UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025 Bc. Sandra Hladíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza vybraných kanabinoidů

Diplomová práce

2025 Bc. Sandra Hladíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Sandra Hladíková**
Osobní číslo:	**C23227**
Studijní program:	**N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce:	**Analýza vybraných kanabinoidů**
Téma práce anglicky:	**Analysis of Selected Cannabinoids**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na kanabinoidy a možnosti jejich stanovení v biologických vzorcích.

2. V experimentální části navrhněte a ověřte GC-MS metodu pro stanovení vybraných kanabinoidů. Validovanou metodu následně aplikujte na reálné vzorky.

3. Dosažené výsledky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Petra Boguschová**
Nemocnice Pardubického kraje, a.s., Pardubická nemocnice, Toxikologická laboratoř pro Oddělení soudního lékařství a Oddělení klinické biochemie a diagnostiky

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem *Analýza vybraných kanabinoidů* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.5.2025

Bc. Sandra Hladíková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. Ing. Petře Bajerové, Ph.D., Mgr. Petře Boguschové za jejich odborné vedení, ochotu, pomoc a cenné rady při vypracování této práce. Děkuji Oddělení soudního lékařství a Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubického kraje, a. s. za poskytnutí materiálu a přístrojů k analýzám. Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině, přátelům a především svému partnerovi Petrovi za nepřetržitou podporu a trpělivost během tohoto náročného studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá kanabinoidy, jejich chemickou strukturou, mechanismy účinku a terapeutickým potenciálem. Cílem práce je poskytnout ucelený přehled o endokanabinoidním systému, přírodních i syntetických kanabinoidech, jejich interakcích s organismem a možném využití v medicíně. Práce se rovněž věnuje jejich analýze, kdy byla použita extrakce tuhou fází k uvolnění analytu (hexahydrokanabinol, kanabidiol, tetrahydrokanabinol a jeho metabolity) z matrice a před samotnou analýzou GC-MS byla provedena derivatizace. Ke zjištění koncentrace byly použity deuterované vnitřní standardy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hexahydrokanabinol, kanabidiol, tetrahydrokanabinol, GC-MS

TITLE

Analysis of selected cannabinoids

ANNOTATION

This thesis focuses on cannabinoids, their chemical structure, mechanisms of action, and therapeutic potential. The main goal is to provide a comprehensive overview of the endocannabinoid system, natural and synthetic cannabinoids, their interaction with the human body, and potential medical applications. The work also deals with their analysis, where solid phase extraction was used to release the analyte (hexahydrocannabinol, cannabidiol, tetrahydrocannabinol and its metabolites) from the matrix and derivatization was performed before GC-MS analysis. Deuterated internal standards were used to determine the concentration.

KEYWORDS

Hexahydrocannabinol, cannabidiol, tetrahydrocannabinol, GC-MS

Obsah:

Seznam obrázků a tabulek: 11

Seznam zkratek: 12

Úvod 15

1. Teoretická část 16

1.1. Úvod do problematiky kanabinoidů 16

1.1.1. Historický vývoj a klasifikace 16

1.1.2. Význam analýzy kanabinoidů 18

1.2. Přírodní kanabinoidy 18

1.2.1. Účinky a metabolismus THC 19

1.2.2. Terapeutické a biologické vlastnosti CBD, CBG, CBN a CBC 21

1.3. Syntetické kanabinoidy 22

1.3.1. Historický vývoj a klasifikace 22

1.3.2. Hexahydrokanabinol 23

1.3.3. Další syntetické kanabinoidy 24

1.3.4. Rizika spojená se syntetickými kanabinoidy 26

1.4. Kanabinoidní receptory a mechanismy účinku 27

1.4.1. Endokanabinoidy 27

1.4.2. CB1 receptory 29

1.4.3. CB2 receptory 30

1.5. Analytické metody pro stanovení kanabinoidů 30

1.5.1. Odběr vzorku 30

1.5.2. Preanalytická část 30

1.5.2.1. Extrakce kapalina–kapalina 31

1.5.2.2. Extrakce tuhou fází 31

1.5.3. Chromatografie a hmotnostní spektrometrie 32

1.5.3.1. Kapalinová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie 32

1.5.3.2. Plynová chromatografie 33

1.5.3.3. Hmotnostní spektrometrie 33
1.5.4. Metody stanovení 36
1.6. Legislativa a limity 45
1.6.1. Mezinárodní regulace THC a SK 45
1.6.2. Specifika české legislativy 45
1.7. Kvantitativní validace 46
2. Experimentální část 47
2.1. Použité chemikálie 47
2.1.1. Příprava pracovních roztoků 47
2.2. Přístrojové vybavení 49
2.2.1. Zařízení pro extrakci 49
2.2.2. Plynový chromatograf 49
2.3. Identifikace analytu 50
2.4. Optimalizace metody 50
2.5. Úprava vzorku a derivatizace 51
2.6. Ověření funkčnosti metody 51
2.7. Kalibrační řada 52
2.8. Selektivita 52
2.9. Specificita 53
2.10. Opakovatelnost 53
2.11. Mezilehlá preciznost 53
2.12. Linearita 54
2.13. Reálný vzorek 54
3. Výsledky a diskuze 55
3.1. Identifikace analytu 55
3.2. Optimalizace metody 55
3.3. Ověření funkčnosti metody 56

3.4. Kalibrační řada a linearita 56
3.5. Selektivita a specificita 58
3.6. Limity detekce a kvantifikace 58
3.7. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost 59
3.8. Reálný vzorek 60
4. Závěr 61
Použitá literatura: 62

Seznam obrázků a tabulek:

Obrázek 1 Strukturní vzorec CBN 17
Obrázek 2 Strukturní vzorec CBD 17
Obrázek 3 Strukturní vzorec THC 17
Obrázek 4 Strukturní vzorec CBG 18
Obrázek 5 Strukturní vzorec CBC 18
Obrázek 6 Rozlišení samčí a samičí rostliny konopí 19
Obrázek 7 Schéma I. fáze biotransformace THC 20
Obrázek 8 Strukturní vzorec izomeru 9R-HHC 23
Obrázek 9 Část metabolismu HHC 24
Obrázek 10 Strukturní vzorec HU-210 25
Obrázek 11 Strukturní vzorec JWH-018 26
Obrázek 12 Strukturní vzorec AB-FUBINACA 26
Obrázek 13 Strukturní vzorec anandamidu 27
Obrázek 14 Strukturní vzorec homo-γ-linolenoylethanolamidu 28
Obrázek 15 Strukturní vzorec 7,10,13,16-docosatetraenoylethanolamidu 28
Obrázek 16 Strukturní vzorec 2-arachidonoyl glycerolu 28
Obrázek 17 Strukturní vzorec noladin éteru 29
Obrázek 18 Strukturní vzorec virodhamidu 29
Obrázek 19 Možnosti použití ionizačních technik podle povahy analytu 34
Obrázek 20 Schéma EI 35
Obrázek 21 Identifikace standardů kanabinoidů 55
Obrázek 22 Identifikace vnitřních standardů kanabinoidů 55
Obrázek 23 Grafy kalibračních řad analytů 57
Obrázek 24 Grafy pro výpočet LOD 59
Tabulka 1 Shrnutí metod stanovení kanabinoidů 43
Tabulka 2 Složení lokálních kontrol 51
Tabulka 3 Kalibrační řada 52
Tabulka 4 Koncentrace standardů pro opakovatelnost a mezilehlou preciznost 53
Tabulka 5 Koncentrace vzorků pro měření linearity 54
Tabulka 6 Kolizní energie pro vybrané ionty analytů 56
Tabulka 7 Vypočtené hodnoty chyby stanovení kalibrační řady 57
Tabulka 8 Vypočtené hodnoty pro opakovatelnost, mezilehlou preciznost 60

Seznam zkratek:

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APINACA	*N*-(1-adamantyl)-1-pentylindazol-3-carboxamid
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BSTFA	*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CB1	kanabinoidní receptor 1
CB2	kanabinoidní receptor 2
CBC	kanabichromen
CBD	kanabidiol
CBG	kanabigerol
CBN	kanabinol
CNS	centrální nervový systém
CYP 450	cytochrom P 450
EI	elektronová ionizace
ELISA	enzymový imunosorbentní test (z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
ESI	elektrosprejová ionizace
FUBIMINA	(1-(5-fluoropentyl-)*1H*-benzo[d]imidazol-2-yl)
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií
HHC	hexahydrokanabinol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HU	Hebrejská Univerzita

JWH	John William Huffman
LC	kapalinová chromatografie
LC-HRMS	kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením
LC-MS	kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce kapalina–kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MS	hmotnostní spektrometrie
MSTFA	*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NP-SPE	extrakce tuhou fází založena na principu normální fáze
OH-THC	11-hydroxy-tetrahydrokanabinol
PCF	polychlorfenylester
PP	proteinová precipitace
Q	kvadrupólový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupól
QuEChERS	disperzní extrakce tuhou fází (z angl. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugger, Safe)
RP-SPE	extrakce tuhou fází založená na principu reverzní fáze
SK	syntetické kanabinoidy
SPE	extrakce tuhou fází
SPE-IEX	iontově výměnná extrakce tuhou fází
TEA	triethylamid

THC	tetrahydrokanabinol
THC-COOH	11-nor-delta-9-karboxytetrahydrokanabinolová kyselina
TOF	analyzátor doby letu

Úvod

Kanabinoidy jsou biologicky aktivní sloučeniny nacházející se v rostlinách rodu *Cannabis*, které v posledních letech vzbuzují rostoucí vědecký i veřejný zájem. Jejich farmakologické vlastnosti, zejména účinky na lidský endokanabinoidní systém, vedou k široké škále aplikací, od léčebného využití po rekreační užívání. Nejznámějšími zástupci této skupiny látek jsou tetrahydrokanabinol, který je primárně zodpovědný za psychoaktivní účinky konopí, a kanabidiol, jenž se vyznačuje terapeutickými vlastnostmi bez výrazného ovlivnění vědomí.

S rostoucím využitím kanabinoidů v medicíně, farmacii i potravinářství se zvyšuje potřeba přesných a spolehlivých metod jejich stanovení. Analýza kanabinoidů zahrnuje různé techniky, včetně kapalinové chromatografie, plynové chromatografie či hmotnostní spektrometrie, které umožňují nejen kvantifikaci jednotlivých složek, ale i identifikaci nečistot a vedlejších produktů.

Tato práce se zaměřuje na přehled metod stanovení kanabinoidů, jejich výhody i limity a poskytuje rovněž ucelený pohled na současný stav výzkumu v této oblasti.

1. Teoretická část

1.1. Úvod do problematiky kanabinoidů

Kanabinoidy představují obsáhlou skupinu chemických látek, které se přirozeně vyskytují v rostlinách čeledi *Cannabaceae* původem z Číny, ale mohou být syntetizovány i uměle. Tyto látky jsou známé především pro svou schopnost interagovat s endokanabinoidním systémem v lidském těle, který reguluje fyziologické procesy, jako je bolest, nálada, či chuť k jídlu. [1, 2, 3, 4, 5]

1.1.1. Historický vývoj a klasifikace

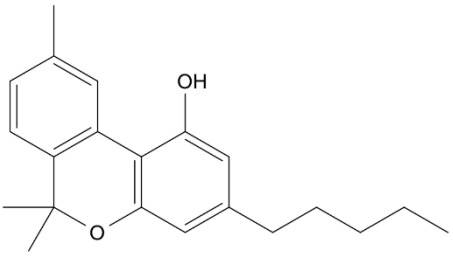
Kanabinoidy je možné rozdělit do tří hlavních skupin:

- fytokanabinoidy, které se přirozeně vyskytují v rostlinách konopí, např. tetrahydrokanabinol, kanabidiol a další, [6]
- syntetické kanabinoidů – ty tvoří člověk, za účelem napodobení účinků fytokanabinoidů, např. HU-210 či JWH-018, [3, 4, 5]
- endokanabinoidy, které jsou produkty lidského organismu, např. 2-arachinoylglycerol. [7]

Ve Spojených státech amerických bylo konopí hojně využíváno jako léčivo od roku 1850, ale v roce 1937 došlo k federálnímu omezení užívání konopí, ve stejném roce došlo i ke schválení zákona o dani z marihuany a kvůli tomu bylo v roce 1942 konopí vyřazeno z lékopisu Spojených států. Právní tresty za držení marihuany se však zvýšily až v letech 1951 a 1956. Spojené státy byly mezi prvními, kde se držení marihuany stalo trestné, ale v současné době se některé státy USA (např. Kalifornie) řadí mezi první země, které legalizovaly přístup k botanickému konopí za účelem využívání jeho léčebných účinků, jako je zmírnění symptomů roztroušené sklerózy. [8, 9]

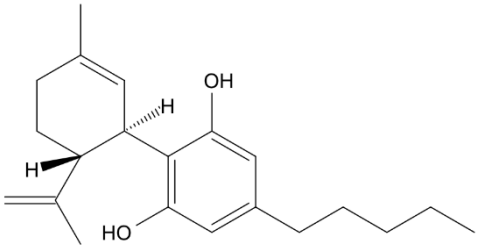
Izolace hlavních fytokanabinoidů (chronologicky):

Kanabinol (CBN), jehož strukturní vzorec je na obrázku 1, je pravděpodobně první fytokanabinoid, který byl izolován. Došlo k tomu na konci 19. století. Jeho struktura byla plně popsána až v roce 1940. Původně byl označován jako „červený olej“, kvůli své konzistenci a zbarvení. Vědci se zpočátku domnívali, že se jedná o hlavní psychoaktivní složku rostliny, jelikož se ho povedlo izolovat velké množství; to ale mohlo být způsobeno oxidací THC na CBN. [10, 11]



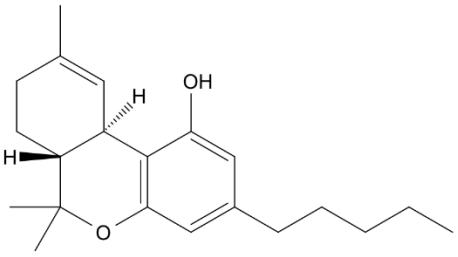
Obrázek 1 Strukturní vzorec CBN

Kanabidiol (CBD), jehož strukturní vzorec je na obrázku 2, byl poprvé izolován v roce 1940 z rostliny mexické marihuany (*Cannabis sativa L.*) týmem Rogera Adamse a z pryskyřice *Cannabis indica* A. Jacobem a A. R. Toddem, ale jeho struktura byla objasněna až roku 1963 po izolaci z libanonského hašiše. Nejprve vědci zastávali názor, že nemá žádné psychoaktivní nebo jiné účinky, ale tato domněnka byla mylná. V současné době se hojně využívá pro své terapeutické účinky v lékařství. [12]



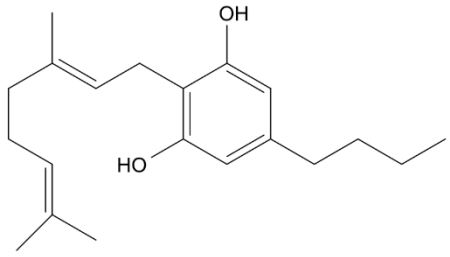
Obrázek 2 Strukturní vzorec CBD

Tetrahydrokanabinol (THC), jehož strukturní vzorec je na obrázku 3, byl poprvé izolován z rostliny *Cannabis sativa* v 60. letech minulého století (1964) Gaonimem a Mechoulamem, ale jeho struktura byla upřesněna až v roce 1967. V dalších letech byly objeveny i další kanabinoidní sloučeniny, jako je Δ^8-tetrahydrokanabinol, který je méně účinný. V současné době se jedná o zakázanou vysoce návykovou psychoaktivní látku. [10, 13]



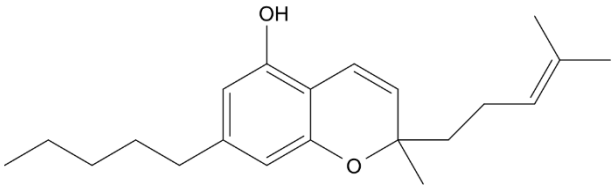
Obrázek 3 Strukturní vzorec THC

Kanabigerol (CBG), jehož strukturní vzorec je na obrázku 4, byl poprvé izolován v roce 1964 z hexanového extraktu hašiše. Jeho stechiometrie a struktura byly následně potvrzeny chemickou syntézou. V současnosti se CBG využívá pro své terapeutické účinky. [14]



Obrázek 4 Strukturní vzorec CBG

Kanabichromen (CBC), jehož strukturní vzorec je na obrázku 5, byl izolován kolektivem pod vedením Mechoulama v roce 1966. Tento výzkumný tým rovněž stanovil jeho označení. [15]



Obrázek 5 Strukturní vzorec CBC

1.1.2. Význam analýzy kanabinoidů

Analýza kanabinoidů má klíčový význam v medicíně a soudní toxikologii:

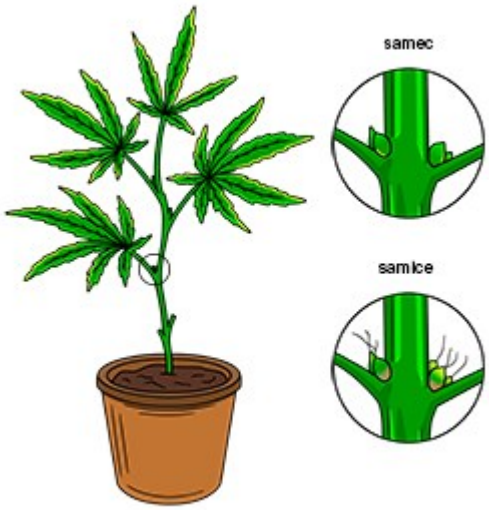
- Lékařství: Kanabinoidy se využívají při léčbě neurodegenerativních onemocnění (např. roztroušená skleróza, Parkinsonova choroba), epilepsie či při tlumení bolesti. [16, 17, 18]
- Forenzní toxikologie: Stanovuje se zde přítomnost kanabinoidů v biologických materiálech (např. v krvi a moči). Stanovení hraje zásadní roli při zjišťování zneužití drogy, či při zjišťování řízení dopravního prostředku pod vlivem omamné látky.

1.2. Přírodní kanabinoidy

Přírodní kanabinoidy jsou látky vyskytující se v teplomilné dvoudomé rostlině konopí seté (*Cannabis sativa*) čeledi *Cannabaceae* původem z Číny. Konopí poprvé popsal Carl Linne v roce 1737 a v současné době jsou popsány ještě další dva druhy, konopí indické (*Cannabis*

indica) a konopí rumištní (*Cannabis ruderalis*). Doposud bylo objeveno přibližně 66 druhů přírodních kanabinoidů, z nichž mezi nejrozšířenější patří THC, CBD, CBG, CBN a CBC. [1, 2, 6, 7, 19]

Pro nelegální využívání konopí jsou upřednostňovány samičí rostliny, kde je v takzvaných palicích (plody květů) vyšší koncentrace THC. Na obrázku 6 je možné vidět rozdíl mezi samčí a samičí rostlinou. [7]



Obrázek 6 Rozlišení samčí a samičí rostliny konopí [20]

Kanabinoidy jsou rozpustné v lipidech a jiných nepolárních rozpouštědlech. Většina kanabinoidů obsahuje 21 atomů uhlíku a aromatický cyklus. Psychoaktivní složka konopí reaguje s kanabinoidními receptory CB1 a CB2, které oba patří mezi receptory endokanabinoidního systému lidského těla. Tento systém má důležitou roli při regulaci různých fyziologických procesů, jako je chuť, bolest, nálada, zánětlivé procesy atd. Mezi kladné vlastnosti přírodních kanabinoidů patří zmírnění bolestí a křečí u pacientů s roztroušenou sklerózou, zmírnění depresí nebo i pozitivní účinek při nevolnosti a zvracení při chemoterapiích. Mezi negativní účinky patří zejména záchvaty paniky a úzkosti převážně u dětí a starších lidí, nebo při kombinování kanabinoidů s jinými návykovými látkami. [1, 17]

1.2.1. Účinky a metabolismus THC

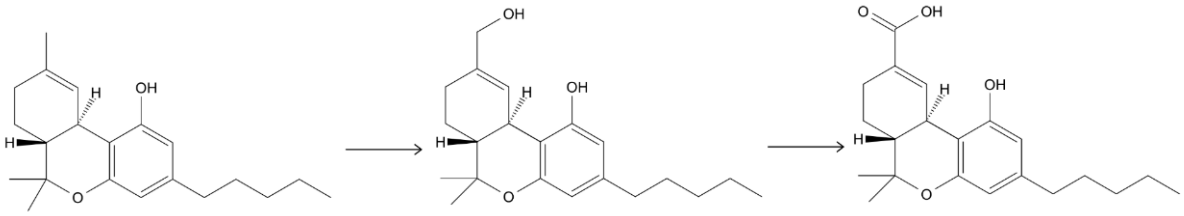
THC je jednou z hlavních složek přítomných v rostlině Cannabis sativa, má symptomatické a behaviorální účinky, vyvolává intoxikaci a je návykový.

Užívání THC zmírňuje svalové křeče a chronické bolesti. Doporučená denní dávka při tělesné hmotnosti 63,9 kg je 15 až 20 mg, což se dá svou účinností přirovnat k 60 až 120 mg kodeinu. Ovšem při překročení této doporučené dávky se mohou dostavit nežádoucí účinky, například úzkost, poruchy paměti, zvýšená chuť k jídlu či zhoršení kognitivních funkcí. [17, 18]

THC se při chronickém dávkování akumuluje v tucích a pozvolně se zpětně uvolňuje do krevního oběhu. [18]

Kouření je nejčastějším způsobem aplikování konopí, kdy dochází k rychlému přechodu psychoaktivní drogy z plic do krve a poté do mozku. Při perorálním podání, kdy je konopí přidáno jako ingredience např. do tzv. cookies, je absorpce pomalejší v závislosti na obsahu žaludku. [21, 22, 23]

Mezi hlavní metabolity THC patří OH-THC a THC-COOH. Mezi reakce I. fáze biotransformace THC (viz obrázek 7) patří: oxidace alkoholů na ketony, aldehydy a kyseliny, allylové a alkylové hydroxylace a degradace pentylového řetězce. Dominantní reakce II. fáze biotransformace je konjugace s kyselinou glukuronovou za vzniku syntetických metabolitů. Oxidací THC na uhlíku v 9. poloze enzymovým komplexem jaterního cytochromu CYP 450 vzniká metabolit OH-THC. Oxidací OH-THC vzniká THC-COOH. Z THC-COOH vznikají glukosiduronáty, které jsou již II. fází biotransformace, čímž dochází ke zvýšení polarity metabolitů a podpoře eliminace metabolitů THC z organismu. [24]



Obrázek 7 Schéma I. fáze biotransformace THC

Při jednorázové inhalační aplikaci je do pěti dnů vyloučeno z organismu 80–90 % dávky THC. Močí je vyloučeno přibližně 20 % THC a více než 65 % je vyloučeno stolicí v nepřeměněné podobě. [25]

1.2.2. Terapeutické a biologické vlastnosti CBD, CBG, CBN a CBC

Kanabidiol

CBD je hlavním fytokanabinoidem přítomným v rostlině Cannabis sativa. Jedná se o sekundární metabolit, který nevyvolává intoxikaci a není návykový. [12]

CBD je hydrofobní léčivo, které se vstřebává do krevního oběhu ve střevě. Dále je rychle vstřebáván i tukovou tkání a prochází hematoencefalickou bariérou do centrálního nervového systému (CNS). [16]

CBD má širokospektrální farmakologický účinek na několik problémů, jako je epilepsie, úzkost, bolest a zánět. Další uplatnění CBD je při léčbě různých neurodegenerativních onemocnění a neuropsychiatrických stavů. Mezi nežádoucí účinky CBD se řadí průjem a snížená chuť k jídlu. Doporučené denní dávkování se pohybuje v rozmezí 10 až 400 mg. [16, 26]

Metabolismus CBD je podobný metabolismu THC, kdy dochází primárně k oxidaci uhlíku v deváté poloze na alkohol a poté na karboxylovou kyselinu a stejně tomu tak je i u postranního řetězce. [27]

Kanabigerol

CBG je jedním z méně zastoupených fytokanabinoidů v rostlině Cannabis sativa (největší koncentrace CBG je v květech a listech květenství). CBG nepatří mezi psychoaktivní sloučeniny, ale přesto vykazuje řadu terapeutických účinků. Vzniká dekarboxylací kyseliny kanabigerolové, což je důležitý prekurzor biosyntézy dalších kanabinoidů (např. THC, CBD a CBC). [14]

CBG interaguje jak s receptorem CB1, tak s receptorem CB2. Má řadu farmakologických účinků včetně antibakteriálních, protiplísňových a protizánětlivých, což představuje potenciál v boji proti rezistentním bakteriálním patogenům. Dalším možným využitím CBG je léčba chronických zánětů střev (např. Crohnova choroba). [14]

Kanabinol

Jedná se o další fytokanabinoid, který je mírně psychoaktivní kanabinoid s nízkou afinitou na receptory CB1 a CB2. [11]

Mezi účinky CBN patří snížení bolesti a antibakteriální efekt i u odolných bakterií. CBN by mohl hrát roli při léčbě epidermolysis bullosa (nemoc motýlích křídel), kdy by mohla být prodloužena doba spánku při problémech s nespavostí a dále by mohl být využit i jako protizánětlivé a antibakteriální léčivo. Mezi nežádoucí účinky patří zvýšená chuť k jídlu a hlavně návykovost. [11]

Kanabichromen

Tento přírodní kanabinoid je často detekován v řemeslných konopných olejích používaných při léčbě epilepsie u dětí. [28]

CBC má protizánětlivé a antimikrobiální účinky, ale může se objevit i mírná alergická reakce, jelikož se jedná o sloučeninu, která je přibližně 2,5krát toxičtější než THC. [29]

1.3. Syntetické kanabinoidy

Syntetické kanabinoidy (SK) jsou synteticky připravené látky, které mají schopnost vázat se ke kanabinoidním receptorům CB1 a CB2, kde napodobují účinky THC. S jejich syntézou se začalo po objasnění struktury THC. Původním záměrem jejich syntézy bylo využití pro zkoumání funkce endokanabinoidního systému. Nejčastěji jsou označovány podle výzkumníků, kteří se podíleli na jejich syntéze např. JWH (skupina doktora Johna W. Huffmana), nebo podle místa výzkumu, např. HU (Hebrejská univerzita). [3, 4, 5]

U některých SK byla prokázána vyšší účinnost než u přírodních kanabinoidů, což vedlo k jejich využívání na drogové scéně. Ovšem jejich chronické užívání vede k řadě vedlejších účinků, jako je psychóza, poškození tkání, srdeční zástava a úmrtí. [30]

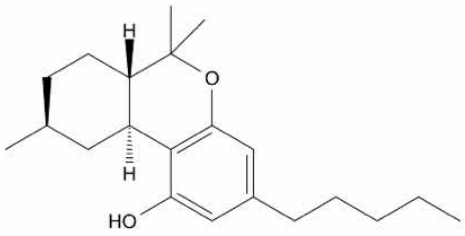
Mezi nejběžnější formy distribuce SK patří sprejování těchto látek na inertní botanický materiál (tabák, marihuanu), nebo jsou jejich roztoky přidávány do potravin (želatinových medvídků, které se těší oblibě především u dětí) nebo do náplní e-cigaret. [32]

1.3.1. Historický vývoj a klasifikace

První generace SK byla získána modifikací postranního řetězce uhlíkového řetězce THC (např. HU-210). Druhá generace SK již má kromě modifikace postranního uhlíkového řetězce i obměněné substituenty, které jsou připojené na aromatickou část THC (např. JWH-250). Nejnovější generací je generace třetí, u té již došlo i k záměně samotného indolového jádra za jádro indazolové (např. APINACA) či benzimidazolové (např. FUBIMINA). [31]

1.3.2. Hexahydrokanabinol

Hexahydrokanabinol, jehož strukturní vzorec je na obrázku 8, je stereoizomerní syntetický kanabinoid známý pod zkratkou HHC. HHC se přirozeně vyskytuje v zanedbatelném množství v pylu a semenech konopných rostlin. Jedná se o psychoaktivní derivát THC získávaný katalytickou hydrogenací. [33, 34, 35, 36]



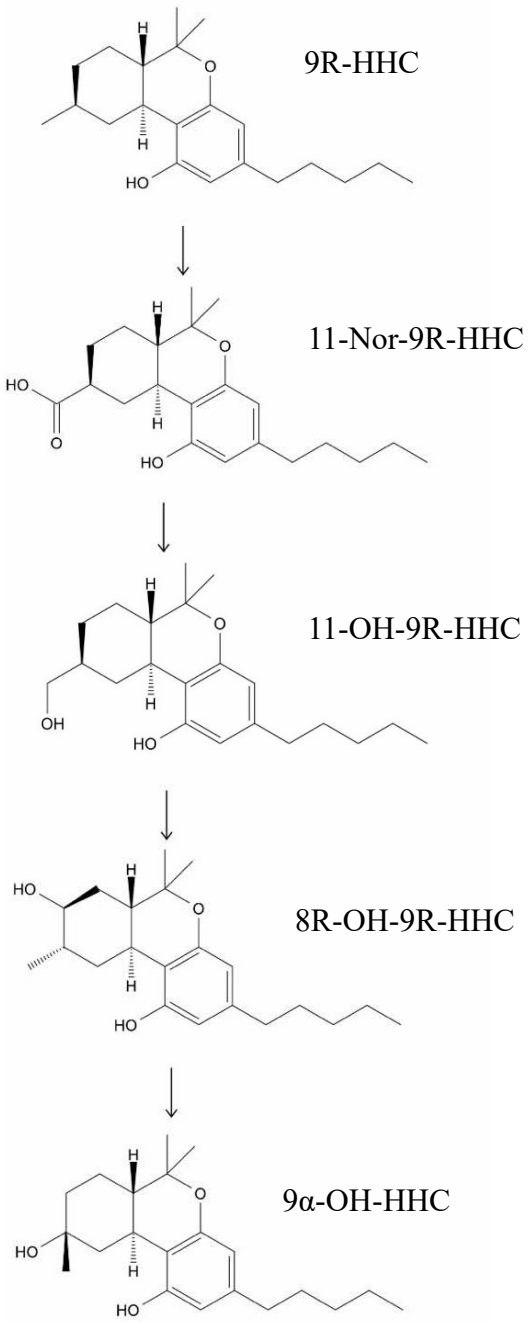
Obrázek 8 Strukturní vzorce izomeru 9R-HHC

HHC byl poprvé syntetizován v roce 1940 Adamsovou syntézou (katalytická hydrogenace), ale nebylo mu věnováno příliš pozornosti. V současné době je hodnocen jako psychoaktivní droga, je dostupný jako směs izomeru 9R-HHC (označovaného jako methyl ekvatoriální izomer HHC) a izomeru 9S-HHC (označovaného jako methyl axiální izomer HHC). Získává se z extraktu CBD s nízkým obsahem THC. [33, 34, 35, 36]

HHC se na trh dostal v podobě vape-per, e-liquidů, želatinových medvídků, nebo květů konopí a pryskyřice s nízkým obsahem THC, kam se HHC nastříká. [36]

HHC má terapeutický potenciál a mohlo by se jednat o vhodný doplňkový lék při rakovině tlustého střeva či oční hypotonii, ale kvůli časté intoxikaci (dosud není známo vhodné dávkování) se jedná o látku pro veřejnost zakázanou. [33, 34, 35]

Na obrázku 9 je znázorněna část biotransformace izomerů HHC. Nejprve dochází enzymatickou oxidací k odštěpení methylové skupiny na uhlíku 11, což vede k tvorbě 11-Nor-9R-HHC. Následuje hydroxylace na uhlíku 11, čímž vznikne 11-OH-9R-HHC. Poté následuje oxidace na uhlíku 8, čímž vzniká 8R-OH-9R-HHC. Posledním krokem biotransformace je hydroxylace na uhlíku 9 vedoucí ke vzniku 9α-OH-HHC. Tyto metabolické produkty jsou výsledkem enzymatické aktivity CYP 450. [36]



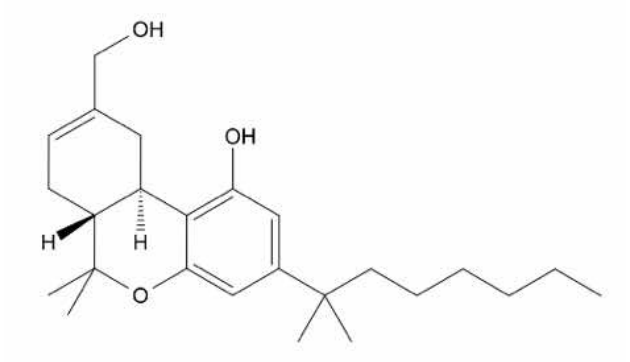
Obrázek 9 Část metabolismu HHC

1.3.3. Další syntetické kanabinoidy

HU-210

HU-210, jehož strukturní vzorec je na obrázku 10, se přidává do rostlinného materiálu bez konopí a je prodáván pod různými obchodními názvy (např. Spice, K2). Tento SK byl objeven kolektivem pod vedením Raphaela Mechoulama v roce 1988 na Hebrejské univerzitě a je považován za modelovou látku pro výzkum kanabinoidních receptorů. HU-210 je jedním

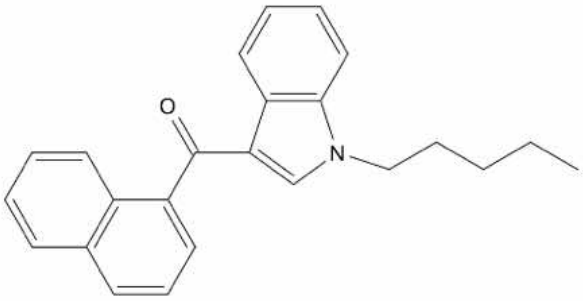
z nejúčinnějších antagonistů receptorů CB1 a CB2, ovšem s omezenou selektivitou pro kanabinoidní receptor CB1, aby zvýšil latenci zahájení příjmu potravy a snížil instrumentální odezvu na jídlo a příjem potravy. Ve srovnání s THC je přibližně 100–800krát účinnější, a to díky vysoké afinitě k receptorům. Má silné protizánětlivé, analgetické a neuroprotektivní účinky. Díky některým svým vlastnostem má potenciál k léčbě neurodegenerativních onemocnění (např. Alzheimerova choroba). Zatím je však stále ve fázi experimentálních studií, jelikož si udržuje dlouhou dobu účinku (přibližně 24 hod), což jej činí poměrně nebezpečným (silné riziko předávkování). Je zařazen na listinu kontrolovaných látek. [37, 38, 39]



Obrázek 10 Strukturní vzorec HU-210

JWH-018

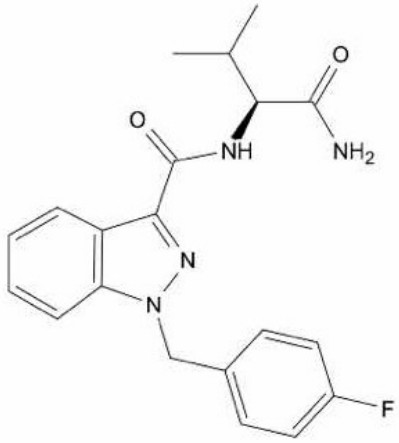
JWH-018, jehož strukturní vzorec je na obrázku 11, je považován za SK první generace skupiny antagonistů kanabinoidních receptorů. Byl vyvinut v roce 1995 profesorem Johnem W. Huffmanem na Clemson University v USA. Záměrem jeho vyvinutí bylo zkoumání interakcí mezi kanabinoidy a kanabinoidními receptory v lidském těle. Jedná se o úplného antagonistu receptorů CB1 a CB2 a zároveň má u receptoru CB1 vyšší afinitu a účinnost než THC. Má analgetické a psychoaktivní účinky, což by mohlo být přínosem pro vývoj nových léčivých přípravků, prozatím byl však používán pouze jako bylinná směs k inhalaci pro dosažení žádaného účinku. [39]



Obrázek 11 Strukturní vzorec JWH-018

AB-FUBINACA

AB-FUBINACA, jehož strukturní vzorec je na obrázku 12, je SK vyvinutý společností Pfizer v roce 2009 jako kanabinoidní analog s větší afinitou k receptoru CB1. S označením rekreační droga byl na trh uveden až v roce 2012. Jedná se o třetí generaci SK a obsahuje atom fluoru navázaný na para-benzylovou pozici, aby se zvýšila jeho biologická aktivita. AB-FUBINACA nejvíce působí na CB1 receptory mozku, což vede ke změně vnímání (např. euforie, zvýšení srdečního tepu, úzkost, paranoia a halucinace). Uživatelé tohoto SK uvádějí, že vyvolává záchvaty, halucinace a euforii, ale i zvracení, tachykardii a dokonce i smrt, což vedlo k jeho zařazení na seznam zakázaných látek. [41]



Obrázek 12 Strukturní vzorec AB-FUBINACA

1.3.4. Rizika spojená se syntetickými kanabinoidy

Jedním z rizik spojených s užíváním SK je dosud neznámé denní dávkování jednotlivých SK, jelikož se na trh dostávají stále nové varianty. Dalším z rizik je to, že se po užití SK vyskytují poměrně často nežádoucí účinky (od bolesti hlavy až po smrt v důsledku intoxikace). Dále je zde riziko vzniku závislosti na SK. Mezi hlavní rizika patří i distribuce SK v podobě

želatinových medvídků, které jsou velkým lákadlem pro nezletilé, jimž však produkt nebyl určen. Jako problém je nutno hodnotit skutečnost, že se na některých produktech sice vyskytuje označení „Výrobek není určen pro lidskou spotřebu“, avšak většinu uživatelů to neodradí od vykouření nakoupeného konopí s postřikem SK. [42]

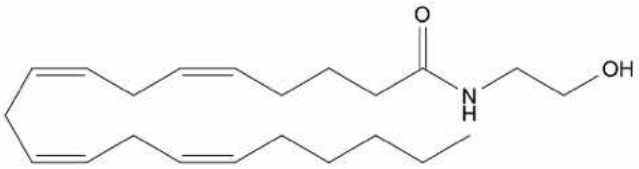
1.4. Kanabinoidní receptory a mechanismy účinku

Kanabinoidy s lidským organismem interagují prostřednictvím endokanabinoidního systému, který se skládá z endokanabinoidů, kanabinoidních receptorů a enzymů. Funkcí enzymů v tomto systému je napomáhat syntetizovat a rozkládat samotné endokanabinoidy. Většina účinků všech známých kanabinoidů je zprostředkována dvěma receptory (CB1 a CB2) spojenými s G proteinem. [43]

1.4.1. Endokanabinoidy

Anandamid

Arachidonoylethanolamid neboli anandamid, jehož strukturní vzorec je na obrázku13, je prvním z objevených endogenních ligandů kanabinoidních receptorů. K jeho izolaci došlo v roce 1992 a jedná se o lipidový přenašeč, který je syntetizován a uvolňován neurony v mozku. Dále se může generovat makrofágy, kde se jeho syntéza indukovaná bakteriálním endotoxinem podílí na hypotenzi septického šoku a jaterní cirhóze. Chová se jako částečný agonista na receptorech CB1, na receptorech CB2 je téměř neaktivní. Anandamid syntetizovaný makrofágy se též podílí na protizánětlivých účincích. [44, 45]

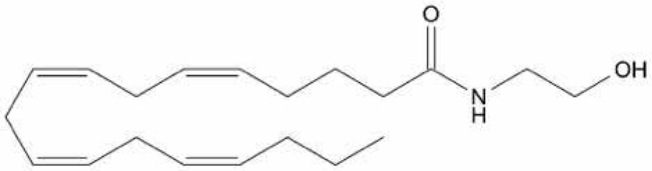


Obrázek 13 Strukturní vzorec anandamidu

Homo-γ-linolenoylethanolamid a 7,10,13,16-docosatetraenoyletanolamid

Tyto dva endokanabinoidy, jejichž strukturní vzorce jsou znázorněny na obrázcích 14 a 15, byly objeveny v roce 1993 panem profesorem Hanušem, který je izoloval z prasečího mozku. [46]

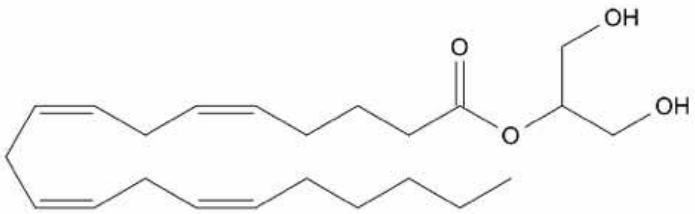
Obrázek 14 Strukturní vzorec homo-γ-linolenoylethanolamidu



Obrázek 15 Strukturní vzorec 7,10,13,16-docosatetraenoyletanolamidu

2-arachidonoylglycerol

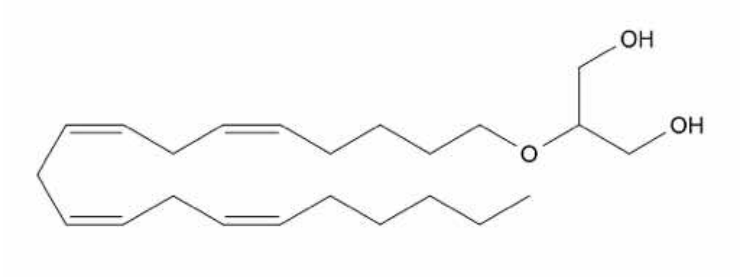
Tento endokanabinoid, jehož strukturní vzorec je na obrázku 16, byl poprvé izolován z psího střeva v roce 1995 týmem, v němž působil i profesor Hanuš. [47]



Obrázek 16 Strukturní vzorec 2-arachidonoylglycerolu

Noladin ether

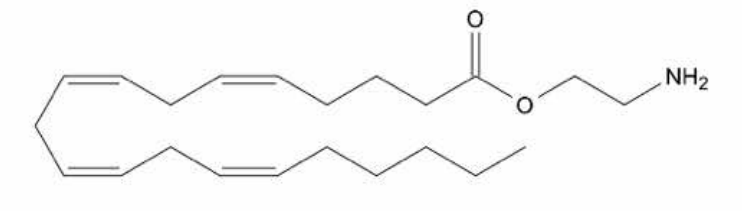
Noladin ether známý též jako 2-arachidonylglycerylether, jehož strukturní vzorec je na obrázku 17, byl poprvé izolován v roce 2001 profesorem Hanušem z prasečího mozku. Váže se na receptor CB1 a velmi slabě na receptor CB2. [48]



Obrázek 17 Strukturní vzorec noladin etheru

Virodhamid

Endokanabinoid, jehož strukturní vzorec je na obrázku 18, je tvořen kyselinou arachidonovou a ethanolaminem spojenými esterovou vazbou. Virodhamid byl objeven v roce 2002 a jedná se o částečného antagonistu receptoru CB1 a úplného antagonistu receptoru CB2. [49]



Obrázek 18 Strukturní vzorec virodhamidu

1.4.2. CB1 receptory

Receptory CB1 se primárně nacházejí v centrálních a periferních neuronech mozku, tudíž se podílejí na neurobehaviorálních a psychotropních účincích. V menší míře jsou exprimovány i jinými než neuronovými buňkami (včetně imunitních buněk). Receptory CB1 signalizují pomocí inhibičních G proteinů. Při stimulaci receptoru dojde k inhibiční aktivaci G proteinu, což vede k inhibici adenylylcyklázy, aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkináz, inhibici některých napěťově řízených Ca^{2+} kanálů a aktivaci G proteinů vnitřně navázaných na K^{+} kanály. Aktivací těchto signálních drah se při vysokých hladinách CB1 potlačí neuronální excitabilita a inhibuje neurotransmise. Při užití jakékoliv formy THC dochází k navázání THC na receptor s vysokou afinitou, ale nižší afinitou než SK a endokanabinoidy, čímž dochází ke krátkodobému prohloubení odpovědi na signál. Při užití nějaké formy CBD dochází pouze k nízké odpovědi na signál, jelikož se na receptor váže pouze s velmi nízkou afinitou. V případě HHC se jeden z izomerů váže s vyšší afinitou (9R-HHC) než THC a druhý s o řád nižší afinitou (9S-HHC) než THC. [33, 43, 50, 51]

1.4.3. CB2 receptory

Receptory CB2 se primárně nacházejí v imunitních buňkách, zejména mikrogliích, osteoklastech, osteoblastech a neuronech, tudíž mají důležitou roli při zánětlivých procesech, kdy se podílejí na imunitní reakci. Stimulace CB2 je podobná stimulaci CB1, ale modulace iontových kanálů receptorů CB2 je variabilnější než u CB1. [33, 43, 50, 51]

1.5. Analytické metody pro stanovení kanabinoidů

K analýze kanabinoidů se používají různé typy biologických matric např. vlasy, moč, stolice, sliny, novorozenecká smolka a především krev.

1.5.1. Odběr vzorku

Mezi neinvazivní metody odběru vzorku patří zejména vzorky slin, které je možné odebrat i na veřejnosti. K odběru vzorku se používá vatová tyčinka, kterou se provede výtěr ústní dutiny.

Odběr moči a stolice je taktéž považován za metodu neinvazivní, ale vzorek nelze odebrat na veřejnosti.

Vzorek krve je odebírán pouze kvalifikovaným pracovníkem (zdravotní sestrou nebo lékařem).

U každého vzorku je nutné dbát na sterilitu odběrového materiálu, aby se zabránilo znehodnocení vzorku kontaminací.

1.5.2. Preanalytická část

Úprava vzorku je nejdůležitější část analytického procesu, jelikož ovlivní skoro všechny kroky analýzy. Je potřeba získat formu biologického materiálu, která je kompatibilní s vybranou instrumentální analytickou metodou. Úprava může být velice jednoduchá (např. filtrace), ale většinou se jedná o složitější postupy s několika dílčími kroky, což ji činí časově náročnou a bývá možným zdrojem chyb lidského faktoru. Úprava vzorků obecně tvoří přibližně 80 % z celkové analýzy, kvůli čemuž se věda neustále snaží jednotlivé kroky automatizovat, zkracovat a vylepšovat (např. mikrotitračními destičkami, které umožňují simultánně upravovat více vzorků najednou). Mezi nejběžnější techniky úpravy vzorku patří: extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, z angl. liquid-liquid extraction), extrakce tuhou fází (SPE, z angl. solid-phase extraction) a proteinová precipitace (PP). [52, 53]

1.5.2.1. Extrakce kapalina–kapalina

Jedná se o nejstarší používanou metodu úpravy vzorku. Cílem této techniky extrakce je převedení vzorku z hydrofilní fáze do fáze lipofilní. Metoda je založena na ustálení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Tyto dvě nemísitelné kapaliny je třeba promísit, aby došlo k rozdělení molekul analytu mezi kapaliny (poměr, jakým se tak stane, je dán lipofilitou molekul analytu, pH hydrofilní fáze, typem organického rozpouštědla, poměrem fází, délkou, intenzitou a množstvím cyklů třepání). [52, 54, 55]

Hydrofilní fází běžně bývá biologický materiál (např. moč, krev). Organickou fází by měla být kapalina nemísitelná s biologickým materiálem, zároveň by měla být schopná navázat požadované analyty z biologického materiálu. Organická rozpouštědla jsou ve většině případů kompatibilní s instrumentální analytickou metodou; nekompatibilní rozpouštědla musí být před samotnou analýzou odpařena, proto by měla být těkavá. Dalším kritériem výběru organického rozpouštědla je polarita analytu, kdy pro nepolární látky je vhodný např. n-hexan a pro polární látky např. ethylacetát. [52, 54]

Na výtěžnost LLE má vliv poměr fází, kdy je vhodnější, aby byla organická fáze v nadbytku, jelikož bude mít větší povrch, což analytu dává větší možnost do ní přejít. Proces extrakce ovlivňuje i intenzita třepání, při velmi prudkém třepání je velké riziko vzniku emulze. [52, 54]

1.5.2.2. Extrakce tuhou fází

Tato extrakce je jednou z nejpoužívanějších technik úpravy vzorku. Principem metody je dělení analytu mezi tuhou (sorbent kolonky) a kapalnou (biologický materiál) fázi. Důležité je, aby měl analyt vyšší afinitu k sorbentu než ke své matrici, aby byl tuhou fází sorbován. [54]

Jedná se o poměrně jednoduchou metodu, kde je základem kolonka se sorbentem. Částice sorbentu kladou odpor proudící kapalné fázi, tudíž je třeba SPE provádět např. ve vakuu, aby došlo k urychlení procesu. [54]

SPE je zdlouhavá metoda, ale zároveň je metodou velice selektivní. Skládá se z několika dílčích kroků: kondicionace, promytí, nanesení vzorku, promytí a eluce. Kondicionace slouží ke smočení sorbentu, za účelem reprodukovatelné retence analytu na sorbentu a jsou k ní využívána polární organická rozpouštědla (např. acetonitril). První promytí je potřeba k odstranění organického rozpouštědla, tudíž je kolonka před nanesením vzorku promyta vodou nebo pufrem. Následuje nanesení vzorku, kdy se analyty sorbují na sorbenty. Poté je třeba kolonku opět promýt, aby se odstranily případné nečistoty a případné nežádoucí sloučeniny

obsažené ve vzorku. Posledním krokem je eluce, která slouží k vyvázání sorbovaného analytu. K eluci se používá eluční rozpouštědlo, které ruší nekovalentní vazby sorbentu s analytem. [52, 54]

SPE může mít více druhů uspořádání. Jedním z nich je SPE založená na principu reverzních fází (RP-SPE), kdy je retence způsobena nepolárními hydrofobními interakcemi. Další z variant SPE je extrakce založená na principu normálních fází (NP-SPE), kdy je retence analytu na sorbentu zajištěna pomocí polárních interakcí. Třetí z typů SPE je iontově výměnná SPE (SPE-IEX), kde dochází k iontovým interakcím mezi analytem s nábojem a sorbentem, který má opačnou polaritu. [52, 55, 56]

1.5.3. Chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Chromatografie je separační metoda, která rozděluje jednotlivé složky vzorku. V bioanalytické praxi se jedná o nejvyužívanější metodu pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Chromatografické metody jsou založeny na distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze je pohyblivá, tudíž unáší analyt a může být kapalná, či plynná. Stacionární fáze je nepohyblivá a tvoří jádro chromatografické kolony, přes nějž je analyt unášen mobilní fází. Stacionární fáze může být v pevném skupenství, ale i v kapalném skupenství, kdy je ukotvena na pevném nosiči. [56, 57]

Při samotné analýze je vzorek aplikován na začátek systému a je unášen proudem mobilní fáze přes stacionární fázi. Jednotlivé složky vzorku tzv. analyty interagují se stacionární fází, tudíž dochází k jejich retenci. Jednotlivé složky vzorku jsou na stacionární fázi zadržovány, míra retence je odvozena od jejich afinity k mobilní a stacionární fázi. Složky vzorku se silnější afinitou ke stacionární fázi jsou zadržovány v koloně déle, kdežto složky s vyšší afinitou k mobilní fázi opouštějí kolonu dříve. [56, 57]

1.5.3.1. Kapalinová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, z angl. Liquid Chromatography) je založena na principu separace složek vzorku mezi stacionární a mobilní fázi, která je kapalného skupenství. Vzorek je aplikován na začátku systému a je unášen mobilní fází celým systémem. V koloně, kde se nachází stacionární fáze, dochází k separaci složek vzorku. Rozdělení složek vzorku závisí na jejich afinitě k mobilní nebo stacionární fázi, na jejich velikosti, náboji a hydrofobicitě. Eluované složky vzorku nese mobilní fáze k detektoru. Záznamem LC je chromatogram. [58, 59, 60]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. High Performance Liquid Chromatography) se vyznačuje vysokou účinností separace složek. Vysoké účinnosti je dosaženo pomocí malých částic stacionární fáze, která tvoří jádro kolony. Částice stacionární fáze jsou od sebe vzdáleny pouze v řádech mikrometrů, což analytu poskytuje velký povrch k separaci složek, ale také způsobuje velký zpětný tlak průchodu mobilní fáze, proto je nutné ji do systému přivádět vysokotlakým čerpadlem. Mobilní fáze se většinou skládá ze směsi dvou rozpouštědel, která se liší svou eluční silou. Pokud vzorek obsahuje složky s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, používá se isokratická eluce, což znamená, že se poměr rozpouštědel v mobilní fázi v průběhu analýzy nemění. V případě, že složky vzorku mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, využívá se gradientová eluce, při které se v průběhu analýzy mění poměr rozpouštědel ve prospěch toho s vyšší eluční silou. Výstup chromatografické separace se nazývá chromatogram, což je graf závislosti času na intenzitě měřené veličiny, která se odvíjí od typu detektoru. [56, 57]

1.5.3.2. Plynová chromatografie

Vzorky stanovované pomocí plynové chromatografie (GC, z angl. Gas Chromatography) by měly být dostatečně těkavé, tepelně stabilní a méně polární. Vzorky jsou vedeny plynnou mobilní fází přes kolonu se stacionární fází, kde dochází separaci složek vzorku. Mobilní fází by měl být inertní plyn (např. He), který nereaguje se vzorkem. Stacionární fází může být pevný adsorbent nebo kapalina navázaná na pevný nosič. [61, 62]

1.5.3.3. Hmotnostní spektrometrie

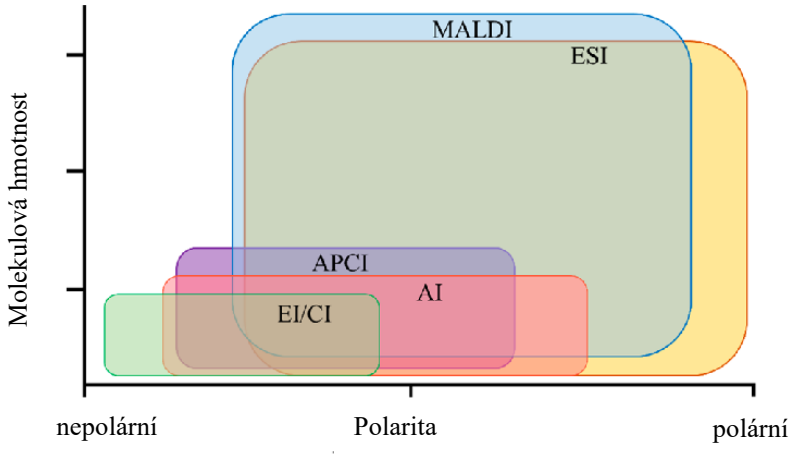
Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. Mass Spectrometry) je citlivá a selektivní analytická metoda. Hmotnostní spektrometr je zařízení, které vytváří, rozděluje a zaznamenává intenzitu iontů. Výstupem MS je hmotnostní spektrum, respektive graf závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z). [57, 63]

Spektrometr poskytuje informaci o struktuře vzorku, což pomáhá při identifikaci a kvantifikaci i složitějších analytů; jeho nevýhodou je vysoká pořizovací cena, destruktivní povaha detekce a vysoké nároky na obsluhu. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. [57, 64]

Iontový zdroj

V iontovém zdroji dochází k rozštěpení neutrální molekuly vzorku na nabité iontové částice. Ionizace může probíhat za vakua i za atmosférického tlaku. Dále je možné ionizaci rozdělit

dle míry fragmentace iontů na tvrdou a měkkou. Tvrdé ionizační techniky (elektronová a chemická ionizace) jsou vhodné pro spojení s GC a měkké ionizační techniky (MALDI, elektrosprej, fotoionizace za atmosférického tlaku a chemická ionizace za atmosférického tlaku) jsou vhodné pro spojení s HPLC. [57, 63]



Obrázek 19 Možnosti použití ionizačních technik podle povahy analytu [65]

Elektrosprej (ESI) je nejvyužívanější ionizační technika. Je vhodná pro středně polární látky a její výhodou je tvorba vícenásobně nabitých iontů. Analyt je společně s mobilní fází přiváděn kapilárou do zmlžující komory, kde je za pomoci zmlžujícího plynu (např. dusíku) rozprášen na miniaturní nabité kapičky, které se odpařováním mobilní fáze stále zmenšují, čímž se zvyšuje hustota povrchového náboje. Když dojde k dosažení Rayleighova limitu, dochází k coulombické explozi, což způsobí rozpad kapiček na ještě menší kapičky. Vzniklé ionty jsou transportovány do hmotnostního analyzátoru. [63, 64, 66]

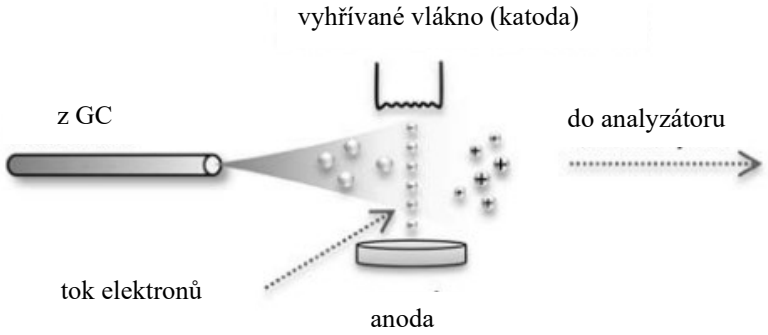
Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) je vhodná pro nepolární až středně polární látky. Analyt je do ionizátoru přiváděn společně s mobilní fází kovovou kapilárou, na jejímž konci dojde k jeho zmlžení inertním plynem. K samotné ionizaci dojde ve vyhřívané komoře, kterou prochází paprsek UV záření, což způsobí rozpad molekuly na ionty. Následuje sušení za pomoci sušícího plynu, který má zabránit vzniku případných klastrů. Dochází k selektivní ionizaci analytu, kterou je možné zvýšit použitím dopantu. [63, 64, 66]

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je vhodná pro nepolární až středně polární látky. Při použití této ionizační techniky je analyt přiváděn společně s mobilní fází kovovou jehlou, na jejímž konci je jako u APPI zmlžen do vyhřívané komory inertním plynem. K ionizaci dochází pomocí výbojové jehly. Koronový proud působí nejdříve na mobilní fázi,

což zapříčiní vznik reakčního plynu, který pak interaguje se samotným analytem a přenáší na něj svůj náboj. Následuje transport iontu přes sušící plyn do analyzátoru. [63, 64, 66]

Další z možností ionizace je ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), která je vhodná pro polární i nepolární látky v závislosti na použité matrici. Vzorek s matricí je aplikován na MALDI destičku s terčíkem, poté vzorek necháme zaschnout. Na zaschlý vzorek jsou vysílány laserové pulzy, čímž dochází k odpaření vzorku; následně dojde k interakci mezi matricí a analytem, což zapříčiní vznik iontů, které jsou transportovány do analyzátoru. [67]

Elektronová ionizace (EI) je vhodná pro nepolární až mírně polární látky. Jedná se o tvrdou ionizační techniku, což znamená, že se molekuly analytu rozbijí na velké množství fragmentačních iontů. Analyt je společně s mobilní fází přiváděn do proudu letících elektronů, které s analytem interagují, čímž vznikají ionty. Ionty jsou dále vedeny do analyzátoru. [68]



Obrázek 20 Schéma EI [68]

Analyzátor

Analyzátor je umístěn za ionizačním zdrojem a před detektorem. Funkcí analyzátoru je rozdělení iontů v plynné fázi podle jejich m/z. Je možné mít více analyzátorů po sobě jdoucích, což z nich tvoří tandemovou MS (MS/MS). Pro analyzátory jsou udávány různé charakterizační parametry: rozsah (udává rozsah m/z, jejž je analyzátor schopen zaznamenat), správnost určení (míra schopnosti určit správnost m/z), rozlišovací schopnost (schopnost rozlišit dva sousedící ionty), dynamický rozsah (rozmezí koncentrací) a rychlost skenování. [57, 63, 66]

Kvadrupólový analyzátor (Q) je tvořen ze čtyř kovových tyčí kruhového průřezu, kdy na všechny tyče je vloženo stejnosměrné napětí a zároveň na obě protilehlé tyče vloženo stejné střídavé napětí. Principem je stabilní oscilace iontů proudících z ionizátoru do detektoru. Stabilní ionty projdou přes Q až k detektoru. V praxi bývá několik Q spojených za sebou (trojitý

kvadrupól, QqQ), kdy první Q slouží k výběru specifického iontu, prostřední slouží jako kolizní cela a poslední analyzuje. [57, 64, 66]

Orbitrap je tvořen středovou elektrodou a dvěma zaoblenými elektrodami, na které je vloženo napětí, což vytvoří elektrické pole. Ionty putují do pasti, kde vlivem zvyšujícího se napětí začnou rotovat kolem středové elektrody. Ionty se rozdělují na prstence podle své schopnosti harmonicky oscilovat kolem elektrody, což závisí na jejich m/z. Frekvence oscilací jednotlivých prstenců vytváří na elektrodách indukovaný proud, který je převeden Fourierovou transformací na hmotnostní spektrum. Orbitrap patří mezi vysokorozlišovací analyzátory. [63, 66]

V analyzátoru doby letu (TOF) jsou všechny ionty nashromážděny na počátku TOF a poté pulsem vypuzeny do analyzátoru. K rozdělení iontů dochází na základě odlišné rychlosti, kdy těžší ionty letí pomaleji než lehčí. [69, 70]

Detektor

Detektor má za úkol generovat signál z dopadajících iontů. Nejběžnějším detektorem je elektronový násobič, který pracuje na principu zesílení signálu iontu dopadlého na dynodu. Detektorem může být rovněž Faradayova klec, která pracuje na principu indukce proudu po dopadu iontu. Dále je možné využít i fotonásobič, který využívá urychlující fotony, jež se uvolňují z fosforové destičky. [63, 64]

1.5.4. Metody stanovení

Screeningové metody

Mezi nejjednodušší metody prokazující užití kanabinoidů (a jiných drog) patří screeningové analýzy (dokáže je provést i laik). Úskalím těchto metod je, že mohou poskytnout jak falešně pozitivní výsledek, tak falešně negativní výsledek. Jedna ze screeningových analýz se nazývá DrugWipe 5S a detekuje kromě konopí i jiné drogy (např. opiáty a kokain). Limit detekce této metody je 10 ng/ml THC. Použitým biologickým materiálem jsou sliny, které se odeberou krouživým pohybem po vnitřní straně úst a jazyku, poté se vzorek vloží do detekčního zařízení a postupuje se dle pokynů výrobce. Další ze screeningových metod je DrugTest 5000. Test odhaluje nejen konopí, ale i ketamin, metadon a další. Limit detekce této metody je 25 ng/ml THC. Vzorkem jsou opět sliny, které se odeberou krouživým pohybem po celé dutině ústní a vloží se do detekční kazety, která přibližně za 4 minuty poskytne výsledek. [71]

Další screeningovou metodou je enzymový imunosorbentní test (ELISA, z anglického názvu Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), který již nemůže provést nikdo jiný než odpovědná osoba. Metoda je založena na kompetitivní vazbě enzymaticky značeného antigenu a neznačeného antigenu na protilátku v poměru jejich koncentrací v reakční jamce. Biologickým materiálem mhou být moč nebo vlasy. Při stanovení THC z moči je třeba moč nejdříve enzymaticky hydrolyzovat pomocí β-glukuronidázy a poté rozředit ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku. Takto připravený vzorek se již může analyzovat. U vzorku vlasů je příprava poněkud složitější a zdlouhavější. Vlasy jsou nejprve 10 min promývány dichlormethanem, poté methanolem a nakonec se suší při 50 °C v sušárně. Po usušení se vlasy rozemelou a naváží do skleněných zkumavek s hermeticky uzavíratelným šroubovacím uzávěrem. K vlasům se přidá fosfátový pufr a nechá se inkubovat 5 hod při pokojové teplotě. Supernatant se použije ke screeningu. Limit detekce této metody je 0,02 ng/ml THC v supernatantu. [72]

Kvantifikační a kvalifikační metody

Při stanovení kanabinoidů pomocí plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je biologické vzorky nutno upravit s využitím extrakčních metod. GC je vhodná pro termostabilní látky v plynné fázi. Netěkavé (polární a některé nízkomolekulární) analyty je třeba upravit pomocí derivatizačních technik jako jsou např. acetylace, alkylace a esterifikace. [73]

U stanovení kanabinoidů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) je také potřeba vzorky nejprve upravit. LC má poměrně širší uplatnění než GC, jelikož je rychlejší a jednodušší na přípravu vzorků. [74]

Možnosti stanovení kanabinoidů v biologických matricích s využitím GC-MS

Zde jsou k nahlédnutí techniky přípravy vzorků biologických matric pro analyzování pomocí GC-MS:

1. 1 ml vzorku moči byl hydrolyzován 500 µl 1M roztoku hydroxidu sodného a 15 µl směsi vnitřních standardů (roztok THC-D3 a THC-COOH-D3 o koncentraci 1 µg/ml). Poté byla směs ohřívána 30 min při teplotě 70 °C. Po ochlazení byl přidán 1 ml acetonitrilu a nakonec byl vzorek derivatizován přidáním 30 µl triethylamidu (TEA) a 30 µl polychlorfenylesteru (PCF) a vše bylo promícháno na vortexu. Analyt byl získán extrakcí kapalina–kapalina 2 ml hexanu a třepáním 60 s. Organická fáze byla odpařena

pod mírným proudem dusíku. K odparku bylo před vlastní analýzou GC-MS přidáno 50 µl hexanu. Limit detekce je 0,5 ng/ml THC a 1,2 ng/ml THC-COOH. Limit kvantifikace je 1,3 ng/ml THC a 2,6 ng/ml THC-COOH. [75]

2. K 1 ml vzorku plné krve bylo přidáno 10 µl směsi vnitřních standardů (roztok 0,2 µg/ml THC-D3, 0,5 µg/ml OH-THC-D3 a 1 µg/ml THC-COOH-D3). Následně byl vzorek deproteinován pomocí 1,5 ml ACN a poté byl odstředěn (5 min, 5 500 ot/min). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a bylo přidáno 300 µl 1M hydroxidu sodného. Nakonec bylo přidáno za stálého vortexování 30 µl TEA a 30 µl PCF. Následovala extrakce kapalina–kapalina 2 ml hexanu po dobu 60 s. Organická fáze byla odpařena pod mírným proudem dusíku a k odparku bylo přidáno 50 µl hexanu. Takto připravený vzorek byl analyzován GC-MS. Limit detekce je 0,2 ng/ml THC a OH-THC a 0,9 ng/ml THC-COOH. Limit kvantifikace je 0,5 ng/ml THC, 0,6 ng/ml OH-THC a 24 ng/ml THC-COOH. [75]
3. Dalším možným postupem je, že do 0,25 ml vzorku plné krve, příp. moči bylo přidáno 10 µl směsi vnitřních standardů (3 ng/ml pro THC-D3, OH-THC-D3, CBD-D3, CBN-D3 a 30 ng/ml pro THC-COOH-D9). Vzorky plné krve bylo třeba následně vysrážet postupným přidáním 1 ml 75% acetonitrilu ve vodě za míchání na vortexu. U vzorků moče bylo nutno vzorky po přidání vnitřních standardů enzymaticky deglukuronidovat přidáním 10 µl *β*-glukuronidázy. Vzorky moče bylo dále nutno inkubovat 60 min při 40 °C a poté precipitovat přidáním 0,75 ml acetonitrilu. Vzorky moče i krve byly po těchto úpravách centrifugovány 10 min při 2 500 ot/min. Po odstředění byl odebrán supernatant do čisté zkumavky. Následovala extrakce tuhou fází (Chromabond® C18 ec, 1 ml/100 mg), kdy bylo třeba nejprve kondiciovat kolonky 2 ml methanolu, 2 ml vody a nakonec 1 ml 0,1M vodným roztokem acetonu (pokaždé s průtokem 150 µl/s). V případě 1 ml vzorku plné krve bylo potřeba vzorky zředit přidáním 1,5 ml 0,1M acetonu a v případě 0,75 ml vzorku moči přidáním 1,75 ml 0,1M acetonu. Takto zředěné oba druhy vzorků byly kolonkou prosávány rychlostí 15 µl/s. Kolonka byla následně promyta 1 ml 0,1M acetonu a poté 1 ml 30% acetonitrilu rychlostí 15 µl/s. Poté byla kolonka sušena 5 min v proudu dusíku. Analyty ze sorbentu byly eluovány 0,9 ml acetonitrilu. Eluát byl převeden do lahvičky s magnetickým uzávěrem a odpařen do sucha (přibližně 8 min při 70 °C). K vysušenému vzorku bylo přidáno 30 µl *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (MSTFA) a poté byla směs derivatizována 20 min při 90 °C. Derivatizovaný vzorek byl analyzován pomocí GC-MS/MS. Limit detekce je 0,15 ng/ml pro THC, OH-THC, CBN, 0,1 ng/ml pro CBD

a 1 ng/ml pro THC-COOH. Limit kvantifikace je 0,3 ng/ml pro THC, OH-THC, CBD, 3 ng/ml pro THC-COOH a 0,2 ng/ml pro CBN. [76]

4. Jinou metodou přípravy vzorku plné krve nebo moči pro analýzu GC-MS/MS je využití disperzní extrakce tuhou fází (QuECHERS). K 200 µl vzorku plné krve nebo moči bylo přidáno 10 µl vnitřních standardů (2 µg/ml THC-D3 a THC-COOH-D3). Dále bylo přidáno 100 µl 1M acetátového pufru a 40 µl roztoku *β*-glukuronidázy, poté byla směs inkubována 2 hod při 60 °C. Následně bylo přidáno 500 µl acetonitrilu a vše bylo odstřeďováno 5 minut (při 4 500 ot/min). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a k němu bylo přidáno 45,71 mg chloridu sodného a 85,71 mg síranu hořečnatého. Následovalo 10 min intenzivního míchání a 5 min centrifugace (při 4 500 ot/min). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a vysušen proudem dusíku při pokojové teplotě. Nakonec byla provedena derivatizace 50 µl *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA). Takto připravený vzorek byl měřen GC-MS/MS. Limit detekce u vzorku moči pro 9R-HHC je 0,8 ng/ml. Pro vzorky krve je limit detekce 0,5 ng/ml pro 9R-HHC. Limit kvantifikace pro oba typy vzorků je 1 ng/ml pro 9R-HHC. [77]
5. K vzorku moči bylo přidáno 200 µl 6M hydroxidu sodného, což zapříčinilo hydrolýzu vzorku, která trvala 30 min a probíhala při pokojové teplotě. Ke snížení pH moči bylo přidáno 400 µl koncentrované kyseliny octové a získané pH bylo doupraveno pomocí acetátového pufru (celkový objem upraveného vzorku byl 5 ml), aby bylo výsledné pH neutrální. Poté byl vzorek krátce vortexován a následně 10 min centrifugován (při 2 600 ot/min). K 2 ml takto připraveného vzorku bylo přidáno 50 ng/ml každého standardu (THC, CBD, CBN, OH-THC, THC-COOH). Poté bylo třeba připravit QuEChERS: 0,4 g síranu manganatého, 0,1 g chloridu sodného, 0,1 g $C_6H_5Na_3O_7$ x 2 H_2O a 0,05 g $C_{12}H_{18}Na_4O_{17}$. Soli a 3 ml rozpouštědla složeného z acetonitrilu:dichlormethanu (v poměru 1:3) byly umístěny do zkumavky k extrakci. K tomu byla přidána alikvotní část vzorku a celé se to jednu minutu ručně protřepávalo. Následovalo krátké vortexování a poté 10 min odstřeďování (při 3 000 ot/min). Vrchní organická vrstva byla převedena do čisté zkumavky a sušena proudem dusíku za pokojové teploty. Následovala derivatizace 30 µl *N*-trimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamidu s 1% 2,2,2-trifluor-*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-acetamidu a chlortrimethylsilanem. To celé bylo 5 sekund vortexováno a ponecháno 30 min odstát při pokojové teplotě pro dokončení silylace. Takto připravený vzorek byl měřen GC-MS. Limit detekce je

3 ng/ml pro THC, 2,6 ng/ml pro OH-THC a 5 ng/ml pro THC-COOH, CBD a CBN. Limit kvantifikace je 9 ng/ml pro THC, 16 ng/ml pro CBD, 18 ng/ml pro CBN, 8,7 ng/ml pro OH-THC a 15 ng/ml pro THC-COOH. [80]

Možnosti stanovení kanabinoidů v biologických matricích s využitím LC-MS

Zde jsou k nahlédnutí techniky přípravy vzorků biologických matric pro analyzování pomocí LC-MS:

1. Jednou z možností úpravy vzorku vlasů pro stanovení HPLC-MS je nařezání vlasů na délku 1 mm. 10 mg nařezaných vlasů společně s 3 kuličkami z nerezové oceli bylo umístěno do 2ml polypropylenových zkumavek a takto byly vzorky drceny na prášek 20 min při 30 Hz. Poté byly vzorky nadrcených vlasů smíchány s 10 µl roztoku vnitřního standardu, 1 ml 0,5% kyseliny mravenčí v methanolu a třemi keramickými kuličkami. Takto připravený vzorek byl míchán při 50 °C po dobu 30 min. Následně byl extrakt centrifugován 5 min při 13 000 ot/min. Supernatant byl převeden do čisté polypropylenové zkumavky a odpařen proudem dusíku při 40 °C. K odparku byl postupně přidán 1 ml 0,5% kyseliny mravenčí v methanolu. Rozpuštěný odparek byl míchán 1 min a poté byl odstředěn. Supernatant byl vysušen do sucha a následně byl rozpuštěn v 200 µl methanolu. Takto připravený vzorek byl analyzován. Limit kvantifikace je 4 pg/ml pro THC, CBD, CBN a 0,1 pg/ml pro THC-COOH a THC-COOH-glukuronid. [78]
2. Plná krev byla pro analýzu připravenam ještě dalším způsobem. K 200 µl vzorku plné krve bylo přidáno 20 µl methanolu a 20 µl vnitřních standardů (100 µg/ml THC-D3, OH-THC-D3, CBN-D3 a THC-COOH-D3 a 10 µg/ml CBD-D3). Poté byly vysráženy proteiny přidáním 500 µl ledově studeného acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí za vortexování. Vzorky byly 10 min odstřeďovány (při 1 962 ot/min). Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky a byl zředěn 1,1 ml vody. Následovala SPE, kdy vzorky byly naneseny na sorpční materiál. Dále byly vzorky 2x promyty na sorpčním materiálu 500 µl 25% methanolu. Eluce proběhla 200 µl roztoku acetonitrilu:isopropanolu (v poměru 9:1) a 200 µl roztoku acetonitrilu:methanolu (v poměru 5:5) s 2% kyselinou mravenčí. Poté byly vzorky sušeny proudem dusíku při 40 °C a následně bylo přidáno 200 µl 50% acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí. Následovalo odstřeďování po dobu 10 min (při 1 962 ot/min). Limit kvantifikace pro THC, OH-THC, THC-COOH, CBD, CBN je 5–2 ng/ml. [79]

3. Vzorek dechu byl odebrán pomocí náustku SensAbues® a k němu bylo přidáno 25 µl vnitřních standardů (THC-D3, OH-THC-D3, THC-COOH-D3, CBD-D3 a CBN-D3). Takto připravený vzorek byl sušen 10 min. Následovala eluce vzorku 5 ml methanolu. Vzorek byl poté převeden do čisté lahvičky (přibližně 1,5 ml vzorku), sušen proudem dusíku při 60 °C a resuspendován 200 µl 50% acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí. Následovalo měření LC-MS. Limit kvantifikace pro THC, OH-THC, THC-COOH, CBD, CBN je 5–2 ng/ml. [79]
4. Ke vzorku slin příp. krve bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu (1 µg/ml THC-D3), 200 µl vody a 1 ml *n*-hexanu:ethylacetátu s 10% kyselinou octovou v poměru 9:1. Zkumavka se vzorkem byla 30 min míchána a poté 15 min odstřeďována (při 2 800 ot/min). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a byl sušen v proudu dusíku při 40–50 °C přibližně 30 min. K odparku bylo přidáno 100 µl methanolu a následovala analýza na LC-MS/MS. Limit detekce je 0,1 ng/ml pro 9R-HHC. Limit kvantifikace je 0,25 ng/ml pro 9R-HHC. [34]
5. K 100 µl vzorku moči bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu (1 µg/ml THC-D3) a 20 µl 5M hydroxidu sodného. Takto byl vzorek hydrolyzován 30 min při 70 °C. Poté byl přidán 1 ml 5M mravenčanu amonného, 20 µl kyseliny mravenčí a *n*-hexanu:ethylacetátu s 10% kyselinou octovou v poměru 9:1. Následně byl vzorek 10 min míchán pomocí rotátoru a odstřeďován 5 min (při 3 500 ot/min). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a sušen v proudu dusíku zhruba 30 min za pokojové teploty. K odparku bylo přidáno 100 µl methanolu a takto byl vzorek připraven k analýze LC-MS/MS. Limit detekce je 0,1 ng/ml pro 9R-HHC. Limit kvantifikace je 0,25 ng/ml pro 9R-HHC. [36]
6. K vzorku slin bylo přidáno 50 µl methanolu a 50 µl vnitřního standardu. Následně byl vzorek okyselen 400 µl 4% kyseliny fosforečné. Vzorek byl krátce vortexován a následně nanesen na kolonku SPE. Poté byla kolonka promyta 500 µl pufru složeného z 25% methanolu a 5% hydroxidu amonného. Pro eluci bylo použito 300 µl 98% acetonitrilu s 2% kyselinou mravenčí. Extrakt byl vysušen proudem dusíku při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 200 µl 50% acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí. Následovalo míchání na vortexu po dobu 5 min a poté byl vzorek odstřeďován 10 min (při 1 962 ot/min). Vzorek byl měřen na LC-MS. Limit kvantifikace je 0,4 ng/ml pro CBN, CBD, THC, OH-THC a THC-glukuronid a 1 ng/ml pro THC-COOH a THC-COOH-glukuronid. [81]

7. K 50 µl vzorku slin bylo přidáno 100 µl acetonitrilu a 5 µl vnitřních standardů (THC-D3, CBD-D3). Vzorek byl promíchán a poté byl 3x prosát pomocí 300µl špičky (obsahující sorbent WAX-X a sůl) a mikropipety. Následně bylo 100 µl horní vrstvy převedeno do lahvičky na dávkování vzorků a měřeno na LC-MS/MS. Limit detekce je 2 ng/ml pro THC a 4 ng/ml pro CBD. [82]

V tabulce 1 jsou tabelární formou shrnuty techniky stanovení kanabinoidů zmíněné výše.

Tabulka 1 Shrnutí metod stanovení kanabinoidů

Analytická metoda	Matrice	Identifikované analyty	Úprava vzorku	Citlivost	Citace
Screeningová analýza	Sliny	THC		LOQ 10 ng/ml (Securetec DrugWipe ® 5S), 25 ng/ml (DrugTest® 5000)	[71]
ELISA	Vlasy	THC	Enzymatická hydrolýza pomocí *β*-glukuronidázy	LOD 0,02 ng/mg	[72]
GC-MS	Krev	THC, OH-THC, THC-COOH, CBD a CBN	SPE	LOD 0,15 ng/ml (THC, OH-THC a CBN), 0,1 ng/ml (CBD), 1,0 ng/ml (THC-COOH), LOQ 0,3 ng/ml (THC, OH-THC a CBD), 0,2 ng/ml (CBN), 3,0 ng/ml (THC-COOH)	[76]
GC-MS	Krev a moč	9R-HHC	LLE	LOD vzorky moči 0,8 ng/ml (9R-HHC), vzorky krve 0,5 ng/ml (9R-HHC), LOQ oba typy vzorků 1 ng/ml (9R-HHC)	[77]
LC-MS	Krev a dech	THC, OH-THC, THC-COOH, THC-COOH-glukuronid, CBD, CBN a CBG	SPE	LOQ 0,5–2 ng/ml	[79]
PCF	Krev a moč	THC, OH-THC, THC-COOH	PCF derivatizace	LOD 0,2 ng/ml (THC a OH-THC v krvi), 0,5 ng/ml (THC v moči), 1,2 ng/ml (THC-COOH v moči), 0,9 ng/ml (THC-COOH v krvi) LOQ 0,5 ng/ml (THC v krvi), 1,3 ng/ml (THC v moči), 2,6 ng/ml (THC-COOH v moči), 24 ng/ml (THC-COOH v krvi), 0,6 ng/ml (OH-THC v krvi)	[75]

GC-MS	Moč	THC, OH-THC, THC-COOH, CBD a CBN	Extrakce pomocí solí	LOD 3 ng/ml (THC), 5 ng/ml (THC-COOH, CBD a CBN), 2,6 ng/ml (OH-THC), LOQ 9 ng/ml (THC), 16 ng/ml (CBD), 18 ng/ml (CBN), 8,7 ng/ml (OH-THC), 15 ng/ml (THC-COOH)	[80]
LC-HRMS	Vlasy	CBD, CBN, THC, THC-COOH a THC-COOH-glukuronid	Extrakce v 0,5% kyselině mravenčí	LOQ 4 pg/ml (THC, CBN a CBD), 0,1 pg/ml (THC-COOH a THC-COOH-glukuronid)	[78]
LC-MS	Sliny	CBN, CBD, THC, OH-THC, THC-COOH, THC-COOH-glukuronid, THC-glukuronid	SPE	LOQ 0,4 ng/ml (CBN, CBD, THC, OH-THC, THC-glukuronid), 1 ng/ml (THC-COOH, THC-COOH-glukuronid)	[81]
LC-MS	Sliny	THC a CBD	Extrakce ve špičce obsahující WAX-S a sůl	LOD 2 ng/ml (THC) a 4 ng/ml (CBD)	[82]
LC-MS	Krev, moč a sliny	9R-HHC	LLE	LOD 0,1 ng/ml (9R-HHC) LOQ 0,25 ng/ml (9R-HHC)	[36]

1.6. Legislativa a limity

Regulace kanabinoidů (např. THC a HHC) se liší napříč celým světem, přičemž je zohledněno jejich využití v medicíně, průmyslu i potenciální zneužití.

1.6.1. Mezinárodní regulace THC a SK

V členských státech Evropské unie jsou sjednány dvě úmluvy proti nedovolenému obchodu s omamnými a psychotropními látkami. Jednotná úmluva Organizace spojených národů o omamných látkách z roku 1961 obsahuje čtyři přílohy (ve dvou přílohách jsou uvedeny všechny kontrolované látky, ve třetí příloze jsou zaznamenány přípravky obsahující omamné látky a čtvrtá příloha definuje tvrdé drogy). V přílohách jsou látky zaznamenány od nejvíce omezených po nejméně omezené. Další dohodou je Úmluva o psychotropních látkách z roku 1971, kde jsou zaznamenány všechny látky, které mají psychoaktivní účinky (např. THC). V roce 2001 došlo k úpravě úmluv směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2001/83/ES o kodexu Společenství týkajícím se humánních léčivých přípravků – tato směrnice umožňuje užívání návykových látek po konzultaci a předepsání některých léčiv lékařem (nikoliv rekreační užívání). [83]

V USA byl v roce 1970 schválen jednotný systém kontroly omamných a psychotropních látek. Dohled v této oblasti zajišťuje Úřad pro boj s drogami (DEA, z angl. Drug Enforcement Administration). Marihuana (obsahuje více THC než technické konopí) byla v USA zakázaná i pro lékařské použití. V roce 1996 Kalifornie jako první ze států USA legalizovala používání marihuany pro léčebné účely pod lékařským dohledem. Dále v roce 2018 bylo povoleno pěstování marihuany. Od roku 2019 je marihuana legalizovaná přibližně ve 33 státech USA a v některých dokonce i k rekreačnímu užití. [84]

1.6.2. Specifika české legislativy

Zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách, reguluje nakládání s návykovými látkami a přípravky v České republice. Tento zákon stanovuje rámec zacházení s těmito látkami, včetně požadavků povolení k jejich užívání, skladování, dopravě a obchodování. V roce 2024 byla schválena novela tohoto zákona, která přináší změny týkající se psychomodulačních látek a byla vyhlášena pod číslem 321/2024 Sb. Novela nabyla účinnosti 1. ledna roku 2025 a měla by brát ohled na stále se vyvíjející drogový trh. [85]

1.7. Kvantitativní validace

Validací se rozumí ověření platnosti metody. Pokaždé, když se zavádí nová metoda nebo dochází v již zavedené metodě k nějaké změně, je třeba metodu validovat (ověřit). Při každé validaci se vytvoří validační plán, v němž se specifikují požadavky, zvolí se vhodná metoda a stanoví se validační údaje, rozsah a využití metody. Mezi validační údaje patří:

- preciznost a pravdivost – tento údaj má na starost, aby byla metoda přesná a opakovatelná, [86, 87]
- specifičnost a selektivita – při specifitě je metoda zcela oproštěna od vlivu matrice a u selektivity se zjišťuje, jak je výsledek ovlivněn složením matrice ,[86, 87]
- citlivost – výsledkem je kalibrační křivka, kde se zkoumá, jaká je míra schopnosti rozlišit 2 vzorky, [86, 87]
- mez detekce a mez kvantifikace – LOQ uvádí, jaké množství stanovovaného analytu je možné přesně kvantifikovat (zpravidla se jedná o nejnižší bod kalibrační řady). LOD udává, kdy je možné analyt ještě spolehlivě prokázat, [86, 87]
- pracovní rozsah a linearita – měří se alespoň 5 standarů v tripletech, [86, 87]
- pracovní postup, [86, 87]
- mezilehlá preciznost, [86, 87]
- extrakční účinnost – zjišťuje se, zda při extrakci neubývá koncentrace analytu. [86, 87]

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie

- standard (-)- Δ^9-THC-D3 1 mg/ml ethanolu (Lipomed, Německo)
- vnitřní standard (-)- Δ^9-THC-D3 0,1 mg/ml ethanolu (Lipomed, Německo)
- standard CBD 1 mg/ml methanolu (Lipomed, Německo)
- vnitřní standard CBD-D3 1mg/ml methanolu (Lipomed, Německo)
- standard d,l-11-Hydroxy-Δ^9-THC 0,1 mg/ml methanolu (Lipomed, Německo)
- vnitřní standard d,l-11-Hydroxy-Δ^9-THC-D3 0,1 mg/ml methanolu (Lipomed Německo)
- standard Nor-Δ^9-THC-karboxylová kyselina 0,1 mg/ml methanolu (Lipomed, Německo)
- vnitřní standard Nor-Δ^9-THC-karboxylová kyselina-D9 0,1 mg/ml methanolu (Lipomed, Německo)
- standard HHC 1 mg/ml methanolu (Lipomed, Německo)
- *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid s 1% trimethylchlorsilanu, (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- ledová kyselina octová, 99,8% (Penta, Česká republika)
- acetonitril, 99,9% (Fisher Scientific, Čína)
- methanol, 99,9% (Fisher Scientific, Norsko)
- destilovaná voda
- směsné sérum
- zplyněný kapalný dusík 5.0 (Linde, Česká republika)

2.1.1. Příprava pracovních roztoků

10% kyselina octová

Do zábrusové Erlenmeyerovy baňky bylo odlito odměrným válcem 90 ml destilované vody, automatickou pipetou 0,3 ml destilované vody, odměrným válcem 9 ml ledové kyseliny octové a automatickou pipetou 0,7 ml ledové kyseliny octové a roztok byl důkladně promíchán.

0,1M kyselina octová

Do 250ml odměrné baňky byly nality 3 ml destilované vody, k nim bylo přidáno odměrným válcem 14 ml ledové kyseliny octové a automatickou jednokanálkovou pipetou (rozsah 100 až 1000 µl) 0,375 ml ledové kyseliny octové. To vše bylo doplněno destilovanou vodou po rysku a důkladně promícháno. Z takto připraveného roztoku 1M kyseliny octové bylo do 100ml odměrné baňky odpipetováno 10 ml, doplněno destilovanou vodou po rysku a důkladně promícháno.

Směs vnitřních standardů

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu CBD-D3. K 900 µl methanolu bylo přidáno 100 µl ze zásobního roztoku vnitřního standardu CBD-D3 (o koncentraci 1 mg/ml), naředěný roztok byl krátce vortexován. Do 950 µl methanolu bylo přidáno 10 µl zásobních roztoků vnitřních standardů THC-D3 a OH-THC-D3, 20 µl zásobního roztoku vnitřního standardu THC-COOH-D9 a 10 µl pracovního roztoku vnitřního standardu CBD-D3 (vše o koncentraci 0,1 mg/ml), takto připravená směs byla krátce vortexována.

Pracovní roztoky standardů HHC a CBD

Pro získání pracovních roztoků standardů HHC a CBD o koncentraci 10 µg/ml bylo do vialky napipetováno 990 µl methanolu a 10 µl zásobního roztoku standardu (CBD a HHC) o koncentraci 1 mg/ml. Vialka byla krátce vortexována.

Pro získání pracovního roztoku standardu (HHC nebo CBD) o koncentraci 1 µg/ml bylo do vialky napipetováno 900 µl methanolu a 100 µl pracovního roztoku standardu (HHC a CBD) o koncentraci 10 µg/ml. Vialka byla krátce vortexována.

Pracovní roztoky standardu THC

Pro získání pracovního roztoku standardu o koncentraci 10 µg/ml bylo do vialky napipetováno 990 µl ethanolu a 10 µl zásobního roztoku standardu o koncentraci 1 mg/ml. Vialka byla krátce vortexována.

Pro získání pracovního roztoku standardu o koncentraci 1 µg/ml bylo do vialky napipetováno 900 µl ethanolu a 100 µl pracovního roztoku standardu o koncentraci 10 µg/ml. Vialka byla krátce vortexována.

Pracovní roztoky standardů OH-THC a THC-COOH

Pro získání pracovních roztoků standardů OH-THC a THC-COOH o koncentraci 10 µg/ml bylo do vialky napipetováno 900 µl methanolu a 100 µl zásobního roztoku standardu (OH-THC a THC-COOH) o koncentraci 0,1 mg/ml. Vialka byla krátce vortexována.

Pro získání pracovního roztoku standardu (OH-THC a THC-COOH) o koncentraci 1 µg/ml bylo do vialky napipetováno 990 µl methanolu a 10 µl zásobního roztoku standardu (OH-THC a THC-COOH) o koncentraci 0,1 mg/ml. Vialka byla krátce vortexována.

2.2. Přístrojové vybavení

- vortex (vortex V-1 plus, Biosan, Lotyšsko)
- zařízení pro ultrazvukové ošetření (Ultrasonic cleaner LEO-50, LEO Ultrasonic Co., Taiwan)
- centrifuga (Labofuge 400R, Heraeus INSTRUMENTS, Česká republika)
- zařízení pro extrakci ve vakuu (VISPREP 24™, SUPELCO, USA)
- zařízení pro odpaření vzorku dusíkem (TERMOVAP, ECOM spol. s r.o., Česká republika)
- termostat (DryBlockHeater, OHAUS®, Česká republika)
- plynový chromatograf (Nexis GC-2030, SHIMADZU, Japonsko)
- hmotnostní spektrometr (GCMS-TQ8050 NX, SHIMADZU, Japonsko)

2.2.1. Zařízení pro extrakci

Extrakce tuhou fází byla prováděna na zařízení VISIPREP 24™ Cat. No. 5-7250 (SUPELCO, USA), za pomoci vakuové pumpy. K extrakci byly použity kolonky SPEC 3 ml C18AR 30 mg, 100/PK (Agilent Technologies, USA).

2.2.2. Plynový chromatograf

Pro vlastní analýzu standardů a extraktů byl použit plynový chromatograf Nexis GC-2030 (SHIMADZU, Japonsko) s hmotnostním detektorem TQ8050 NX (SHIMADZU, Japonsko). Autosampler AOC-20i plus (SHIMADZU, Japonsko). Separace jednotlivých analytů byla provedena na koloně Rxi-5ms (Restek, USA) (30 m, 0,25 mm průměr a 0,25 µm tloušťka filmu). Nosným plynem bylo zplyněné kapalné helium 6.0 (Linde, Česká republika) a kolizním plynem byl zplyněný kapalný argon 5.0 (Linde, Česká republika). Programy k práci s daty a metodou byly GCMS Real Tima Analysis (sběr dat), GCMS Postrun Analysis

(k vyhodnocení), GCMS Analysis Editor (příprava metody), Smart Database (ukládání naměřených hodnot při tvoření nové metody) a MRM Optimalization Tool (excel k vývoji MRM metody).

2.3. Identifikace analytu

Pro identifikaci analytů bylo použito měření v módu Q3 SCAN, kde se skenuje m/z v rozmezí 35–660, aby bylo možné najít píky a poté je porovnat s knihovnami (Hans H. Mauser a kol., Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites).

Vzorek č. 1 byl připraven smícháním zásobních roztoků standardů 2 µl HHC (1 mg/ml), 2 µl THC (1 mg/ml), 2 µl CBD (1 mg/ml), 20 µl OH-THC (0,1 mg/ml) a 20 µl THC-COOH (0,1 mg/ml).

Vzorek č. 2 byl připraven smícháním zásobních roztoků vnitřních standardů 2 µl CBD-D3 (1 mg/ml), 20 µl THC-D3 (0,1 mg/ml), 20 µl OH-THC-D3 (0,1 mg/ml) a 20 µl THC-COOH-D9 (0,1 mg/ml).

Vzorek č. 3 byl připraven smícháním standardů 2 µl HHC (1 mg/ml), 2 µl THC (1 mg/ml), 2 µl CBD (1 mg/ml), 20 µl OH-THC (0,1 mg/ml) a 20 µl THC-COOH (0,1 mg/ml) a zásobních roztoků vnitřních standardů 2 µl CBD-D3 (1 mg/ml), 20 µl THC-D3 (0,1 mg/ml), 20 µl OH-THC-D3 (0,1 mg/ml) a 20 µl THC-COOH-D9 (0,1 mg/ml).

Všechny tři vzorky připravených roztoků byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku při teplotě 40 °C. Odparek byl rozpuštěn v 50 µl ACN a 50 µl BSTFA s 1% TMS. Poté byly vzorky derivatizovány 20 min při 70 °C. Po derivatizaci byly vzorky převedeny do vialek k vlastnímu měření.

2.4. Optimalizace metody

Pro optimalizaci metody byl volen MRM mód, při kterém první Q pracuje v SIM módu, který slouží k výběru daných iontů (kvantifikace), druhý Q slouží jako kolizní cela a třetí Q pracuje ve SCAN módu a hledá neznámé látky iontů (kvalifikace). Cílem bylo určit vhodné kolizní energie pro vybrané iontové přechody.

Postup přípravy používaných vzorků byl pokaždé stejný. Vždy byly připraveny 2 stejné vzorky smícháním zásobních roztoků standardů 2 µl HHC (1 mg/ml), 2 µl THC (1 mg/ml), 2 µl CBD (1 mg/ml), 20 µl OH-THC (0,1 mg/ml) a 20 µl THC-COOH (0,1 mg/ml) a zásobních roztoků vnitřních standardů 2 µl CBD-D3 (1 mg/ml), 20 µl THC-D3 (0,1 mg/ml), 20 µl OH-THC-D3

(0,1 mg/ml) a 20 µl THC-COOH-D9 (0,1 mg/ml). Následovalo odpaření roztoků pod proudem dusíku při teplotě 40 °C. Odparek byl rozpuštěn v 50 µl ACN a 50 µl BSTFA s 1% TMS. Poté byly vzorky derivatizovány 20 min při 70 °C. Po derivatizaci byly vzorky převedeny do vialek s inzertem k vlastnímu měření.

2.5. Úprava vzorku a derivatizace

K 1 ml vzorku (uměle obohaceného směsného séra) bylo přidáno 15 µl směsi vnitřních standardů. Vzorek byl krátce vortexován, poté k němu byly přidány 2 ml ACN. Následně byl vzorek opět vortexován, 5 min ultrazvukován a 5 min centrifugován při 3 500 ot/min. Supernatant vzorku byl převeden do čisté zkumavky a bylo k němu přidáno 150 µl 10% kyseliny octové a 3 ml destilované vody, toto bylo důkladně vortexováno. Následovala extrakce (SPE) za mírného vakua, kdy byla kolonka kondiciována 2 ml methanolu, 2 ml destilované vody a 1 ml 0,1M kyseliny octové. Po kondicionaci kolonky byl dávkován vzorek. Kolonka byla promyta 1 ml 0,1M kyseliny octové a 1 ml směsi ACN-voda (3:7), která byla připravena vždy čerstvá před samotnou extrakcí. Kolonka byla následně 5 min sušena pod mírným vakuem. Analyt byl ze vzorku eluován 2,5 ml ACN. Eluovaný analyt byl převeden do derivatizační 2,5ml vialky a odpařen v proudu dusíku při teplotě 40 °C. Odparek byl rozpuštěn v 50 µl ACN a 50 µl BSTFA s 1% TMS a byl derivatizován 20 min při teplotě 70 °C. Vzorek byl poté převeden do vialky s inzertem a analyzován GC/MS.

2.6. Ověření funkčnosti metody

Připravená metoda byla ověřena pomocí připravených 1ml lokálních kontrol (Low a High), jejichž složení je uvedeno v tabulce 2. Následovala úprava a derivatizace vzorku, viz kapitola 2.5. Úprava vzorku a derivatizace (od druhé věty).

Tabulka 2 Složení lokálních kontrol

	Low	High
THC	4 ng/ml	23,5 ng/ml
OH-THC	4 ng/ml	23,5 ng/ml
THC-COOH	25 ng/ml	140 ng/ml
CBD	7 ng/ml	15 ng/ml
HHC	7 ng/ml	15 ng/ml
THC-D3	2 ng/ml	15 ng/ml
OH-THC-D3	2 ng/ml	15 ng/ml
THC-COOH-D9	2 ng/ml	15 ng/ml

2.7. Kalibrační řada

Body kalibrační řady byly připraveny umělým obohacením 1 ml směsného séra. Připravované koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3. Všechny body kalibrační řady byly připraveny třikrát a každý byl dvakrát změřen. Následovala úprava a derivatizace vzorku, viz kapitola 2.5. Úprava vzorku a derivatizace.

Tabulka 3 Kalibrační řada

Kalibrační řada	Koncentrace THC, CBD, HHC, OH-THC	Přidaný objem THC, CBD, HHC, OH-THC	Koncentrace THC-COOH	Přidaný objem THC-COOH
1.	1 ng/ml	1 µl z roztoku o koncentraci 1 µg/ml	5 ng/ml	5 µl z roztoku o koncentraci 1 µg/ml
2.	2 ng/ml	2 µl z roztoku o koncentraci 1 µg/ml	10 ng/ml	10 µl z roztoku o koncentraci 1 µg/ml
3.	7 ng/ml	7 µl z roztoku o koncentraci 1 µg/ml	50 ng/ml	5 µl z roztoku o koncentraci 10 µg/ml
4.	15 ng/ml	15 µl z roztoku o koncentraci 1 µg/ml	100 ng/ml	10 µl z roztoku o koncentraci 10 µg/ml
5.	20 ng/ml	2 µl z roztoku o koncentraci 10 µg/ml	150 ng/ml	15 µl z roztoku o koncentraci 10 µg/ml
6.	30 ng/ml	3 µl z roztoku o koncentraci 10 µg/ml	200 ng/ml	20 µl z roztoku o koncentraci 10 µg/ml

2.8. Selektivita

K ověření selektivity byl použit 1 ml směsného séra s přidanými drogami (vše Lipomed, Německo):

- 500 ng/ml: amfetaminu, metamfetaminu, 3,4-methylendioxyamfetaminu, 3,4-methylendioxyethylamfetaminu, 3,4-methylendioxymethamfetaminu,

methylen-dioxy-ethylamfetaminu, parametoxyamfetaminu, 4-methoxyamfetaminu a fenterminu

- 100 ng/ml: kodeinu, morfinu, dihydrokodeinu, methadonu, oxykodonu, miscalinu, kokainu a benzoylekgoninu
- 10 ng/ml: fentanylu, buprenorfinu a G-MAS.

Následovala úprava a derivatizace vzorku viz kapitola 2.5. Úprava vzorku a derivatizace.

2.9. Specificita

Pro ověření specificity byly použity tyto vzorky: šestkrát směsné sérum, dvakrát hemolytické sérum, jedenkrát mrtvolné sérum a jedenkrát mrtvolná plná krev. Vzorky byly upraveny a derivatizovány dle popisu uvedeného v kapitole 2.5. Úprava vzorku a derivatizace, ale bez přídavku směsi vnitřních standardů.

2.10. Opakovatelnost

Každý uměle vytvořený vzorek byl připraven čtyřikrát a analyzován dvakrát. 1 ml směsného séra byl obohacen o roztoky standardů, aby byla získána potřebná koncentrace analytu v matrici, viz tabulka 4. Následuje úprava a derivatizace vzorku viz kapitola 2.5. Úprava vzorku a derivatizace.

Tabulka 4 Koncentrace standardů pro opakovatelnost a mezilehlou preciznost

Uměle připravené vzorky	Koncentrace CBD, HHC, OH-THC	Koncentrace THC-COOH
1.	1 ng/ml	5 ng/ml
2.	2 ng/ml	10 ng/ml
3.	10 ng/ml	80 ng/ml
4.	20 ng/ml	150 ng/ml

2.11. Mezilehlá preciznost

Celá sada uměle připravených vzorků byla chystána 12 pracovních dnů po sobě a změřena pouze jednou. 1 ml směsného séra byl obohacen o roztoky standardů, aby byla získána potřebná koncentrace analytu v matrici, viz tabulka 4. Následovala úprava a deprivatizace vzorku, viz kapitola 2.5. Úprava vzorku a derivatizace.

2.12. Linearita

1 ml směsného séra byl obohacen o roztoky standardů, aby byla získána potřebná koncentrace analytu v matrici viz tabulka 5. Následovala úprava a deprivatizace vzorku, viz kapitola 2.5. Úprava vzorku a derivatizace.

Tabulka 5 Koncentrace vzorků pro měření linearity

Uměle připravené vzorky	Koncentrace CBD, HHC, OH-THC	Koncentrace THC-COOH
1.	30 ng/ml	250 ng/ml
2.	50 ng/ml	350 ng/ml
3.	80 ng/ml	400 ng/ml

2.13. Reálný vzorek

Reálný vzorek byl připraven podle kapitoly 2.5. Úprava vzorku a derivatizace.

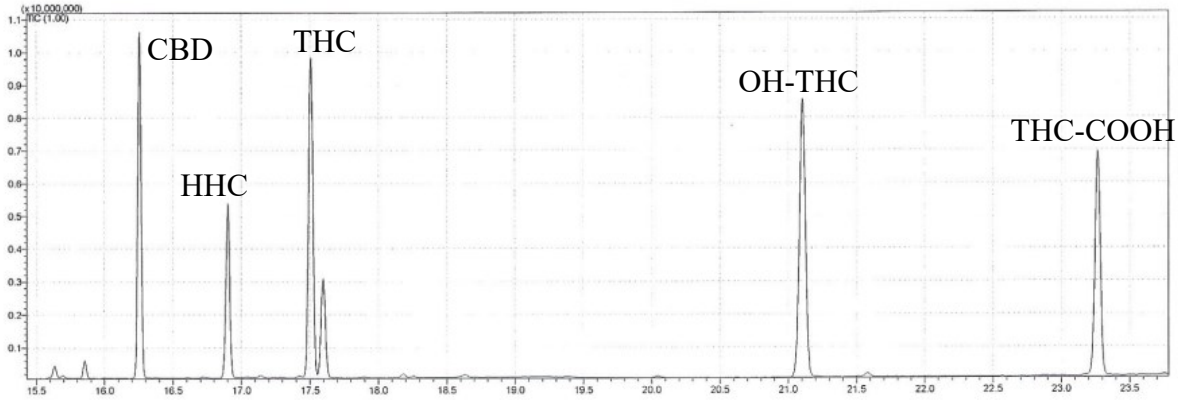
Pozn.:

Všechny roztoky drog a uměle připravené vzorky byly připraveny Mgr. Petrou Boguschovu z Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Pardubické nemocnice.

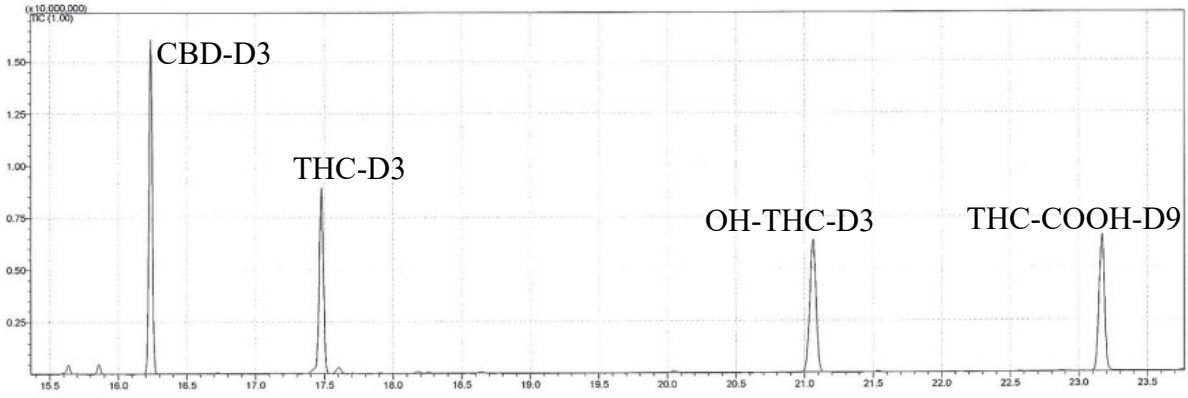
3. Výsledky a diskuze

3.1. Identifikace analytu

Podle knihoven spekter byly jednotlivé analyty identifikovány. Z obrázku 21 a 22 je patrné, že standardy a jejich vnitřními standardy byly eluovány v pořadí CBD-D3 (16,237 min), CBD (16,257 min), HHC (16,897 min), THC-D3 (17,480 min), THC (17,507 min), OH-THC-D3 (21,063 min), OH-THC (21,103 min), THC-COOH-D9 (23,173 min) a THC-COOH (23,267 min).



Obrázek 21 Identifikace standardů kanabinoidů



Obrázek 22 Identifikace vnitřních standardů kanabinoidů

3.2. Optimalizace metody

Pro jednotlivé analyty byly vybrány specifické ionty s vysokou intenzitou odezvy, u kterých byly vybrány MRM přechody. U MRM přechodů bylo zajištěno, aby poskytovaly nejvyšší odezvu. Přehled jednotlivých kolizních energií a přechodů iontů uvádí tabulka 6.

Tabulka 6 Kolizní energie pro vybrané ionty analytů

Analyt	Primární iont		Referentní iont (1)		Referentní iont (2)	
	m/z	Kolizní energie	m/z	Kolizní energie	m/z	Kolizní energie
CBD-D3	393,00>73,10	33	340,00>73,10	33	304,00>73,10	24
CBD	390,00>73,10	33	301,00>73,20	33	390,00>301,20	12
HHC	332,00>208,20	15	265,00>249,20	15	265,00>73,10	18
THC-D3	389,00>374,20	15	389,00>315,20	15	389,00>73,10	33
THC	386,00>371,20	12	386,00>315,20	15	386,00>73,20	33
THC-OH-D3	374,00>249,00	33	374,00>67,00	24	374,00>306,00	24
THC-OH	371,00>249,00	33	371,00>260,00	30	371,00>289,00	21
THC-COOH-D9	380,00>73,00	36	479,00>197,00	15	479,00>361,00	24
THC-COOH	371,00>73,30	36	473,00>355,20	36	473,00>73,20	36

3.3. Ověření funkčnosti metody

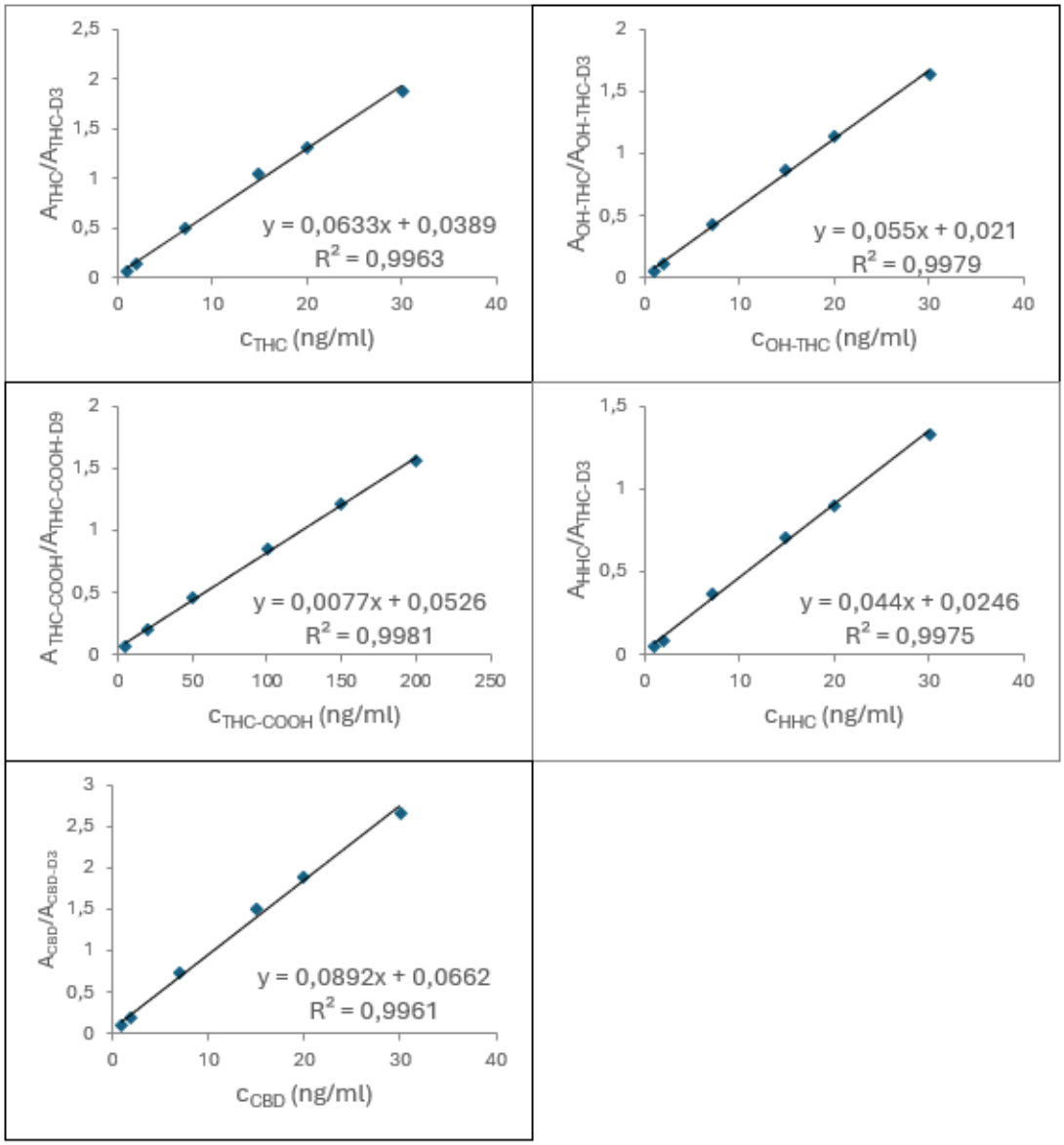
Při ověření funkčnosti metody bylo zkoumáno, zda je analyt identifikovatelný i v biologické matrici (séru). Bylo zjištěno, že v některých případech se k analytu automaticky nepřiřadí jeho identifikace, tudíž je třeba pokaždé zkontrolovat správnost identifikace.

3.4. Kalibrační řada a linearita

Metoda byla validována v rozsahu od 1 ng/ml do 30 ng/ml pro THC, CBD, OH-THC a HHC. Lineární rozsah byla prokázán pouze do 50 ng/ml; při koncentracích, než je právě 50 ng/ml, docházelo ke stáčení kalibrační křivky. Pro THC-COOH byla metoda validována v rozsahu od 5 ng/ml do 250 ng/ml. Koncentrace nad 250 ng/ml nebylo možné stanovit v důsledku přehlcení detektoru. Kalibrační řady byly počítány na základě poměru plochy píku analytu ku ploše jeho vnitřního standardu v závislosti na koncentraci, viz obrázek 23. Žádná z přímek nebyla prokládána počátkem. V tabulce 7 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty jednotlivých analytů; chyba stanovení, která byla byla vypočtena podílem směrodatné odchylky na průměrné koncentraci. Požadovaným kritériem pro nejnižší bod kalibrační křivky bylo maximální 20% chyba měření a pro ostatní koncentrace analytů byla maximální přípustná chyba 15%. Toto kritérium bylo splněno.

Tabulka 7 Vypočtené hodnoty chyby stanovení kalibrační řady (n=6)

koncentrace CBD, HHC, THC, OH-THC (ng/ml)	koncentrace THC-COOH (ng/ml)	průměrná naměřená hodnota (ng/ml)					chyba stanovení v %				
		CBD	HHC	THC	OH-THC	THC-COOH	CBD	HHC	THC	OH-THC	THC-COOH
1	5	1,19	1,11	1,08	0,89	7,50	7,98	4,95	3,70	6,18	16,67
2	20	2,16	1,99	2,15	1,96	25,00	3,70	0,25	3,49	1,02	10,00
7	50	7,90	8,19	7,68	7,86	57,50	5,70	7,26	4,43	5,47	6,52
15	100	16,13	15,71	16,28	15,54	106,25	3,50	2,26	3,93	1,74	2,94
20	150	20,45	19,91	20,28	20,36	151,25	1,10	0,23	0,69	0,88	0,41
30	200	28,90	29,42	29,03	29,26	195,00	1,90	0,99	1,67	1,26	1,28



Obrázek 23 Grafy kalibračních řad analytů s regresními rovnicemi a spolehlivostí kalibrace

Porovnání námi naměřené linearity s týmem vedeným Di Tranem se jedná o výrazně kratší linearitu, jelikož tento tým dosáhl linearity po hodnotu 500 ng/ml pro HHC. Při porovnání s týmem F. Stefanelliho bylo námi dosaženo vyšší linearity, jelikož tento tým dosáhl linearity pouze do 20 ng/ml pro THC, 50 ng/ml pro OH-THC a 100 ng/ml pro THC-COOH. Skupina vedená Kobidzem dosáhla obdobných výsledků pro HHC.[36, 75, 77]

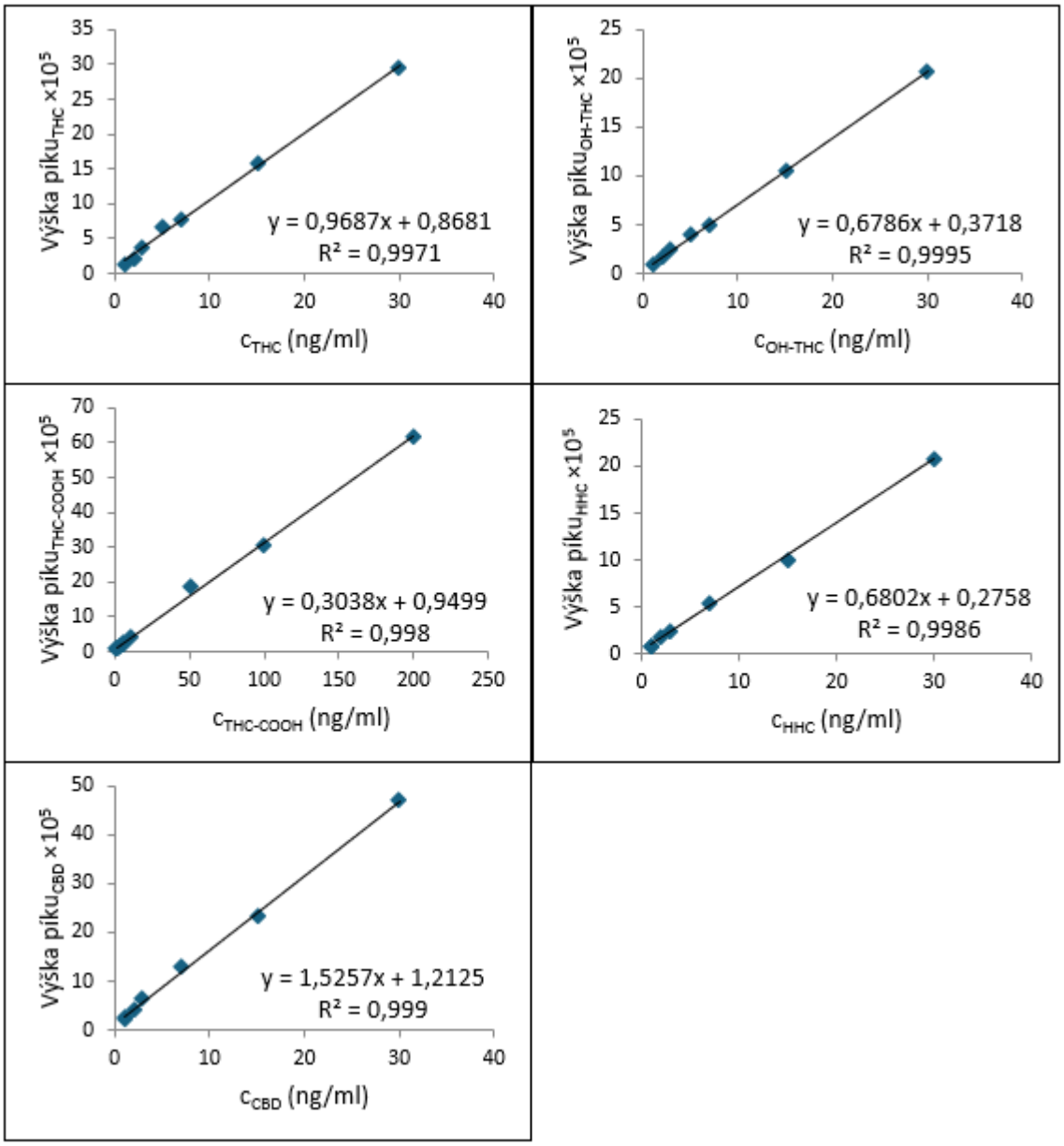
3.5. Selektivita a specificita

V retenčních časech sledovaných analytů, ani v retenčních časech vnitřních standardů nebyla zjištěna interference. Selektivit byly ověřena testováním referenční směsi standardů, jak strukturně podobných, tak rozdílných (uvedeno v kapitole 2.8.). Vzhledem k tomu, že nebyly detekovány žádné interferenty v retenčních časech stanovovaných analytů ani vnitřních standardů, pak tato metoda může být považována za spolehlivou a citlivou pro detekci THC, THC-OH, THC-COOH, CBD a HHC v lidském séru.

3.6. Limity detekce a kvantifikace

Mez kvantifikace byla u všech analytů zvolena jako nejnižší bod kalibrační řady. Mez detekce jednotlivých analytů byla vypočtena dosazením trojnásobku výšky šumu do rovnice, která je uvedena na obrázku 24. LOD byla vypočtena jako 0,24 ng/ml pro THC, 0,10 ng/ml pro OH-THC, 0,04 ng/ml pro THC-COOH, 0,39 ng/ml pro CBD a 0,08 ng/ml pro HHC.

Oproti práci týmu vedeného Freiem se v námi validované metodě dosáhlo vyšších hodnot LOQ pro všechny analyty, jelikož s ohledem na legislativu není třeba mít citlivější metodu než je nejnižší hodnota koncentrace kalibrační závislosti. V námi validované metodě bylo dosaženo stejných nebo podobných hodnot jako u týmu vedeným Di Tranem, Hubbardem. Námi validovaná metoda dosáhla oproti týmu F. Stefanellina nižších hodnot LOQ pro THC-COOH, ale vyšších hodnot LOQ pro THC a OH-THC. Týmu Kobidzeho se podařilo získat výrazně nižších hodnot LOQ pro HHC než u námi validované metody. [36, 75, 76, 77, 79]



Obrázek 24 Grafy pro výpočet LOD19

3.7. Opakovatelnost a mezilehlá preciznost

Opakovatelností a mezilehlou precizností byla zjišťována přesnost a shoda měření v závislosti na čase. V tabulce 8 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty jednotlivých analytů; chyba stanovení byla vypočtena podílem směrodatné odchylky na průměrné koncentraci. Požadovaným kritériem pro nejnižší bod kalibrační křivky bylo maximální 20% chyba měření a pro ostatní koncentrace analytů byla maximální přípustná chyba 15%. Toto kritérium bylo splněno.

V porovnání se všemi výše zmíněnými pracemi na téma stanovení kanabinoidů bylo získáno podobných chyb měření.

Tabulka 8 Vypočtené hodnoty pro opakovatelnost, mezilehlou preciznost

Analyt	koncentrace (ng/ml)	opakovatelnost (n=8)		mezilehlá preciznost (n=12)	
		průměrná naměřená hodnota (ng/ml)	chyba stanovení v %	průměrná naměřená hodnota (ng/ml)	chyba stanovení v %
CBD	1	1,17	6,37	1,28	9,46
	2	2,13	1,65	2,41	7,21
	10	11,31	1,67	11,51	5,62
	20	21,30	1,39	19,19	5,99
HHC	1	0,94	7,01	1,09	11,28
	2	2,01	4,57	2,20	6,37
	10	11,21	2,74	11,55	5,49
	20	21,8	2,08	19,48	4,77
THC	1	1,01	6,35	1,01	9,35
	2	2,01	7,16	2,04	7,47
	10	10,48	2,44	10,43	5,19
	20	19,98	2,35	18,86	5,56
OH-THC	1	1,01	4,75	1,08	12,21
	2	1,96	4,62	2,15	6,58
	10	10,62	2,30	10,7	4,55
	20	20,51	1,33	19,46	5,64
THC-COOH	5	5,55	4,98	6,14	5,98
	10	10,90	2,55	11,28	6,60
	80	77,96	3,59	75,06	5,95
	150	130,77	2,19	142,53	7,28

3.8. Reálný vzorek

U jednoho z pacientů užívajícího želatinové medvídky obsahující SK byl stanoven obsah 22,10 ng/ml HHC a u druhého pacienta byla výsledná koncentrace v séru 76,07 ng/ml HHC. Vzhledem k tomu, že stanovená koncentrace u druhého pacienta přesahovala rozsah validované metody pro HHC bylo potřeba vzorek 10x naředit a znovu vyhodnotit jeho koncentraci.

Podle dohody odborné společnosti se výsledky reálných vzorků uvádějí bez nejistot, kvůli jednoznačnosti výsledku.

4. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout spolehlivou metodu pro stanovení vybraných přírodních a syntetických kanabinoidů a jejich metabolitů (THC, OH-THC, THC-COOH, CBD a HHC) v lidském séru a následně tuto metodu částečně validovat. Tato nová metoda by měla zcela nahradit a vylepšit původní metodu využívanou v toxikologické laboratoři pro Oddělení soudního lékařství a Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Nemocnice Pardubického kraje, a. s. Původní metoda byla validována pouze pro stanovení THC, ale novou metodou je možné stanovit také sérové koncentrace OH-THC, THC-COOH, CBD a HHC. Bylo ověřeno, že obě metody poskytují podobné výsledky a nová metoda je vhodná pro zavedení do klinické praxe.

Metoda byla následně podrobena základní validaci dle směrnice Evropské lékové agentury. Metoda splnila všechna zkoumaná kritéria směrnice v oblastech: kalibrační závislost a linearitu, opakovatelnost a mezilehlá preciznost, selektivita a specifita. Díky těmto kladným výsledkům mohla být metoda aplikována i na reálný vzorek.

Použitá literatura:

[1] G. A. THAKUR, R. I. DUCLOS a A. MAKRIYANNIS, 2005. Natural cannabinoids: Templates for drug discovery: Templates for drug discovery. *Life Sciences* [online]. **78**(5), 454–466. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2005.09.014. [cit. 2025-04-02].

[2] R. C. LYNCH, D. VERGARA, S. TITTES, a kol., 2016. Genomic and Chemical Diversity in Cannabis. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. 2016-11-01, **35**(5-6), 349–363. ISSN 0735-2689. Dostupné z: doi:10.1080/07352689.2016.1265363. [cit. 2025-04-02].

[3] B. MILLS, A. YEPES a K. NUGENT, 2015. Synthetic Cannabinoids. *The American Journal of the Medical Sciences* [online]. **350**(1), 59–62. ISSN 00029629. Dostupné z: doi:10.1097/MAJ.0000000000000466. [cit. 2025-04-02].

[4] T. Y. KONG, J.-H. KIM, D. K. KIM a H. S. LEE, 2018. Synthetic cannabinoids are substrates and inhibitors of multiple drug-metabolizing enzymes. *Archives of Pharmacal Research* [online]. **41**(7), 691–710. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-018-1055-x. [cit. 2025-04-02].

[5] M. A. ELSOHLY, W. GUL, A. S. WANAS a M. M. RADWAN, 2014. Synthetic cannabinoids: Analysis and metabolites. *Life Sciences* [online]. **97**(1), 78–90. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2013.12.212. [cit. 2025-04-02].

[6] M. M. RADWAN, A. S. WANAS, S. CHANDRA a M. A. ELSOHLY, 2017. Natural Cannabinoids of Cannabis and Methods of Analysis. *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017-05-24, 161–182. ISBN 978-3-319-54563-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-54564-6_7. [cit. 2025-04-02].

[7] L. O. HANUŠ, S. M. MEYER, E. MUÑOZ, O. TAGLIALATELA-SCAFATI a G. APPENDINO, 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports* [online]. **33**(12), 1357–1392. ISSN 0265-0568. Dostupné z: doi:10.1039/C6NP00074F. [cit. 2025-04-02].

[8] M. B. BRIDGEMAN a D. T. ABAZIA, 2017. Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *Pharmacy and Therapeutics* [online]. **42**(3), 180–188. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0089566. [cit. 2025-04-02].

[9] T. KRATINA, H. TOŠNAROVÁ a M. MATĚCHA, 2021. VÝVOJ LEGALIZACE KONOPÍ VE SPOJENÝCH STÁTECH AMERICKÝCH. *Bulletin Národní protidrogové*

centrály [online]. 20–41 [cit. 2025-03-23]. ISSN 1211-8834. Dostupné z: https://www.tmv.cz/wp-content/uploads/2021/09/Vyvoj_legalizace_konopi_ve_Spojenych_statech_americkych.pdf. [cit. 2025-04-02].

[10] R. MECHOULAM, L. O. HANUŠ, R. PERTWEE a A. C. HOWLETT, 2014. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. **15**(11), 757–764. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn3811. [cit. 2025-04-02].

[11] Ch. MAIOLI, D. MATTOTEIA, H. I. M. AMIN, A. MINASSI a D. CAPRIOGLIO, 2022. Cannabinol: History, Syntheses, and Biological Profile of the Greatest "Minor" Cannabinoid. *Plants* [online]. **11**(21). ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11212896. [cit. 2025-04-02].

[12] S. BURSTEIN, 2015. *Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation* [online]. **23**(7), 1377–1385. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2015.01.059. [cit. 2025-04-02].

[13] E. A. CARLINI, 2004. The good and the bad effects of (−) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) on humans. *Toxicon* [online]. **44**(4), 461–467. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.009. [cit. 2025-04-02].

[14] A. JASTRZĄB, I. JAROCKA-KARPOWICZ a E. SKRZYDLEWSKA, 2022. The Origin and Biomedical Relevance of Cannabigerol. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(14). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23147929. [cit. 2025-04-02].

[15] Y. GAONI a R. MECHOULAM, 1966. Cannabichromene, a new active principle in hashish. *Chemical Communications (London)* [online]. (1). ISSN 0009-241X. Dostupné z: doi:10.1039/c19660000020. [cit. 2025-04-02].

[16] J. CASTILLO-ARELLANO, A. CANSECO-ALBA, S. J. CUTLER a F. LEÓN, 2023. The Polypharmacological Effects of Cannabidiol. *Molecules* [online]. **28**(7). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28073271. [cit. 2025-04-02].

[17] E. M. WILLIAMSON a F. J. EVANS, 2000. Cannabinoids in Clinical Practice. *Drugs* [online]. **60**(6), 1303–1314. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200060060-00005. [cit. 2025-04-02].

[18] S. BHATTACHARYYA, P. D. MORRISON, P. FUSAR-POLI, a kol., 2010. Opposite Effects of Δ-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Human Brain Function and Psychopathology. *Neuropsychopharmacology* [online]. **35**(3), 764–774. ISSN 0893-133X. Dostupné z: doi:10.1038/npp.2009.184. [cit. 2025-04-02].

[19] V. RUBIN, 1975. Konopí a kultura. In: *Konopí a kultura* [online]. Společnost De Gruyter Mouton, s. 27 . Dostupné z: www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110812060/pdf?licenseType=. [cit. 2025-04-02].

[20] Samice a samec konopí.jpg (300 x 300), 2025. In: *Weedshop Obchod pro pravé kuřáky* [online]. [cit. 2025-03-23]. Dostupné z: https://www.weedshop.cz/blog/ctyri-zpusoby-jak-vyuzit-samci-rostlinu-konopi/. [cit. 2025-04-02].

[21] B. LAW, P. A. MASON, A. C. MOFFAT, R. I. GLEADLE a L. J. KING, 1984. Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 1984-05-12, **36**(5), 289–294. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/j.2042-7158.1984.tb04376.x. [cit. 2025-04-02].

[22] S. AGURELL, M. HALLDIN, J. E. LINDGREN, A. OHLSSON, M. WIDMAN, H. GILLESPIE a L. HOLLISTER, 1989. Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacological Reviews* [online]. **38**(1), 21–43. ISBN 978-1-4899-3495-6. ISSN 1521-0081. Dostupné také z: https://pharmrev.aspetjournals.org/content/38/1/21. [cit. 2025-04-02].

[23] A. OHLSSON, J.-E. LINDGREN, S. ANDERSSON, S. AGURELL, H. GILLESPIE a L. E. HOLLISTER, 1986. Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biological Mass Spectrometry* [online]. **13**(2), 77–83. ISSN 1052-9306. Dostupné z: doi:10.1002/bms.1200130206. [cit. 2025-04-02].

[24] D. R. KRISHNA a U. KLOTZ, 1994. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. **26**(2), 144–160. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-199426020-00007. [cit. 2025-04-02].

[25] M. E. WALL, B. M. SADLER, D. BRINE, H. TAYLOR a M. PEREZ-REYES, 1983. Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* [online]. **34**(3), 352–363. ISSN 0009-9236. Dostupné z: doi:10.1038/clpt.1983.179. [cit. 2025-04-02].

[26] E. CHESNEY, D. OLIVER, A. GREEN, S. SOVI, J. WILSON, A. ENGLUND, T. P. FREEMAN a P. MCGUIRE, 2020. Adverse effects of cannabidiol: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology* [online]. **45**(11), 1799–1806. ISSN 0893-133X. Dostupné z: doi:10.1038/s41386-020-0667-2. [cit. 2025-04-02].

[27] D. J. HARVEY a R. MECHOULAM, 2009. Metabolites of cannabidiol identified in human urine. *Xenobiotica* [online]. 2009-08-27, **20**(3), 303–320. ISSN 0049-8254. Dostupné z: doi:10.3109/00498259009046849. [cit. 2025-04-02].

[28] L. L. ANDERSON, A. AMETOVSKI, J. LIN LUO, D. EVERETT-MORGAN, I. S. MCGREGOR, S. D. BANISTER a J. C. ARNOLD, 2021. Cannabichromene, Related Phytocannabinoids, and 5-Fluoro-cannabichromene Have Anticonvulsant Properties in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *ACS Chemical Neuroscience* [online]. 2021-01-20, **12**(2), 330–339. ISSN 1948-7193. Dostupné z: doi:10.1021/acschemneuro.0c00677. [cit. 2025-04-02].

[29] V. ŠUBRTOVÁ, 2021. *Fyziologické účinky kanabinoidů a jejich analytické stanovení* [online]. Pardubice. Dostupné z: https://dk.upce.cz/server/api/core/bitstreams/912b4476-6f14-43c1-aadd-ef562284528a/content. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. [cit. 2025-04-02].

[30] M. S. CASTANETO, D. A. GORELICK, N. A. DESROSIERS, R. L. HARTMAN, S. PIRARD a M. A. HUESTIS, 2014. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence* [online]. **144**, 12–41. ISSN 03768716. Dostupné z: doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.08.005. [cit. 2025-04-02].

[31] X. DIAO a M. A. HUESTIS, 2019. New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2019-3-4, **7**. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2019.00109. [cit. 2025-04-02].

[32] M. B. FORRESTER, K. KLEINSCHMIDT, E. SCHWARZ a A. YOUNG, 2012. *Synthetic cannabinoid and marijuana exposures reported to poison centers* [online]. **31**(10), 1006–1011. ISSN 0960-3271. Dostupné z: doi:10.1177/0960327111421945. [cit. 2025-04-02].

[33] D. J. NASRALLAH a N. K. GARG, 2023. Studies Pertaining to the Emerging Cannabinoid Hexahydrocannabinol (HHC). *ACS Chemical Biology* [online]. 2023-09-15, **18**(9), 2023–2029. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/acschembio.3c00254. [cit. 2025-04-02].

[34] W. SCHIRMER, V. AUWÄRTER, J. KAUDEWITZ, S. SCHÜRCH a W. WEINMANN, 2023. Identification of human hexahydrocannabinol metabolites in urine. *European Journal of Mass Spectrometry* [online]. **29**(5-6), 326–337. ISSN 1469-0667. Dostupné z: doi:10.1177/14690667231200139. [cit. 2025-04-02].

[35] S. GRAZIANO, M. R. VARÌ, S. PICHINI, F. P. BUSARDO, T. CASSANO a A. DI TRANA, 2023. Hexahydrocannabinol Pharmacology, Toxicology, and Analysis Evidence for a Recent New Psychoactive Substance: The First Evidence for a Recent New Psychoactive Substance. *Current Neuropharmacology* [online]. **21**(12), 2424–2430. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X21666230623104624. [cit. 2025-04-02].

[36] G. KOBIDZE, G. SPREGA, E. MONTANARI, a kol., 2024. The first LC-MS/MS stereoselective bioanalytical methods to quantitatively detect 9R- and 9S-hexahydrocannabinols and their metabolites in human blood, oral fluid and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **240**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2023.115918. [cit. 2025-04-02].

[37] P. S. D'AQUILA, 2020. Microstructure analysis of the effects of the cannabinoid agents HU-210 and rimonabant in rats licking for sucrose. *European Journal of Pharmacology* [online]. **887**. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2020.173468. [cit. 2025-04-02].

[38] L. HRUBÁ a L. R. MCMAHON, 2014. The cannabinoid agonist HU-210: Pseudo-irreversible discriminative stimulus effects in rhesus monkeys. *European Journal of Pharmacology* [online]. **727**, 35–42. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2014.01.041. [cit. 2025-04-02].

[39] W. SHAO, P. LIAO, X. ZHANG, B. FAN, R. CHEN, X. CHEN, X. ZHAO a W. LIU, 2024. Syntheses of Cannabinoid Metabolites: Ajulemic Acid and HU-210. *Molecules* [online]. **29**(2), 526. Dostupné z: doi:10.3390/molecules29020526. [cit. 2025-04-02].

[40] N. PINTORI, R. MOSTALLINO, E. SPANO, V. ORRÙ, M. G. PIRAS, M. P. CASTELLI a M. A. DE LUCA, 2024. Immune and glial cell alterations in the rat brain after repeated exposure to the synthetic cannabinoid JWH-018. *Journal of Neuroimmunology* [online]. **389**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneuroim.2024.578325. [cit. 2025-04-02].

[41] A. ALZU'BI, E. ABU-EL-RUB, F. ALMAHASNEH, a kol., 2024. Delineating the molecular mechanisms of hippocampal neurotoxicity induced by chronic administration of

synthetic cannabinoid AB-FUBINACA in mice. *NeuroToxicology* [online]. **103**, 50–59. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2024.05.009. [cit. 2025-04-02].

[42] Z. D. COOPER, 2016. Adverse Effects of Synthetic Cannabinoids: Management of Acute Toxicity and Withdrawal. *Curr Psychiatry Rep.* [online]. **18**(5), 52. Dostupné z: doi:10.1007/s11920-016-0694-1. [cit. 2025-04-02].

[43] K. MACKIE, 2008. Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. *Journal of Neuroendocrinology* [online]. **20**(1), 10–14. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01671.x . [cit. 2025-04-02].

[44] J. LIU, L. WANG, J. HARVEY-WHITE, a kol., 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Biochemistry* [online]. **103**(36), 13345–13350. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0601832103. [cit. 2025-04-02].

[45] V. DI MARZO, T. BISOGNO a L. DE PETROCELLIS, 2001. Anandamide: some like it hot. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. **22**(7), 346–349. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-6147(00)01712-0. [cit. 2025-04-02].

[46] L. HANUŠ, A. GOPHER, Š. ALMOG a R. MECHOULAM, 1993. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **36**(20), 3032–3034. Dostupné z: doi:10.1021/jm00072a026. [cit. 2025-04-02].

[47] R. MECHOULAM, S. BEN-SHABAT, L. HANUŠ, a kol., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology* [online]. **50**(1), 83–90. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(95)00109-D. [cit. 2025-04-02].

[48] L. HANUŠ, S. ABU-LAFI, E. FRIDE, A. BREUER, Z. VOGEL, D. E. SHALEV, I. KUSTANOVICH a R. MECHOULAM, 2001. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Chemistry* [online]. **98**(7), 3662–3665. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.061029898. [cit. 2025-04-02].

[49] A. C. PORTER, J.-M. SAUER, M. D. KNIERMAN, a kol., 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* [online]. **301**(3). Dostupné z: doi:10.1124/jpet.301.3.1020. [cit. 2025-04-02].

[50] R. G. PERTWEE, 2007. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* [online]. **153**(2), 199–215. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0707442. [cit. 2025-04-02].

[51] A. J. BROWN, 2009. Novel cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology* [online]. **152**(5), 567–575. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjp.0707481. [cit. 2025-04-02].

[52] L. NOVÁKOVÁ a H. VLČKOVÁ, 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* [online]. **656**(1-2), 8–35. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.10.004. [cit. 2025-04-02].

[53] K. D. CLARK, Ch. ZHANG a J. L. ANDERSON, 2016. Sample Preparation for Bioanalytical and Pharmaceutical Analysis. *Analytic Chemistry* [online]. **88**(23), 11262–11270. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b02935. [cit. 2025-04-02].

[54] R. F. VENN, 2008. *Principles and practise od bioanalysis*. 2. CRC Press. ISBN 978-1-4200-0560-8. [cit. 2025-04-02].

[55] P. KLOUDA, 2016. *Moderní analytické metody*. 3. Pavel Klouda. ISBN 80-86369-22-6. [cit. 2025-04-02].

[56] S. MITRA, 2003. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley. ISBN 0-471-32845-6. [cit. 2025-04-02].

[57] L. NOVÁKOVÁ a M. DOUŠA, 2021. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1–2. Česká chromatografická škola. ISBN 978-80-270-8559-0. [cit. 2025-04-02].

[58] Introduction to Liquid Chromatography Principles, 2020. *Bio-Rad Laboratories, Inc.* [online]. Dostupné také z: https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-liquid-chromatography-principles?ID=MWHAS7E8Z. [cit. 2025-04-02].

[59] P. N. NESTERENKO a M. D. PALAMAREVA, 2018. Liquid Chromatography: Overview. *Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. ISSN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14214-3. [cit. 2025-04-02].

[60] T-K. T. LAM, J. K. LANMAN, M. R. EMMETT, Ch. L. HENDRICKSON, A. G. MARSHALL a P. E. PREVELIGE, 2002. Mapping of protein:protein contact surfaces by

hydrogen/deuterium exchange, followed by on-line high-performance liquid chromatography–electrospray ionization fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. **982**(1), 85–95. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)01357-2. [cit. 2025-04-02].

[61] P. A. SEWELL, 2000. CHROMATOGRAPHY: GAS | Theory of Gas Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science* [online]. 558–566. Dostupné z: doi:10.1016/B0- 12-226770-2/00121-6. [cit. 2025-04-02].

[62] P. HUŠEK, CHROMATOGRAPHY: GAS | Derivatization. Encyclopedia of Separation Science. Elsevier, 2000, 2000, s. 434–444. DOI: 10.1016/B0-12-226770-2/00201-5. ISBN 9780122267703. [cit. 2025-04-02].

[63] M. HOLČAPEK. Hmotnostní spektrometrie. Katedra obecné a anorganické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice [online]. [cit. 2025-04-02].

[64] E. DE HOFFMANN a V. STROOBANT. Mass spectrometry: principles and applications. 3, Wiley, Chichester 2007. ISBN 9780470033104. [cit. 2025-04-02].

[65] Portrayal ranges of different ionization techniques in the discovery of biomarkers of various molecular weights and polarity., 2020. In: *ResearchGate* [online]. Dostupné také z: https://www.researchgate.net/figure/Portrayal-ranges-of-different-ionization-techniques-in-the-discovery-of-biomarkers-of_fig1_338930172. [cit. 2025-04-02].

[66] C. DASS, Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Wiley, New Jersey 2007. ISBN: 9780471682295. [cit. 2025-04-02].

[67] C. S. HO, C. W. K. LAM, M. H. M. CHAN, a kol., 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev* [online]. **24**(1), 3-12. Dostupné také z: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1853331/. [cit. 2025-04-02].

[68]D. FRIEDECKÝ a K. LEMR, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* [online]. **20**(41), 152–157. Dostupné také z: https://stara.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf. [cit. 2025-04-02].

[69] R. JIRÁSKO. Hmotnostní analyzátory – 2. část [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko–technologická Univerzity Pardubice. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz. [cit. 2025-04-02].

[70] R. JIRÁSKO. Hmotnostní analyzátory – 1. část [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko–technologická Univerzity Pardubice. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz. [cit. 2025-04-02].

[71] A. SURAEV, D. MCCARTNEY, R. KEVIN, R. GORDON, R. R. GRUNSTEIN, C. M. HOYOS a I. S. MCGREGOR. Detection of Δ 9 -tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using two point-of-collection testing devices following oral administration of a THC and cannabidiol containing oil. *Drug Testing and Analysis* [online]. ISSN 1942-7603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.3658. [cit. 2025-04-02].

[72] R. AGIUS a T. NADULSKI, 2014. Užitečnost screeningu ELISA pro sledování abstinence od nelegálních a legálních drog ve vlasech a moči. *Testování a analýza léčiv* [online]. **6** (SI), 101–109. ISSN 1942-7603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.1644. [cit. 2025-04-02].

[73] G. MILMAN, A. J. BARNES, R. H. LOWE a M. A. HUESTIS, 2010. Simultánní kvantifikace kanabinoidů a metabolitů v ústní tekutině pomocí dvourozměrné hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií. *Journal of Chromatography A* [online]. **1217** (9), 1513–1521. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.12.053. [cit. 2025-04-02].

[74] J. J. PITT, 2009. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev* [online]. **30**(1), 19–34. Dostupné také z: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2643089/. [cit. 2025-04-02].

[75] F. STEFANELLI, F. G. PESCI, M. GIUSIANI a S. CHERICONI, 2018. A novel fast method for aqueous derivatization of THC, OH-THC and THC-COOH in human whole blood and urine samples for routine forensic analyses. *Biomedical Chromatography* [online]. **32**(4). ISSN 0269-3879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.4136. [cit. 2025-04-02].

[76] P. FREI, S. FRAUCHIGER, E. SCHEURER a K. MERCER-CHALMERS-BENDER, 2022. Quantitative determination of five cannabinoids in blood and urine by gas chromatography tandem mass spectrometry applying automated on-line solid phase extraction. *Drug Testing and Analysis* [online]. **14**(7), 1223–1233. ISSN 1942-7603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.3241. [cit. 2025-04-02].

[77] A. DI TRANA, G. SPREGA, G. KOBIDZE, a kol., 2024. QuEChERS Extraction and Simultaneous Quantification in GC-MS/MS of Hexahydrocannabinol Epimers and Their

Metabolites in Whole Blood, Urine, and Oral Fluid. *Molecules* [online]. **29**(14). Dostupné z: doi:10.3390/molecules29143440. [cit. 2025-04-02].

[78] Y. SHIN, J. Y. KIM, J. Ch. CHEONG, J.-H. KIM, J.-H. KIM a H. S. LEE, 2020. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the determination of three cannabinoids, two (−)-trans-Δ9-tetrahydrocannabinol metabolites, and six amphetamine-type stimulants in human hair. *Journal of Chromatography B* [online]. **1149**. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2020.122157. [cit. 2025-04-02].

[79] J. A. HUBBARD, B. E. SMITH, P. M. SOBOLESKY, a kol., 2020. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to detect cannabinoids in whole blood and breath. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2020-04-28, **58**(5), 673–681. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2019-0600. [cit. 2025-04-02].

[80] N. KORAĆ, D. VIDIC a D. SUTLOVIĆ, 2020. Modified QuEChERS extraction and GC-MS analysis of selected cannabinoids from human urine. *Glasnik hemicara i tehnologa Bosne i Hercegovine* [online]. 2020-6-30, (54), 37–44. ISSN 2232-7266. Dostupné z: doi:10.35666/ghtbh.2020.54.07. [cit. 2025-04-02].

[81] P. M. SOBOLESKY, B. E. SMITH, J. A. HUBBARD, J. STONE, T. D. MARCOTTE, D. J. GRELOTTI, I. GRANT a R. L. FITZGERALD, 2019. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analyzing cannabinoids in oral fluid. *Clinica Chimica Acta* [online]. **491**, 30–38. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2019.01.002. [cit. 2025-04-02].

[82] R. GORZIZA, J. COX, RP LIMBERGER a LE ARROYO-MORA, 2021. Studium extrakce Δ9-tetrahydrokanabinolu (THC) a kanabidiolu (CBD) ZE vysušených skvrn v orální tekutině (DOFS) a detekce LC–MS/MS. *Journal of Cannabis Research* [online]. **3** (1). ISSN 2522-5782. Dostupné z: doi:10.1186/s42238-021-00088-8. [cit. 2025-04-02].

[83] B. DARIŠ, M. TANCER VERBOTEN, Ž. KNEZ a P. FERK, 2019. Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation. *Bosn J Basic Med Sci* [online]. **19**(1), 14–23. Dostupné z: doi:10.17305/bjbms.2018.3532. [cit. 2025-04-02].

[84] K. DICKSON, C. JANASIE a K. L. WILLETT, 2021. CANNABINOID CONUNDRUM: A STUDY OF MARIJUANA AND HEMP LEGALITY IN THE UNITED STATES. *Arizona J*

Environ Law Policy [online]. **10**(20), 132–150. Dostupné také z: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8127630/. [cit. 2025-04-02].

[85] Zákon č. 321/2024 Sb., 2024. *E-Sbírka* [online]. Dostupné z: https://www.e-sbirka.cz/sb/2024/321?zalozka=text. [cit. 2025-04-02].

[86] P. BAJEROVÁ. *Validace*. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice. [cit. 2025-04-02].

[87] J. RACEK, J. EISELT, B. FRIEDECKÝ, a kol., 2006. In: *Klinická biochemie*. 2. Galén, s. 33–39. ISBN 80-7262-324-9. [cit. 2025-04-02].