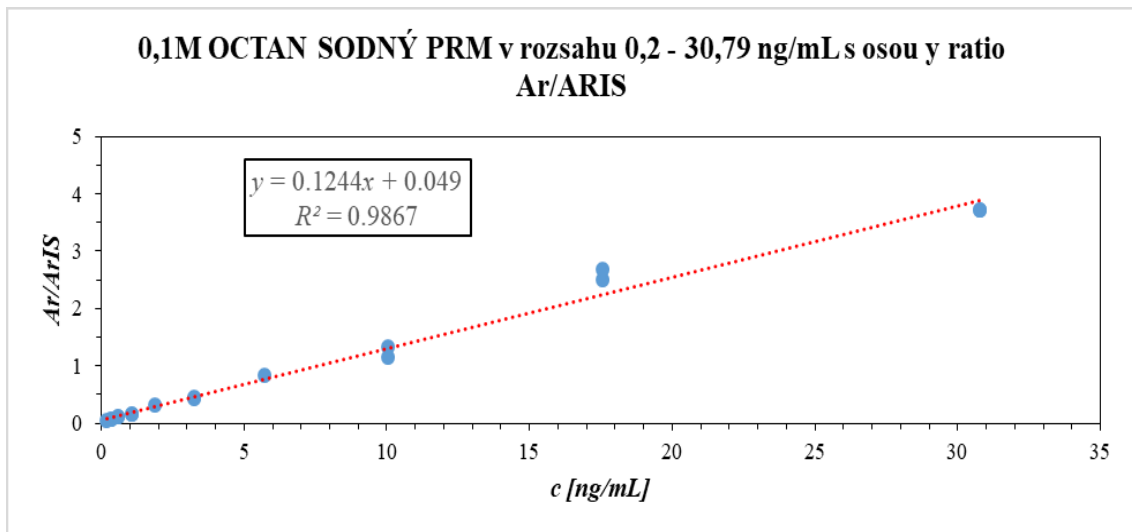
Vypočítané hodnoty LOD (0,0072 ng/mL) a LOQ (0,0219 ng/mL). Os x popisuje pomer Ar/ArIS a os y koncentráciu (ng/mL). Na ose x sú znázornené hodnoty pomeru Ar/ArIS.

Graf 4: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL



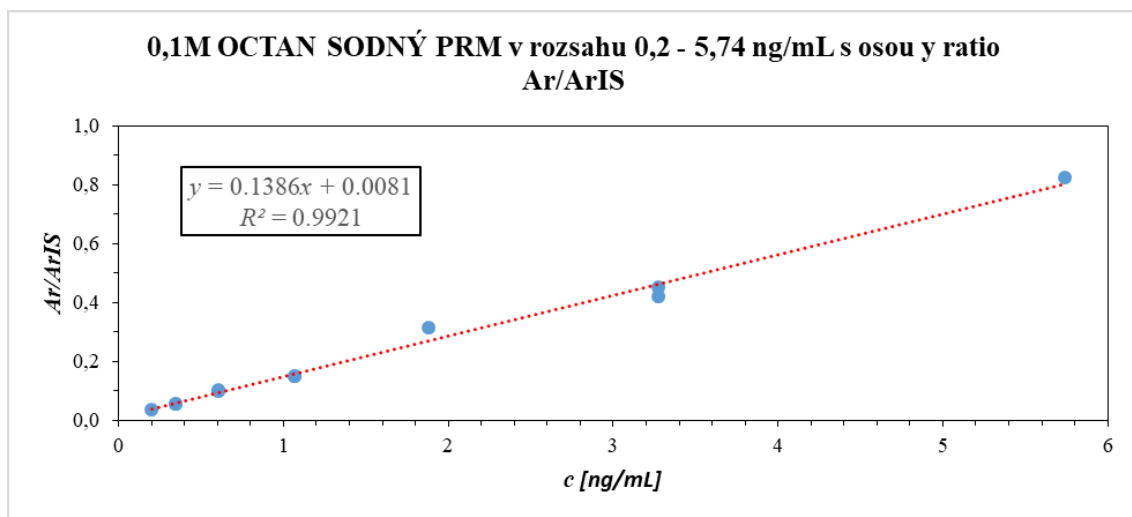
Výsledné hodnoty LOD (0,0079 ng/mL) a LOQ (0,0242 ng/mL). Na ose x sú znázornené hodnoty pomeru Ar/ArIS a na ose y koncentrácia (ng/mL).

Graf 5: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL ratio Ar/ArIS



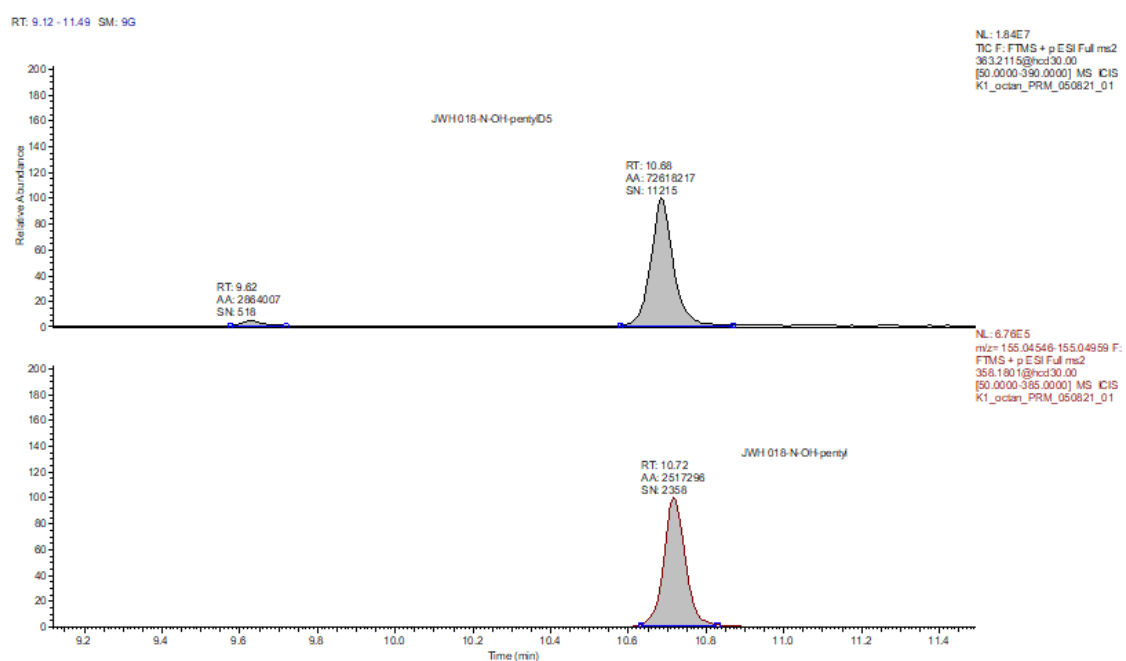
Výsledné hodnoty LOD (0,0128 ng/mL) a LOQ (0,0386 ng/mL). Na ose x je koncentrácia (ng/mL) a na ose y pomer Ar/ArIS.

Graf 6: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL ratio Ar/ArIS



Výsledné hodnoty LOD (0,0115 ng/mL) a LOD (0,0347 ng/mL). Na ose x je znázornená koncentrácia (ng/mL) a na ose y pomer Ar/ArIS.

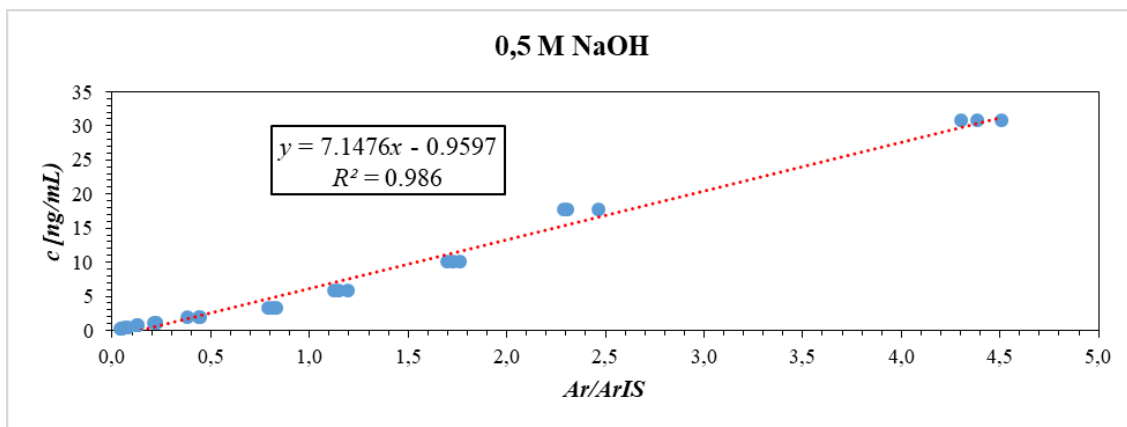
Obrázok 21: K1 kalibračný roztok v PRM skene



Na obrázku č.20 sú vyobrazené hmotnostné spektrá 2 analytov – JWH-018 – N-(hydroxypentyl)D5 s retenčným časom 10,68 a JWH-018-N-OH pentyl s RT 10,72.

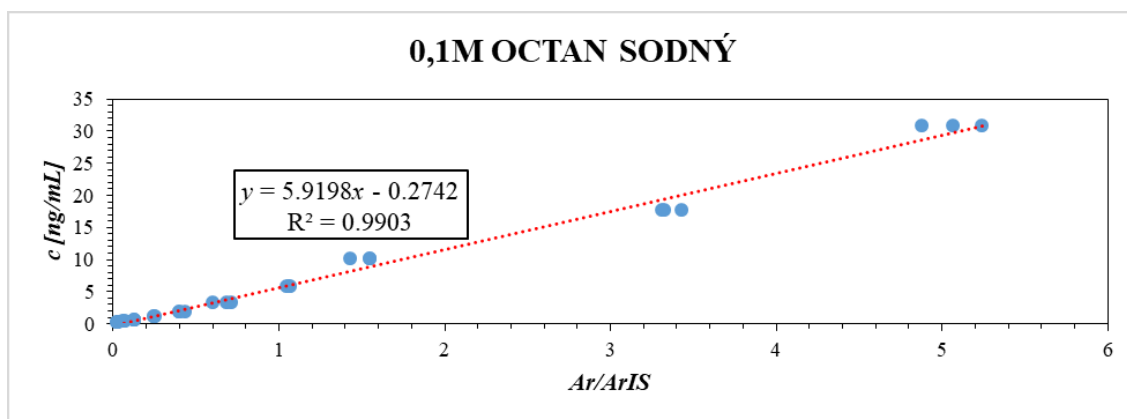
B) Meranie JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) na kolóne Luna Omega® Polar C18

Graf 7: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,5M NaOH



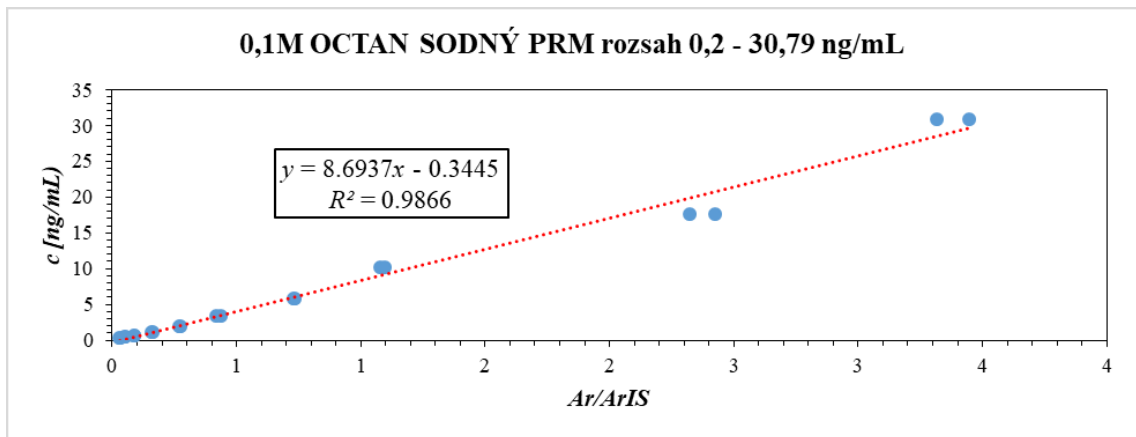
Vypočítané hodnoty LOD (0,0015 ng/mL) a LOQ (0,0044 ng/mL). Na ose x sú znázornené pomery Ar/ArIS a na ose y je koncentrácia (ng/mL).

Graf 8: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný



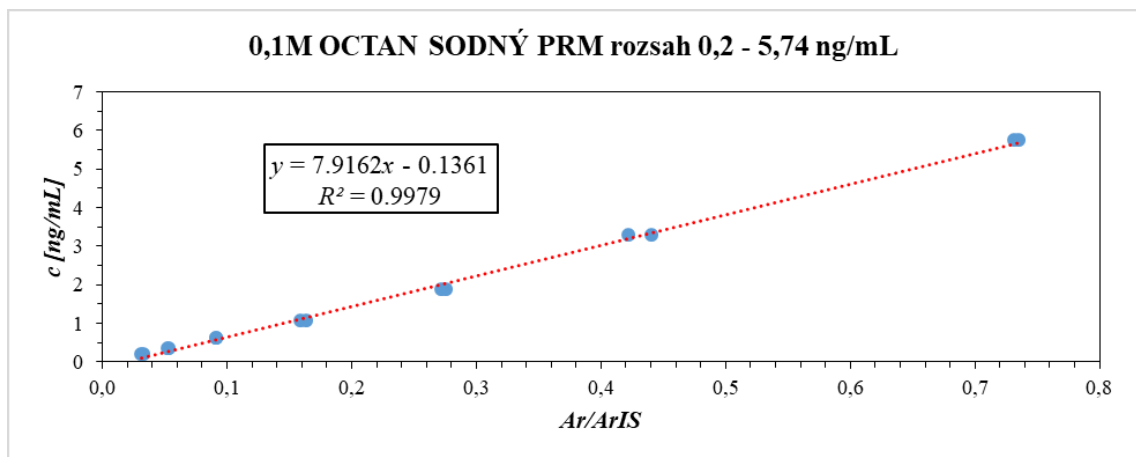
Vypočítané hodnoty LOD (0,0021 ng/mL) a LOQ (0,0063 ng/mL). Na ose x sú znázornené pomery Ar/ArIS a na ose y koncentrácia (ng/mL).

Graf 9: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, metódou PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL



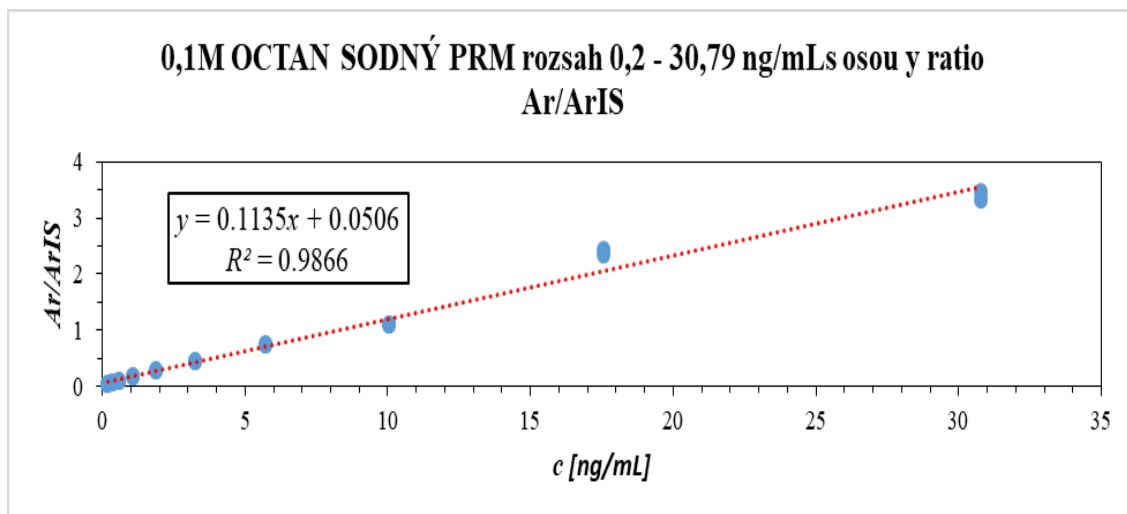
Pomocou metódy PRM sa analyt zmeral duplicitne a z výsledných hodnôt boli opäť vypočítané hodnoty LOD (0,0003 ng/mL) a LOQ (0,0010 ng/mL). Os x popisuje pomer Ar/ArIS a os y koncentráciu (ng/mL).

Graf 10: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, metódou PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL



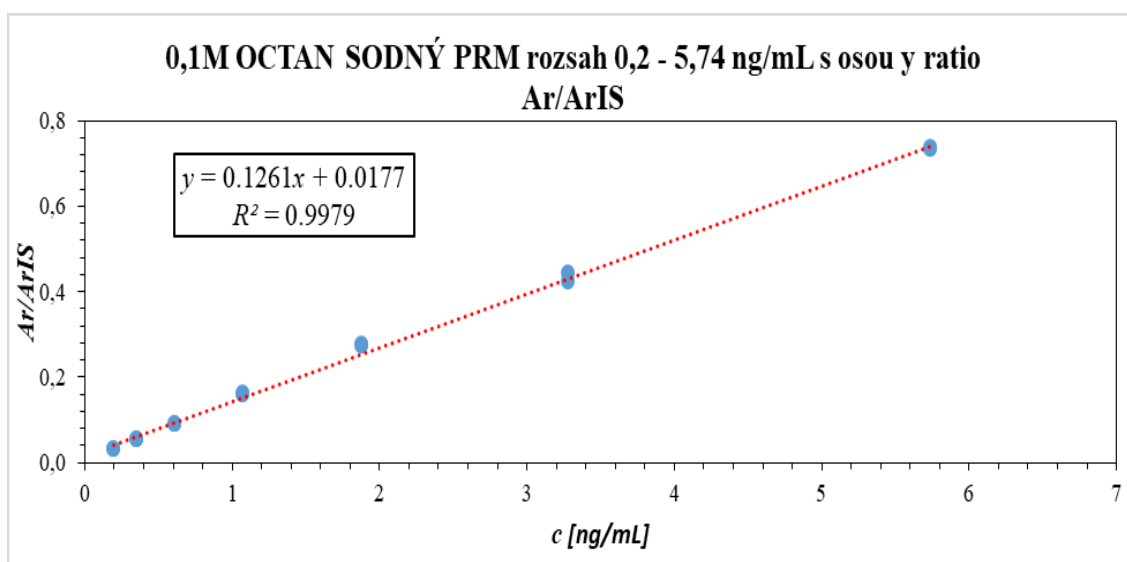
Vypočítané hodnoty LOD (0,0004 ng/mL) a LOQ (0,0011 ng/mL). Na ose x sú vyhodnotené pomery Ar/ArIS a na ose y koncentrácia (ng/mL).

Graf 11: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL ratio Ar/ArIS



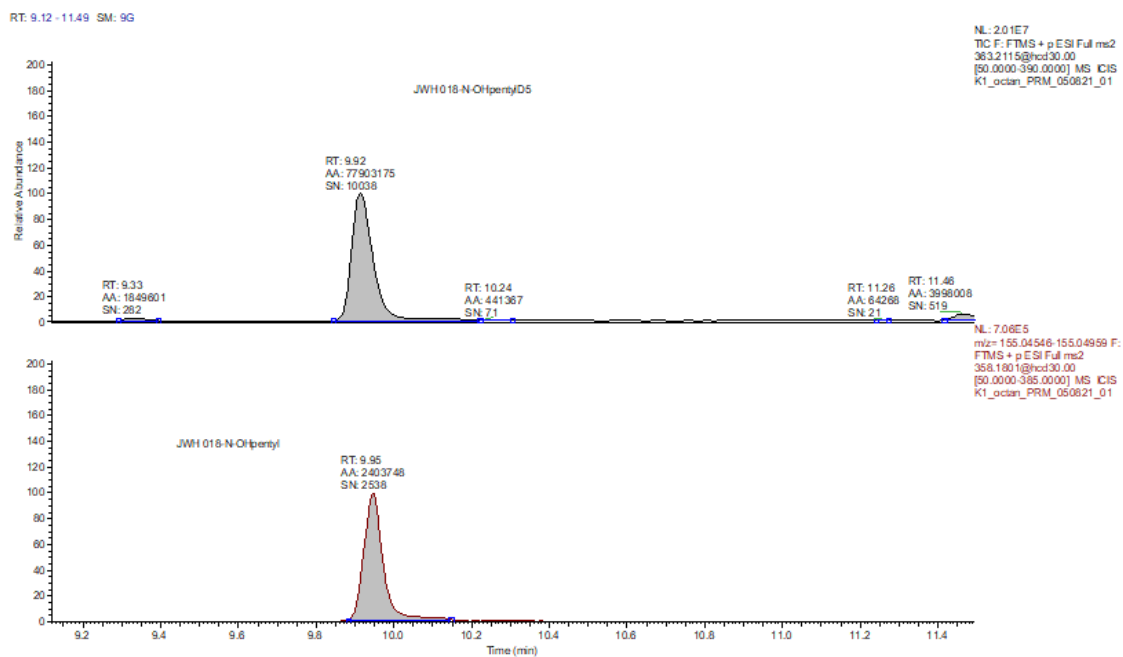
Vyobrazenie kalibračnej krivky sme ešte doplnili o korekciu čísel s osou y ako pomer Ar/ArIS. V tomto prípade vyšli hodnoty LOD (0,0257 ng/mL) a LOQ (0,0780 ng/mL). Na ose x sú vyobrazené hodnoty koncentrácie (ng/mL) a na ose y sú hodnoty pomeru Ar/ArIS.

Graf 12: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M Octan sodný, v PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL ratio Ar/ArIS



Vypočítané hodnoty LOD (0,0232 ng/mL) a LOQ (0,0702 ng/mL). Na ose x sú vyobrazené hodnoty koncentrácie (ng/mL) a na ose y hodnoty pomeru Ar/ArIS.

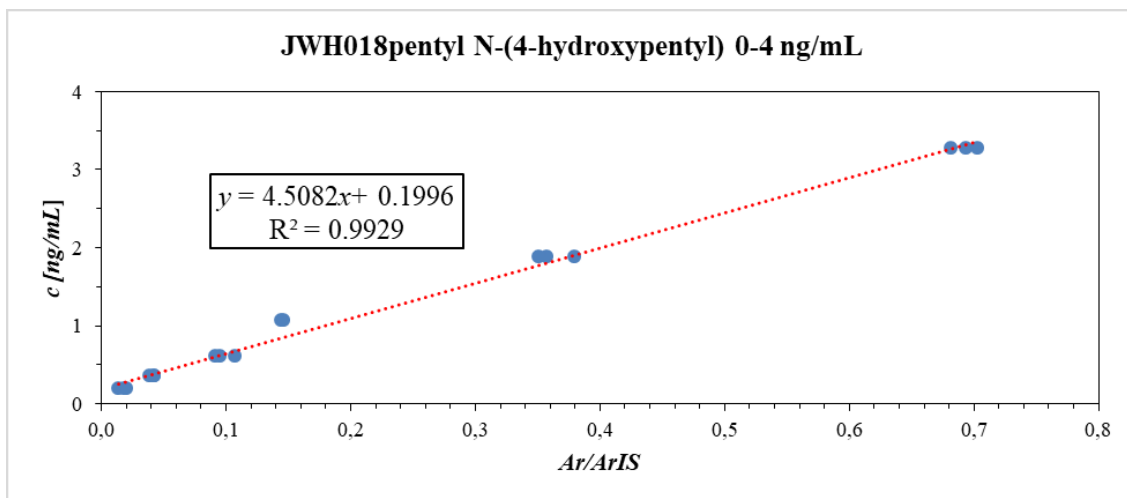
Obrázok 22: K1 kalibračný roztok v PRM skene



Na obr. č.21 sú zobrazené dve hmotnostné spektrá s analytmi JWH-018 N-OH-pentylD5 (RT = 9,92) a JWH-018-N-OH-pentyl (RT =9,95).

C) Meranie JWH-018 N-(4-hydroxypentyl)

Graf 13: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) v rozsahu 0 – 4 ng/mL



Meranie analytu JWH-018 pentyl v rozsahu 0 – 4 ng/mL. Výsledné hodnoty LOD (0,0021 ng/mL) a LOQ (0,0064 ng/mL). Na ose x sú zadané hodnoty pomeru Ar/ArIS (pomer plochy/ pomer plochy s IS).

LOD je najnižšia koncentrácia analytu, pri ktorej je detekcia možná.

LOQ je najnižšia koncentrácia, pri ktorej je možné analyt nielen spoľahlivo zistiť, ale aj pri ktorej sú splnené niektoré preddefinované ciele skreslenia a nepresnosti. Môže byť ekvivalentný k hodnote LOD[34].

R^2 by mal byť $\geq 0,990$.

Tabuľka 13: Výsledné hodnoty LOD, LOQ a R^2 JWH-018 4-hydroxypentyl

Kolóna	JWH-018 pentyl (0 - 4 ng/mL)	Luna Omega Polar C18		ARION Polar C18 UHPLC	
		0,5M NaOH	0,1M octan sodný	0,5M NaOH	0,1M octan sodný
LOD (ng/mL)	0,0021	0,0015	0,0021	0,0012	0,0025
LOQ (ng/mL)	0,0064	0,0044	0,0063	0,0036	0,0075
R^2	0,9929	0,986	0,9903	0,9848	0,9836

Tabuľka 14: Výsledné hodnoty LOD, LOQ, R² v PRM skene na kolóne Arion Polar C18 UHPLC

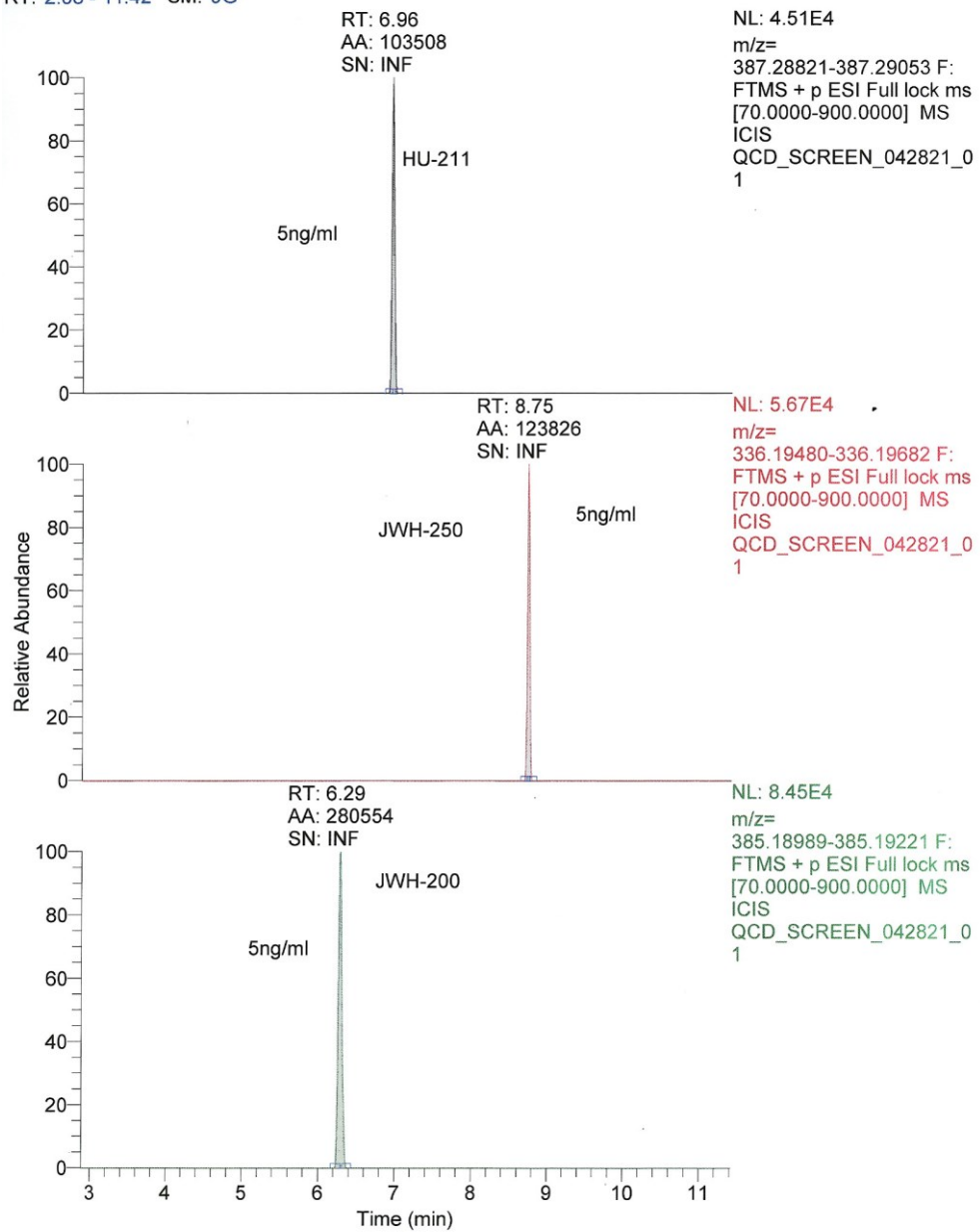
PRM sken		
Kolóna	ARION POLAR C18 UHPLC	
	0,1M octan sodný 0,2 - 30,79 ng/mL	0,1M octan sodný 0,2 - 5,74 ng/mL
LOD (ng/mL)	0,0072	0,0079
LOQ (ng/mL)	0,0219	0,0242
R ²	0,9867	0,9921
	0,1M octan sodný 0,2 - 30,79 ng/mL Ar/ArIS	0,1M octan sodný 0,2 - 5,74 ng/mL Ar/ArIS
LOD (ng/mL)	0,0128	0,0115
LOQ (ng/mL)	0,0386	0,0347
R ²	0,9867	0,9921

Tabuľka 15: Výsledné hodnoty LOD, LOQ, R² v PRM skene na kolóne Luna Omega Polar C18

PRM sken		
Kolóna	LUNA OMEGA POLAR C18	
	0,1M octan sodný 0,2 - 30,79 ng/mL	0,1M octan sodný 0,2 - 5,74 ng/mL
LOD (ng/mL)	0,0003	0,0004
LOQ (ng/mL)	0,0010	0,0011
R ²	0,9866	0,9979
	0,1M octan sodný 0,2 - 30,79 ng/mL Ar/ArIS	0,1M octan sodný 0,2 - 5,74 ng/mL Ar/ArIS
LOD (ng/mL)	0,0257	0,0232
LOQ (ng/mL)	0,0780	0,0702
R ²	0,9866	0,9979

Obrázok 23: Záchyt 5 ng/mL HU-211, JWH-250 a JWH-200 v kontrole QCD

RT: 2.88 - 11.42 SM: 9G

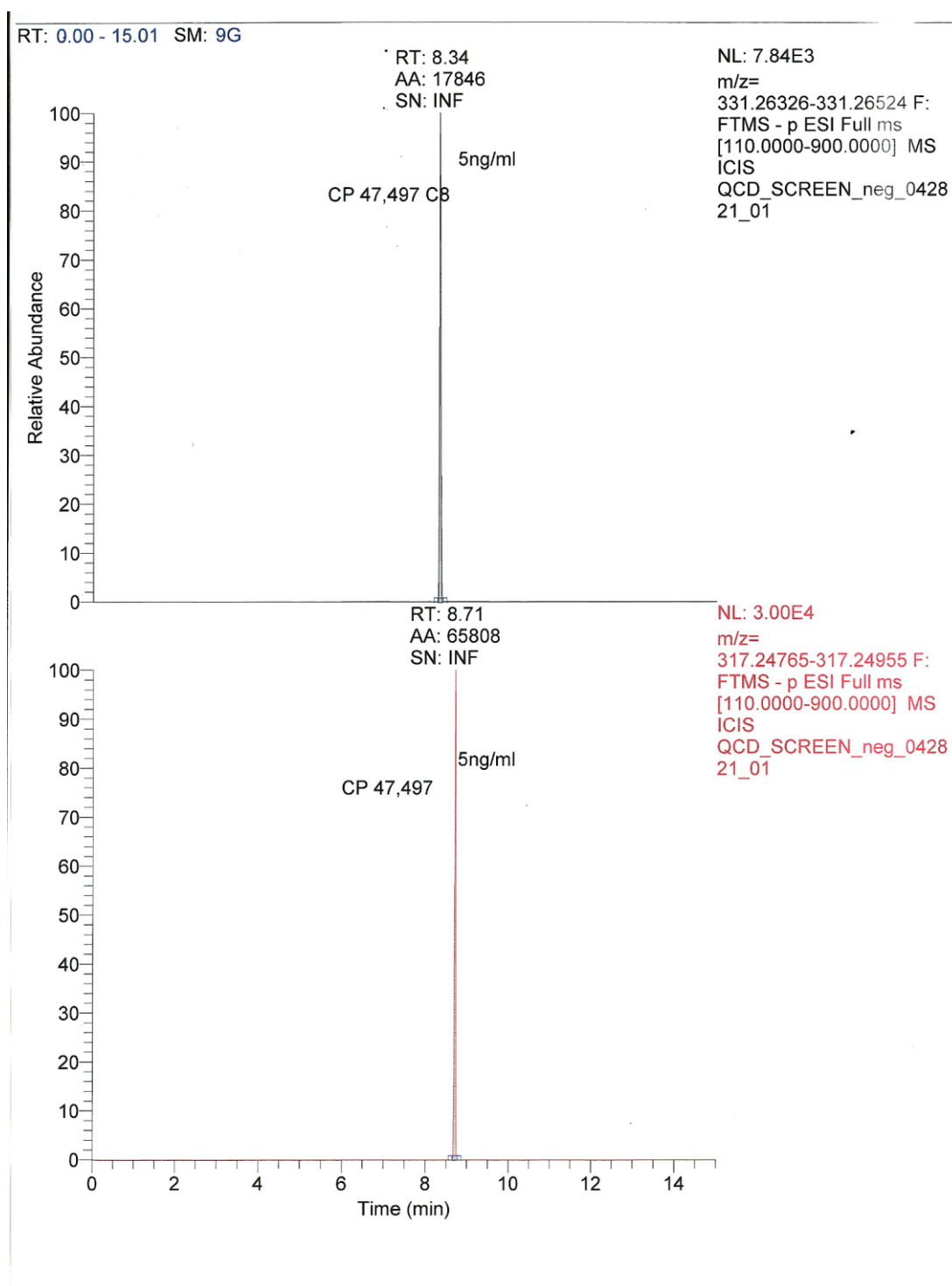


HU-211 → m/z = 387,28821 – 387,29053, RT: 6,96

JWH-250 → m/z = 336,19480 – 336,19682, RT: 8,75

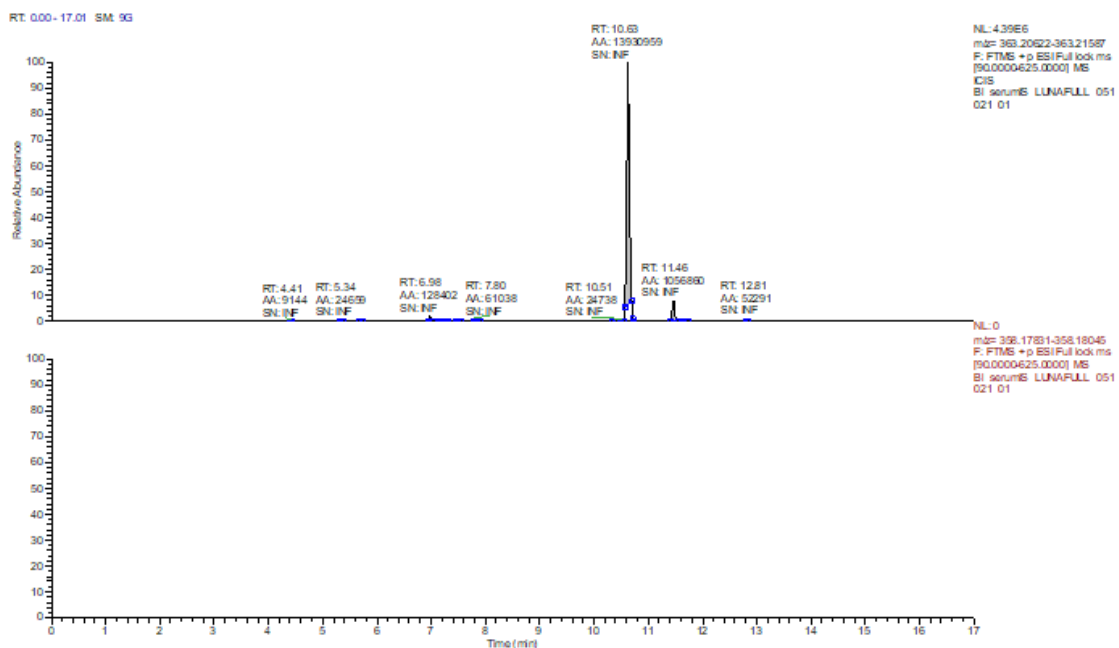
JWH-200 → m/z = 385,18989 – 385,19221, RT: 6,29

Obrázok 24: Záchyt CP 47,497 s homológom CP 47,497 C8

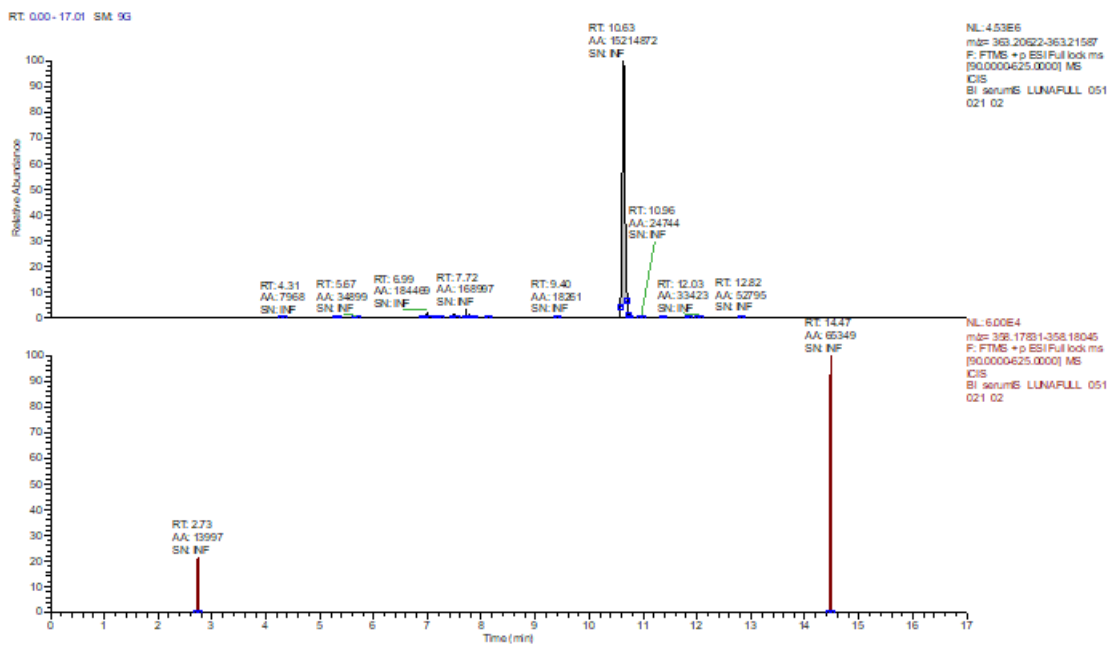


Obrázok č. 23 popisuje chromatogram CP 47,497 s $m/z = 317,24765 - 317,24955$, RT: 8,71 a jeho homológu (o CH_3 vyšší) CP 47,497 C8 s $m/z = 331,26326 - 331,26524$ a s RT: 8,34.

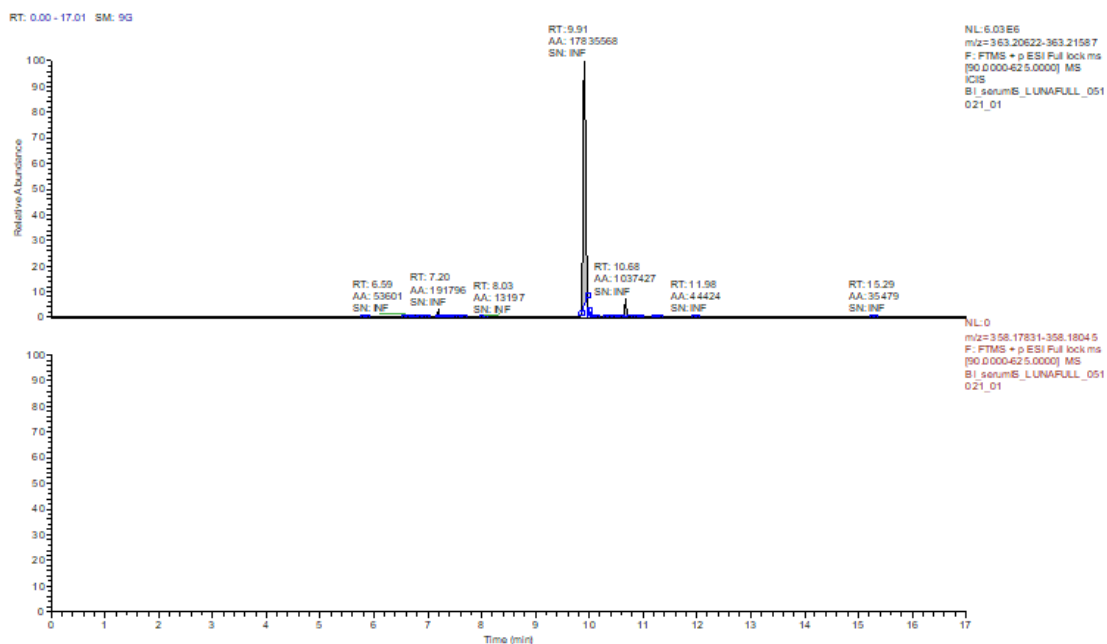
Obrázok 25: Blank s IS na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC, Full MS – 1. nástrek



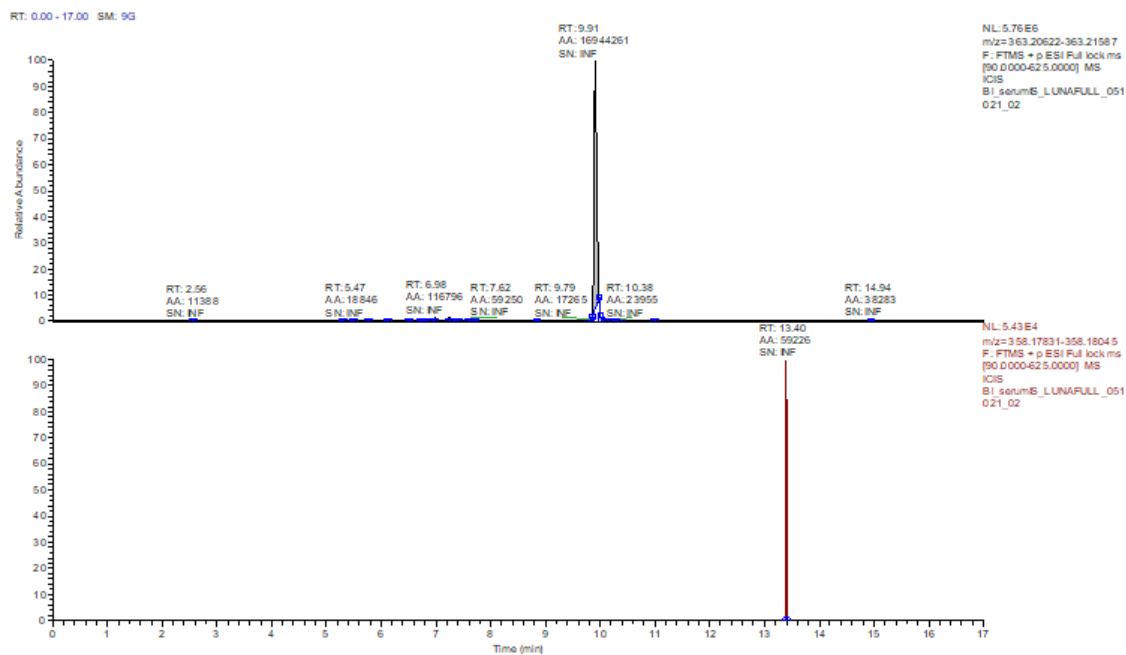
Obrázok 26: Blank s IS na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC, Full MS scan – 2. nástrek



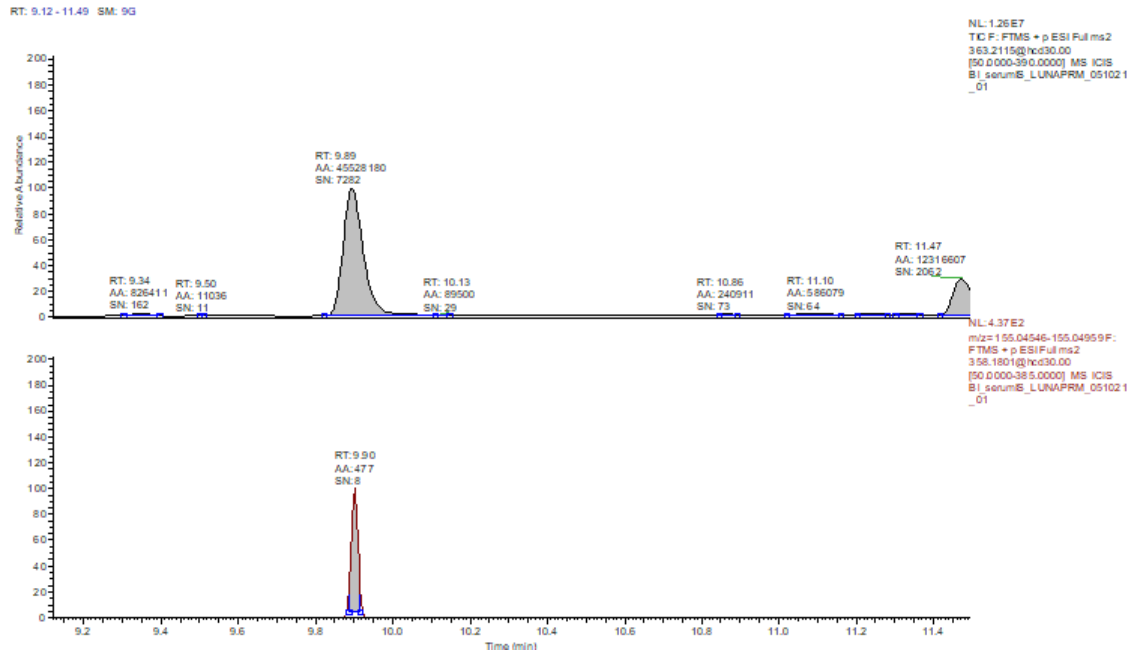
Obrázok 27: Blank s IS na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18, Full MS scan – 1. nástrek



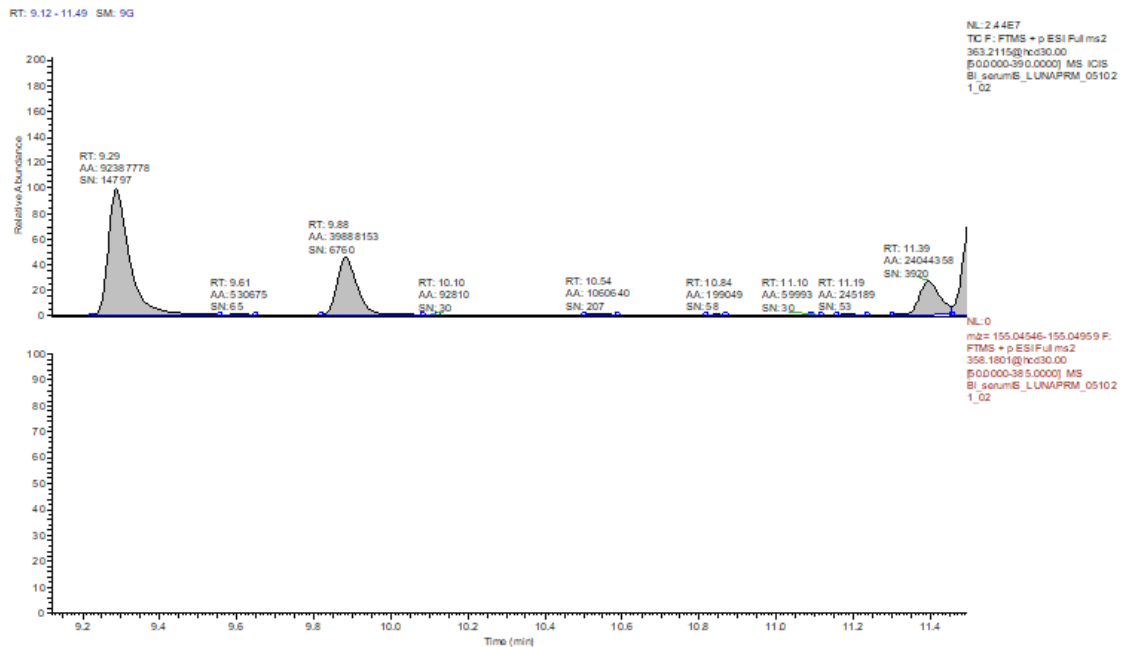
Obrázok 28: Blank s IS na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18, Full MS scan – 2. nástrek



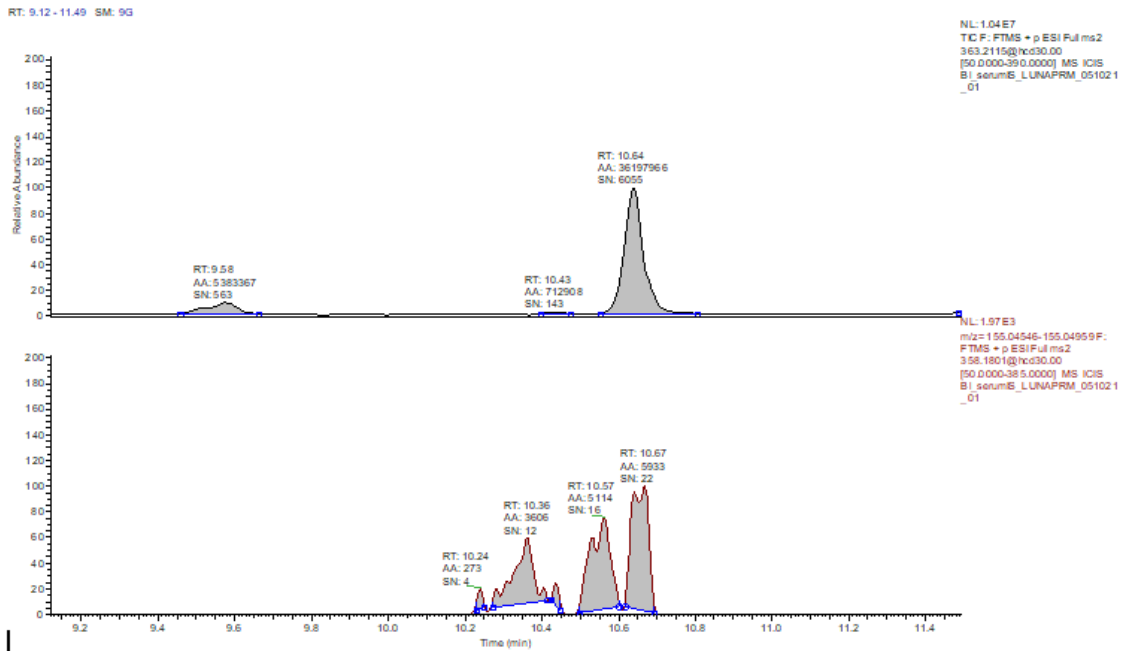
**Obrázok 29: Blank s IS v PRM na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18,
Full MS scan – 1. nástrek**



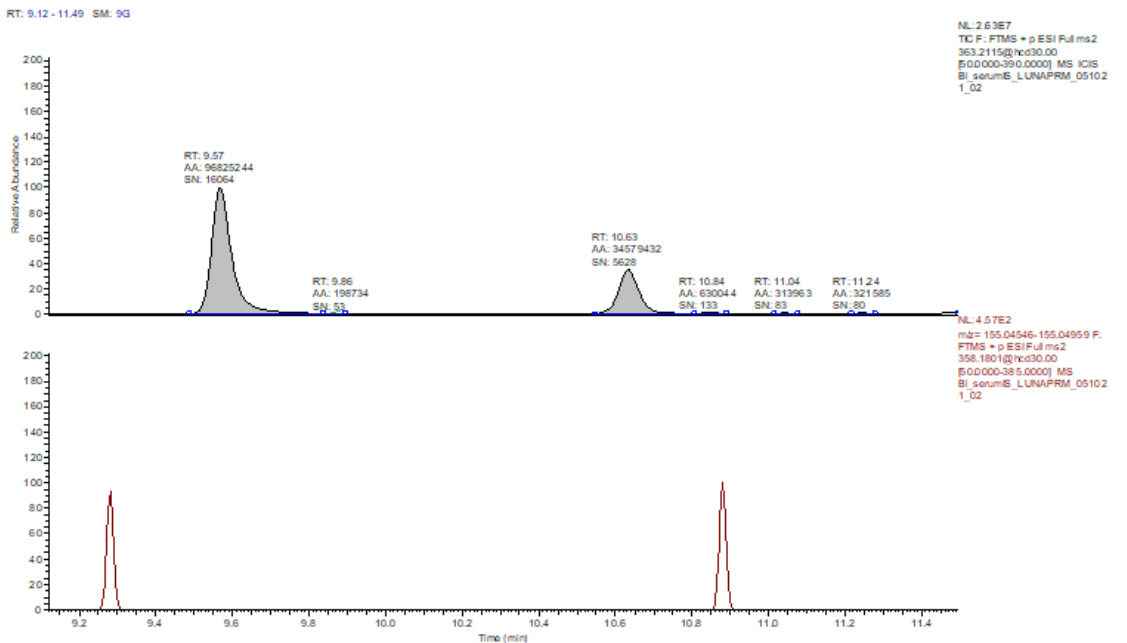
**Obrázok 30: Blank s IS v PRM na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18,
Full MS scan – 2. nástrek**



**Obrázok 31: Blank s IS v PRM na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC,
Full MS scan – 1. nástrek**



**Obrázok 32: Blank s IS v PRM na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC,
Full MS scan – 2. nástrek**



Analýza slepých vzoriek sa vykonala na kolónach Arion® Polar C18 UHPLC a Luna Omega® Polar C18, a taktiež aj v PRM skene. Analyzovali sa s prvou dávkou, aby

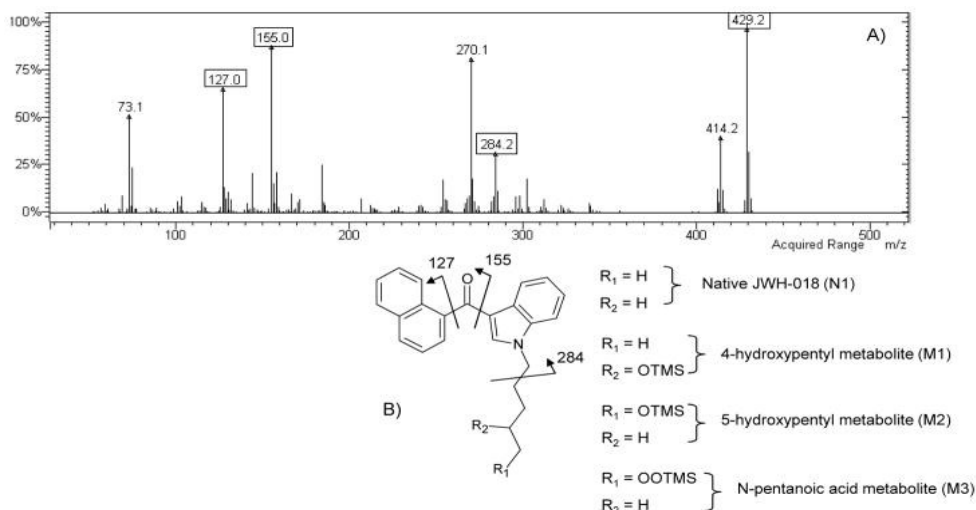
sa vylúčili falošne pozitívne výsledky alebo, aby sa zistila či kolóna nie je náhodou zanesená z predchádzajúcich analýz.

Tabuľka 16: Molekulové a kvantitatívne hodnoty m/z analytov

	JWH-018	JWH-018, 4-hydroxypentyl	JWH-018, D5-hydroxypentyl	JWH-019
	analyt			analyt
	C ₂₄ H ₂₃ NO	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	C ₂₄ H ₁₈ D ₅ NO ₂	C ₂₅ H ₂₅ NO
Mol m/z	342,18524	358,18016	363,21154	356,20089
mód	pozitívny			pozitívny
H+	hydrogen			hydrogen
Rt	8,98	9,90	9,90	9,22
wind	60			60
treshol	500000			500000
treshol	100000			100000
wind 2	80			80
quant m/z	155,04895	155,04895	155,04895	155,04901
qualif m/z 1	125,09616	145,0648	145,0648	228,13802
qualif m/z 2	127,01232	129,06996	127,05426	155,06015
	1 ng/mL			1 ng/mL

Fragmentový ión 155 odpovedá naftykarkoxylovému katiónu, ktorý je relatívne stabilný.

Obrázok 33: EI hmotnostné spektrum metabolitu JWH-018 5-hydroxypentyl, TMS derivát[35]



9. DISKUSIA

Diplomová práca prebiehala na Ústave Klinickej biochémie a diagnostiky vo Fakultnej nemocnici Hradec Králové. V rámci zvýšenia efektivity screeningového systému v toxikologickom laboratóriu pre tzv. „nové drogy“, sme upriamili pozornosť na optimalizáciu analytických metód na záchyt syntetických kannabinoidov typu JWH, ktoré sú v tejto skupine najzastúpenejšie.

Metódy boli realizované na prístroji UHPLC/HRMS – Q Exactive UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap hmotnostný spektrometer, od firmy ThermoFisher Scientific.

Obrázok 34: Technická schéma Q-Exactive platformy[36]



Na obrázku možno vidieť injekčný flatapol, ktorý je pulzovaný na záporné napätie, aby sa zlepšila desolvácia veľkého množstva proteínových komplexov, zatiaľ čo inter-flatapolová šošovka má vysoký pozitívny potenciál, aby sa zabránilo elúcií iónov. Po chytení do pasce, nasleduje obnovenie napätie, ktoré umožňuje nízkoenergetickú elúciu iónov do ohnutého flatapolu („Advanced Active Beam Guide“). Tento ohnutý flatapol vedie a zároveň zaostruje ióny pomocou axiálneho jednosmerného poľa a zaoštrovacieho RF poľa, čo má za následok zvýšenie citlivosti. Na ľavom konci môžeme vidieť HCD kolíziu celu pre MS2 – PRM scan modus[36].

Pre vlastný screening sme použili kolónu Phenyl Hexyl Kinetex® o rozmeroch 100 x 2,1 mm, 1,7 μm , od firmy Phenomenex (USA), ktorá je zviazaná s platformou ToxFinder. Tento software poskytuje vysoko presný screening a semikvantitatívnu

analýzu z údajov trojitého kvadrupólu alebo hmotnostného spektrometra s presnými hmotnosťami hmotnostného spektra[37].

V rámci nášho experimentu, boli už v minulosti vykonané štúdie, ktoré vložili niektoré JWH a HU deriváty. K existujúcemu JWH-018 sme pridali náš metabolit JWH-018 N-(4-hydroxypentyl), ktorý bol momentálne dostupný u firmy Ceriliant. Toxikologické laboratórium je menované vyhláškou 243/2009 ako laboratórium, ktoré k nákupu takýchto látok nepotrebuje udelenie povolenia. Preto sme očakávali dodanie objednaných látok z Veľkej Británie v relatívne krátkej dobe, avšak nakoniec sa doba doručenia natiahla až na niekoľko mesiacov a k tomu dodávka neprišla kompletná. Mali sme k dispozícii metabolit JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) a štandard MIX, ktorý pozostával z JWH-250, JWH-200, HU-211, CP 47,497 a homológu CP 47,497 C8.

Ako modelovú látku pre náš experiment sme zvolili JWH-018 N-(4-hydroxypentyl). Zároveň sme vyvinuli niekoľko metód, ktoré zahŕňali Full scan metódu pre screening na kolóne Phenyl Hexyl Kinetex®, Full scan kvantitatívne metódy pre kolóny Luna Omega® Polar C18 a Arion® Polar C18 UHPLC a vysoko špecifické PRM metódy, ktoré umožňujú konfigurácie použitého zariadenia. Porovnali sme vplyv modifikácie extrakčného činidla podľa pH, išlo o 0,1 M octan sodný ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) s pH 5,25 a 0,5 M NaOH, pH 9,1 – 9,2.

Výsledky pre kolónu Luna® Omega Polar C18 – analyt JWH-018 N-(4-hydroxypentyl):

- a) Extrakčné činidlo 0,5M NaOH: LOD = 0,0015 ng/mL, LOQ = 0,0044 ng/mL, $R^2 = 0,986$.
- b) Extrakčné činidlo 0,1M octan sodný: LOD = 0,0021 ng/mL, LOQ = 0,0063 ng/mL, $R^2 = 0,9903$.
- c) PRM mód:
 1. Extrakčné činidlo 0,1M octan sodný:
 - a) Koncentrácia 0,2 – 30,79 ng/mL: LOD = 0,003 ng/mL, LOQ = 0,0010 ng/mL, $R^2 = 0,9866$,
 - b) Koncentrácia 0,2 – 5,74 ng/mL: LOD = 0,0094 ng/mL, LOQ = 0,0011 ng/mL, $R^2 = 0,9979$,

c) Pomer Ar/ArIS, koncentrácia 0,2 – 90,79 ng/mL: LOD = 0,0257 ng/mL, LOQ = 0,0780 ng/mL, $R^2 = 0,9866$.

d) Pomer Ar/ArIS, koncentrácia 0,2 – 5,74 ng/mL: LOD = 0,0232 ng/mL, LOQ = 0,0702 ng/mL, $R^2 = 0,9979$.

2. Kalibračný roztok K1 v PRM skene:

a) JWH-018 N-hydroxypentyl D5 – Rt = 9,92.

b) JWH-018 N-hydroxypentyl – Rt = 9,95.

Výsledky pre kolónu Arion® Polar C18 UHPLC – analyt JWH-018 N-(4-hydroxypentyl):

a) Extrakčné činidlo 0,5M NaOH: LOD = 0,012 ng/mL, LOQ = 0,0036 ng/mL, $R^2 = 0,9848$

b) Extrakčné činidlo 0,1M octan sodný: LOD = 0,0025 ng/mL, LOQ = 0,0075 ng/mL, $R^2 = 0,9836$

c) PRM mód:

1. Extrakčné činidlo 0,1M octan sodný:

a) Koncentrácia 0,2 – 30,79 ng/mL: LOD = 0,0072 ng/mL, LOQ = 0,0075 ng/mL, $R^2 = 0,9836$.

b) Koncentrácia 0,2 – 5,74 ng/mL: LOD = 0,0079 ng/mL, LOQ = 0,0242 ng/mL, $R^2 = 0,9921$.

c) Pomer Ar/ArIS, koncentrácia 0,2 – 30,79 ng/mL: LOD = 0,0128 ng/mL, LOQ = 0,0386 ng/mL, $R^2 = 0,9867$.

d) Pomer Ar/ArIS, koncentrácia 0,2 – 5,74 ng/mL: LOD = 0,0015 ng/mL, LOQ = 0,0347 ng/mL, $R^2 = 0,9921$.

2. K1 kalibračný roztok v PRM skene:

a) JWH-018 N-hydroxypentyl D5 – Rt = 10,68.

b) JWH-018 N-hydroxypentyl – Rt = 10,72.

Na základe vyššie popísaných výsledkov môžeme skonštatovať, že extrakčné činidlo 0,1M octan sodný vykazuje lepšiu kalibračnú závislosť. 0,5 M NaOH má lepšie výsledné hodnoty pre LOD a LOQ, preto by sa dalo povedať, že je vhodnejší pre meranie. Hodnoty R^2 nám ukázali výbornú linearitu. Retenčné časy, pre kalibračné roztoky K1, boli kratšie pri kolóne Luna ako pri kolóne Arion, s presnou hmotnosťou na cca 2 ppm. S ohľadom na rozsah koncentrácií analytu v reálnych vzorkách sér pacientov (podozrivých – vo forenznej analýze) možno považovať za optimálne[38].

Výsledky však neboli ideálne pre analyty CP 47,497 a CP 47-497 C8 homológu (chromatogram je uvedený vyššie vo výsledkoch). Ako si môžeme všimnúť pri C8 homológu sú menšie plochy a trochu rýchlejšia elúcia. Tento homológ by mal byť pomalší, ale nie je. Čo môže byť spôsobené dlhším zadržiavaním analytu v kolóne. Rade CP, ktorá však je skenovaná v negatívnom móde, bude musieť byť venovaná ďalšia nadväzujúca práca. Riešením by mohlo byť vykonať meranie v PMR móde, avšak bude k tomu potrebné mať certifikované štandardy.

V porovnaní s inou štúdiou z roku 2018, ktorej autormi sú Dale Pon a I. J. Fenyvesi sa podarilo vyvinúť podstatne kratšie metódy, bez toho aby sa zmenila kvalita chromatografickej separácie[39].

Doba analytickej akvizície je v klinickej praxi urgentnej medicíny kľúčová a zásadná, pretože väčšina analýz je realizovaná v režime STATIM, resp. bez oneskorenia. Smernice v nemocnici určujú dobu odozvy laboratória (tzv. TAT – „TurnAroundTime“) na 1 hodinu, čo je však pre tento typ analýz zatiaľ nesplniteľné, pokiaľ máme poskytnúť kompletný výsledok, ktorý obsahuje záchyt analytu s jeho kvantitatívnym vyhodnotením. V dnešnej dobe sa TAT týchto metód pohybuje okolo 1,5 hodiny.

V nadväzujúcich prácach by bolo dobré zamerať sa na ďalšie skrátenie doby analytickej akvizície tým, že by sa vyskúšali kratšie kolóny, ako 50 mm, s tým, že by sa ponechala veľkosť zrna 1,6 – 2,2 a vnútorný priemer 2,1 mm. Takýto typ kolón je dostupný na trhu s chromatografickými kolónami UHPLC.

10. ZÁVER

Syntetické kannabinoidy patria medzi tzv. legálne náhrady marihuany. Cieľom diplomovej práce bolo optimalizovať podmienky screeningu, konkrétne pre JWH, ktoré patria medzi najzastúpenejšiu skupinu syntetických kannabinooidov. V dnešnej dobe sú však tieto látky v českej aj slovenskej legislatíve ilegálne.

V experimentálnej časti sme sa zamerali na analýzu JWH-018 N-(4-hydroxypentyl). Meranie prebiehalo pomocou metódy UHPLC/HRMS. Pomocou kolóny Phenyl Hexyl Kinetex® sme vykonali vlastný screening. Na kolónach Luna Omega® Polar C18 a Arion® Polar C18 UHPLC prebiehali kvantitatívne merania, ktoré sme ešte doplnili o PRM metódy a porovnali sme extrakčné činidlá, ktoré predstavovali 0,5M NaOH a 0,1M octan sodný. Merania boli vykonané v tripletoch, okrem PRM metódy, kde boli analyty zmerané duplicitne, objem sa musel zdvihnúť 3x.

Na základe výsledných hodnôt sme zostrojili kalibračné krivky a vypočítali hodnoty LOD, LOQ a R^2 . Porovnanie extrakčných činidiel preukázalo, že síce 0,1M octan sodný vykazuje lepšie kalibračné profily, naopak práve 0,5M NaOH má prijateľnejšie hodnoty pre LOD a LOQ, a z toho môžeme vyvodiť záver, že je zrovna toto extrakčné činidlo vhodnejšie pre analýzu. Kalibračné krivky nám ukázali podľa hodnôt R^2 výbornú linearitu.

Pri CP 47,479 a homológu CP 47,497 C8, ktorých merania sa vykonávajú v negatívnom móde, nám neposkytli dobré výsledky, preto navrhujeme ďalej sa zaoberať touto problematikou a previesť merania napr. pomocou PRM metódy.

Celkovo sa nám podarilo optimalizovať screeningovú stratégiu pre záchyt týchto nových drog zo skupiny syntetických kannabinooidov. Doplnili sme chýbajúci metabolit JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) a poskytli sme precíznu kvantitu v PRM metóde. Navrhnuté metódy vyhovujú klinickej aj forenznnej potrebe.

11. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Retenčné časy jednotlivých syntetických kannabinoidov (upravené)[7]	34
Tabuľka 2: Hmotnostné spektrometrické údaje a parametre vybraných syntetických kannabinoidov (upravené) [7].....	36
Tabuľka 3: Hodnoty výstupných kalibračných roztokov JHW-018.....	41
Tabuľka 4: Výsledné hodnoty kalibračných roztokov vo vzorke	41
Tabuľka 5: Výsledné koncentrácie vo vzorke QC	41
Tabuľka 6: Príprava IS – JWH-018-IS	42
Tabuľka 7: Príprava JWH-018 LLE s IS.....	42
Tabuľka 8: Podmienky pre prietok a gradient na 1.kolóne screening	43
Tabuľka 9: Podmienky pre prietok a gradient na 1.kolóne.....	44
Tabuľka 10: Podmienky pre prietok a gradient na 2. kolóne.....	45
Tabuľka 11: Podmienky pre prietok a gradient na 3. kolóne.....	46
Tabuľka 12: Podmienky pre prietok a gradient na 2. kolóne v PRM skene	47
Tabuľka 13: Výsledné hodnoty LOD, LOQ a R ² JWH-018 4-hydroxypentyl	57
Tabuľka 14: Výsledné hodnoty LOD, LOQ, R ² v PRM skene na kolóne Arion Polar C18 UHPLC..	58
Tabuľka 15: Výsledné hodnoty LOD, LOQ, R ² v PRM skene na kolóne Luna Omega Polar C18..	58
Tabuľka 16: Molekulové a kvantitatívne hodnoty m/z analytov	65

12. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Typy žľaznatých trichómov na samičom kvete konope[6]	12
Obrázok 2: Klasické kannabinoidy(upravené)[7]	13
Obrázok 3: Neklasické kannabinoidy (upravené)[7]	14
Obrázok 4: Aminoalkylindoly – naphtoylindoly (upravené) [7]	15
Obrázok 5: Aminoalkylindoly – naphtoylindoly pokračovanie (upravené)[7]	16
Obrázok 6: Aminoalkylindoly – phenylacetylindoly(upravené)[7].....	17
Obrázok 7: Aminoalkylindoly – benzoylindoly(upravené)[7].....	18
Obrázok 8: Aminoalkylindoly – cyklopropoylindoly (upravené)[7].....	19
Obrázok 9: Aminoalkylindoly – adamantoylindoly (upravené)[7]	19
Obrázok 10: Aminoalkylindoly – karboxyamid indoly (upravené)[7].....	20
Obrázok 11: Aminoalkylindoly – eicosanoidy (upravené)[7]	20
Obrázok 12: Endokannabinoidný systém[16]	23
Obrázok 13: Schéma hmotnostného spektrometra[20]	24
Obrázok 14: Príklad hmotnostného spektra. Na ose x je znázornený podiel hmotnosti a náboja (m/z) a na ose y relatívne zastúpenie[21].....	25
Obrázok 15: Schéma hmotnostného analyzátoru Orbitrap™ (upravené) [24]	26
Obrázok 16: Schéma LC-MS/MS s použitím hmotnostného analyzátoru Orbitrap™(upravené)[25]	31
Obrázok 17: Vzorec JWH-018, 4-hydroxypentyl[28].....	37
Obrázok 18: Vzorec JWH-018, 4-hydroxypentyl, D5 (indole-D5)[29]	37
Obrázok 19: Vzorec JWH-018, 5-pentanioc kyselina beta D-glukoronidová[30].....	38
Obrázok 20: Vzorec JWH-018 (C ₂₄ H ₂₃ NO, molekulová hmotnosť 341,45 g/mol)[32]	39
Obrázok 21: K1 kalibračný roztok v PRM skene.....	52
Obrázok 22: K1 kalibračný roztok v PRM skene.....	56
Obrázok 23: Záchyt 5 ng/mL HU-211, JWH-250 a JWH-200 v kontrole QCD.....	59
Obrázok 24: Záchyt CP 47,497 s homológom CP 47,497 C8	60
Obrázok 25: Blank s IS na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC, Full MS – 1. nástrek.....	61
Obrázok 26: Blank s IS na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC, Full MS scan – 2. nástrek	61
Obrázok 27: Blank s IS na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18, Full MS scan – 1. nástrek.....	62
Obrázok 28: Blank s IS na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18, Full MS scan – 2. nástrek.....	62
Obrázok 29: Blank s IS v PRM na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18, Full MS scan – 1. nástrek	63
Obrázok 30: Blank s IS v PRM na kolóne LUNA OMEGA POLAR C18, Full MS scan – 2. nástrek	63
Obrázok 31: Blank s IS v PRM na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC, Full MS scan – 1. nástrek	64
Obrázok 32: Blank s IS v PRM na kolóne ARION POLAR C18 UHPLC, Full MS scan – 2. nástrek	64
Obrázok 33: EI hmotnostné spektrum metabolitu JWH-018 5-hydroxypentyl, TMS derivát[35]	65
Obrázok 34: Technická schéma Q-Exacte platformy[36]	66

13. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,5M NaOH ..	49
Graf 2: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný	49
Graf 3: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL	50
Graf 4: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL	50
Graf 5: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL ratio Ar/ArIS	51
Graf 6: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL ratio Ar/ArIS	51
Graf 7: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,5M NaOH ..	53
Graf 8: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný	53
Graf 9: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, metódou PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL	54
Graf 10: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, metódou PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL	54
Graf 11: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M octan sodný, PRM, v rozsahu 0,2 – 30,79 ng/mL ratio Ar/ArIS	55
Graf 12: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) s extrakčným činidlom 0,1M Octan sodný, v PRM, v rozsahu 0,2 – 5,74 ng/mL ratio Ar/ArIS	55
Graf 13: Kalibračná krivka JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) v rozsahu 0 – 4 ng/mL	57

14. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] AMBROZIAK, Katarzyna a Piotr ADAMOWICZ. Simple screening procedure for 72 synthetic cannabinoids in whole blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*. 2018, **36**(2), 280-290. ISSN 1860-8965. Dostupné z: doi:10.1007/s11419-017-0401-x
- [2] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol: EU Drug Markets Report [online]. Luxembourg, 2019 [cit. 2021-02-15]. Dostupné z: doi:10.2810/796253
- [3] European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction: New release from the EU drugs agency in Lisbon - Two new synthetic cannabinoids to be placed under control across the EU [online]. Lisbon, 2018 [cit. 2021-02-15]. Dostupné z: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/attachments/8602/News_release_EN_twodrugs_Finalweb_Final.pdf
- [4] COTTENCIN, Olivier, Benjamin ROLLAND a Laurent KARILA. New Designer Drugs (Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones): Review of Literature. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2014, **20**(25), 4106-4111 [cit. 2021-02-15]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/13816128113199990622
- [5] BONINI, Sara Anna, Marika PREMOLI, Simone TAMBARO, Amit KUMAR, Giuseppina MACCARINELLI, Maurizio MEMO a Andrea MASTINU. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2018, **227**(25), 300-315 [cit. 2021-02-15]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2018.09.004
- [6] LIVINGSTON, Samuel J., Teagen D. QUILICHINI, Judith K. BOOTH, et al. Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *The Plant Journal* [online]. 2019, **101**(1), 37-56 [cit. 2021-02-15]. ISSN 0960-7412. Dostupné z: doi:10.1111/tpj.14516
- [7] UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME: Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials [online]. New York, 2013 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: https://www.unodc.org/documents/scientific/STNAR48_Synthetic_Cannabinoids_ENG.pdf

- [8] DIAO, Xingxing a Marilyn A. HUESTIS. New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites: Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials. *Frontiers in Chemistry* [online]. New York, 2019, 7 [cit. 2021-02-16]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00109
- [9] WEISSMAN, A., GM MILNE a LS MELVIN JR. Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol [online]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982, Nov, , 223(2):516-23 [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6290642/>
- [10] JOHNSON, M. R., L. S. MELVIN, T. H. ALTHUIS, J. S. BINDRA, C. A. HARBERT, G. M. MILNE a A. WEISSMAN. Selective and Potent Analgetics Derived from Cannabinoids. *The Journal of Clinical Pharmacology* [online]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981, 1982, Nov, **21**(S1), 271S-282S [cit. 2021-5-7]. ISSN 00912700. Dostupné z: doi:10.1002/j.1552-4604.1981.tb02605.x
- [11] WILEY, J. L., T. H. ALTHUIS, D. R. COMPTON, D. DAI, J. A. LAINTON, M. PHILLIPS a B. R. MARTIN. Structure-Activity Relationships of Indole- and Pyrrole-Derived Cannabinoids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 1998, Jun, **285**(3) [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9618400/>
- [12] D. R. COMPTON, D. DAI, K. C. RICE, B. R. DE COSTA, R. K. RAZDAN a B. R. MARTIN. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, Apr, **265**(1) [cit. 2021-5-7]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8474008/>
- [13] MILLS, Brooke, Andres YEPES a Kenneth NUGENT. Synthetic Cannabinoids: Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials. *The American Journal of the Medical Sciences* [online]. New York, 2015, **350**(1), 59-62 [cit. 2021-02-16]. ISSN 00029629. Dostupné z: doi:10.1097/MAJ.0000000000000466
- [14] HANUŠ, Lumír Ondřej. REVUE České Lékařské Akademie: Endogenní kannabinoidy, receptory, fyziologické role [online]. *Izrael*, 2012, **8** [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <http://konopijelek.blogspot.com/2013/04/endogenni-kanabinoidy-receptory.html>
- [15] GURNEY, S. M. R., K. S. SCOTT, S. L. KACINKO, B. C. PRESLEY a B. K. LOGAN. Forensic Science Review: Pharmacology, Toxicology, and Adverse Effects of

- Synthetic Cannabinoid Drugs [online]. 2014, **26**(1) [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: https://www.chm.uri.edu/forensics/Gurney_PharmToxAdverseEffectsSynCannDrugs_ForScReview_2014.pdf
- [16] HERBFORCE: Úvod do sveta kanabinoidov [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://herbforce.sk/svet-kanabinoidov-31>
- [17] NEČAS, Marián. Kanabinoidy - charakteristika, rozdelenie, mechanizmus účinku [online]. 2011, **4**(2), 57-60 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://www.solen.sk/storage/file/article/545f1e0f0fe81f347f02ffc834aadd77.pdf>
- [18] ONDRA, P. Ústav soudního lékařství a medicínského práva LF UP a FN Olomouc: "Designer drugs" fikce nebo realita [online]. Olomouc, 2017 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://at-konference.cz/wp-content/uploads/2017/06/ondra-p.-designer-drugs--fikce-nebo-realita.pdf>
- [19] Mass Spectrometry. PREMIER Biosoft [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html?fbclid=IwAR3BGwluemZu1lmKB3T3nH-IEcn8G_tPcBdkm8VtKYr3bFf4PbiM3DshOb4
- [20] BRÁNECKÝ, Martin. Tenké vrstvy připravené v RF doutnavém výboji a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti [online]. Brno, 2015 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=101254. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [21] What is Mass Spectrometry? BROAD INSTITUTE [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: https://www.broadinstitute.org/proteomics/what-mass-spectrometry?fbclid=IwAR2NNmh-WWhxbG8chq2Nj6zQC9g5XF4C6HKvzMGgsOS1DvkMtYRMep_u96A
- [22] Thermo Fisher SCIENTIFIC: Orbitrap quantitation: lab of the future [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <http://solo.dsii.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/cmd-documents/sci-res/app/ms/lc-ms/Orbitraps/AI-64645-LC-MS-Orbitrap-Quantitation-AI64645-EN.pdf>
- [23] ZUBAREV, Roman A. a Alexander MAKAROV. Orbitrap Mass Spectrometry. Analytical Chemistry [online]. 2013, **85**(11), 5288-5296 [cit. 2021-02-16]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac4001223
- [24] SAVARYN, John P., Timothy K. TOBY a Neil L. KELLEHER. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. PROTEOMICS [online]. 2016, **16**(18), 2435-2443 [cit. 2021-02-16]. ISSN 16159853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201600113

- [25] WAGENINGEN University and Research: Q ExactivePlus Orbitrap LC-MS/MS [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://www.wur.nl/en/product/Q-ExactivePlus-Orbitrap-LC-MSMS.htm>
- [26] DONG, M. W. HPLC and UHPLC for practicing scientists. Second edition. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2019. ISBN 978-111-9313-762.
- [27] DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. Mass spectrometry: principles and applications. Third edition. Chichester: John Wiley, [2007]. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [28] JWH-018 4-Hydroxypentyl metabolite solution. SigmaAldrich [online]. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ce111ian/s035?lang=en&ion=SK&cm_sp=Insite-_-caContent_prodMerch_gruCrossEntropy-_-prodMerch10-6
- [29] JWH-018 4-Hydroxypentyl metabolite-D5 (indole-D5) solution. SigmaAldrich [online]. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ce111ian/s039?lang=en&ion=SK&cm_sp=Insite-_-rvRecBlock_recentlyViewed_userHistory-_-recentlyViewed5-3
- [30] JWH-018 5-Pentanoic acid beta-D-glucuronide solution. SigmaAldrich [online]. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ce111ian/s106?lang=en&ion=SK>
- [31] Spice Cannabinoid Mix solution. SigmaAldrich [online]. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ce111ian/s038?lang=en&ion=SK&cm_sp=Insite-_-rvRecBlock_recentlyViewed_userHistory-_-recentlyViewed5-4
- [32] World Health Organisation: JWH-018 Critical review report, Expert Committee on Drug Dependence [online]. Geneva, 2014 [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/4_5_review.pdf
- [33] RAUNIYAR, Navin. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. International Journal of Molecular Sciences [online]. 2015, **16**(12), 28566-28581 [cit. 2021-5-10]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms161226120
- [34] ARMBRUSTER, D. A. a T. PRY. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. The Clinical Biochemist Reviews [online]. 2008, **29**(Supple 1), S49 - S52 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556583/>

- [35] EMERSON, Beth, Bill DURHAM, Jennifer GIDDEN a Jackson O. LAY. Gas chromatography–mass spectrometry of JWH-018 metabolites in urine samples with direct comparison to analytical standards. *Forensic Science International* [online]. 2013, **229**(1-3), 1-6 [cit. 2021-5-12]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2013.03.006
- [36] Thermo Scientific Q Exactive UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Go beyond what you thought possible with native MS [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/br-65167-q-exactive-uhmr-hybrid-quadrupole-orbitrap-ms-br65167-en.pdf>
- [37] ToxFinder™ Software. ThermoFisher SCIENTIFIC [online]. [cit. 2021-5-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGABSFAPWMBHF#IQLAAEGABSFAPWMBHF>
- [38] CARLIER, Jeremy, Xingxing DIAO, Raffaele GIORGETTI, Francesco P. BUSARDÒ a Marilyn A. HUESTIS. Pyrrolidinyl Synthetic Cathinones α -PHP and 4F- α -PVP Metabolite Profiling Using Human Hepatocyte Incubations. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(1) [cit. 2021-5-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22010230
- [39] PON, Dale, Ildiko J. FENYVESI, Raffaele GIORGETTI, Francesco P. BUSARDÒ a Marilyn A. HUESTIS. A Validated Method for the Detection and Quantitation of Synthetic Cannabinoids in Whole Blood and Urine, and its Application to Postmortem Cases in Johannesburg, South Africa. *South African Journal of Chemistry* [online]. 2018, **71**(1), 24-29 [cit. 2021-5-13]. ISSN 03794350. Dostupné z: doi:10.17159/0379-4350/2018/v71a3