

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra chemie**

Identifikace a charakterizace *in vitro* metabolitů (S)-kathinonu  
tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií

Bakalářská práce

Autor: Monika Mrňavá

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: S17CH044BP Toxikologie a analýza škodlivin

Vedoucí práce: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

## Zadání bakalářské práce

**Autor:** Monika Mrňavá

**Studium:** S17CH044BP

**Studijní program:** B1407 Chemie

**Studijní obor:** Toxikologie a analýza škodlivin

**Název bakalářské práce:** **Identifikace a charakterizace in vitro metabolitů kathinonu tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií**

**Název bakalářské práce AJ:** Identification and characterization of cathinone in vitro metabolites by tandem high-resolution mass spectrometry

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Kathinon je psychoaktivní alkaloid, který se vyskytuje v keři kata jedlá (*Catha edulis*), a jeho užívání je spojeno sympatomimetickým účinkem. Z biochemického pohledu náleží kathinon mezi stimulatory centrálního nervového systému, které zvyšují koncentraci katecholaminů v inter-synaptickém prostoru, a ve srovnání s amfetaminem vyvolává silnější efekt. Cílem bakalářské práce bude provést in vitro biotransformaci kathinonu pomocí lidských jaterních mikrosomů a s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem identifikovat a charakterizovat vzniklé metabolity.

Kalix P et al. Cathinone, a phenylpropanolamine alkaloid from khat leaves that has amphetamine effects in humus. *NIDA Res. Monogr.* 1991;105:259-290.

Guantai AN, Maitai CK. Metabolism of cathinone to d-norpseudoephedrine in humus. *J Pharmaceut.Sci* 1983;72:1217-1218.

**Garantující pracoviště:** Katedra chemie,  
Přírodovědecká fakulta

**Vedoucí práce:** doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

**Oponent:** prof. Ing. Antonín Lyčka, DrSc.

**Datum zadání závěrečné práce:** 27.6.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny parametry, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

22.7.2020

.....

Monika Mrňavá

## Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce **doc. Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D.** za odborné vedení, cenné rady, za pomoc během vypracování bakalářské práce, a za ochotu a čas věnovaný konzultacím. Dále bych ráda poděkovala Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové za poskytnutí laboratoří a veškerého vybavení při měření experimentálních dat. Na závěr bych také ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu a pomoc v době studia.

**Anotace:**

MRŇAVÁ, M. *Identifikace a charakterizace in vitro metabolitů (S)-kathinonu tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií*. Hradec Králové, 2020. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D. 75s.

Kathinon je psychoaktivní alkaloid, který se vyskytuje v keři kata jedlá (*Catha edulis*) a jeho užívání je spojeno se sympatomimetickým účinkem. Z biochemického pohledu náleží kathinon mezi stimulanty centrálního nervového systému, které zvyšují koncentraci katecholaminů v inter-synaptickém prostoru, a ve srovnání s amfetaminem vyvolává podobný efekt. Cílem bakalářské práce bude provést *in vitro* biotransformaci (S)-kathinonu pomocí lidských jaterních mikrosomů a s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem identifikovat a charakterizovat vzniklé metabolity

**Klíčová slova:** kathinon, biotransformace, LC-MS/MS, metabolismus

**Annotation:**

MRŇAVÁ, M. *Identification and characterization of in vitro metabolites of (S) - cathinone by tandem high resolution mass spectrometry*. Hradec Králové, 2020. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D. 75s.

Cathinone is a psychoactive alkaloid that occurs in the bush of catta (*Catha edulis*), and its use is associated with a sympathomimetic effect. Biochemically, cathinone is a central nervous system stimulator that increases the concentration of catecholamines in the inter-synaptic cleft and elicits a similar effect compared to amphetamine. The aim of this bachelor thesis will be to perform *in vitro* cathinone biotransformation using human liver microsomes and to identify and characterize the produced metabolites by means of high-performance liquid chromatography coupled with a high-resolution mass spectrometer.

**Keywords:** cathinone, biotransformation, LC-MS / MS, metabolism

# Obsah

Úvod .....	9
1 Teoretická část .....	10
1.1 Biotransformace léčiv .....	10
1.1.1 První fáze biotransformace .....	10
1.1.2 Druhá fáze biotransformace .....	13
1.1.3 Třetí fáze biotransformace .....	15
1.2 <i>In vitro</i> modely biotransformace .....	16
1.3 Princip a charakterizace chromatografické separace v LC .....	19
1.3.1 Princip LC .....	19
1.3.2 Instrumentace LC .....	19
1.3.3 Základní charakteristiky separačního procesu .....	21
1.4 Princip a základní typy hmotnostní spektrometrie .....	22
1.4.1 Princip metody .....	22
1.4.2 Základní typy skenů a chromatografických záznamů .....	25
1.5 Metody identifikace chemických struktur ve vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrii .....	27
1.6 Základní validační parametry pro analytické a bioanalytické metody .....	28
1.7 Metody vývoje necílené LC-MS analýzy <i>in vitro</i> metabolitů .....	30
1.8 Metody kvantifikace v LC-MS .....	31
1.9 Vlastnosti katinonu a jeho derivátů .....	32
1.9.1 Farmakologie a toxikologie katinonu .....	34
1.9.2 Mechanismus účinku katinonu .....	35
1.9.3 Využití katinonu .....	35
1.9.4 Deriváty katinonu .....	35
1.10 Současné poznatky o biotransformaci katinonu a jeho derivátů .....	37
1.10.1 Biotransformace katinonu .....	37
1.10.2 Biotransformace derivátů katinonu .....	39
2 Cíl a metodologie práce .....	40
3 Praktická část .....	41
3.1 Použité chemikálie .....	41
3.2 Použité přístroje, pomůcky a počítačové programy .....	41
3.2.1 Přístrojové vybavení .....	41
3.2.2 Pomůcky .....	42
3.2.3 Výpočetní programy .....	42
3.3 Použité chromatografické kolony .....	42
3.4 Příprava vzorků ( <i>S</i> )-katinonu a mikrosomálního prostředí .....	42

3.5	Biotransformační experimenty.....	42
3.6	Návrh a optimalizace LC-MS metody pro analýzu metabolitů katinonu .....	43
3.7	Identifikace a charakterizace metabolitů (S)-katinonu .....	45
3.7.1	LC-MS analýza roztoku (S)-katinonu v methanolu (c = 50 uM) .....	45
3.7.2	Biotransformační experimenty s katinonem v prostředí HLM.....	49
3.8	Stanovení stability katinonu v mikrosomální prostředí .....	57
4	Diskuze .....	62
	Závěr .....	67
	Seznam použité literatury .....	68
	Seznam zkratk.....	71
	Seznam obrázků .....	73
	Seznam tabulek .....	75



## Úvod

V této bakalářské práci jsem se věnovala studiu metabolitů (*S*)-2-amino-1-fenylpropan-1-onu neboli (*S*)-kathinonu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Biotransformační procesy *in vitro* v experimentální části byly provedené s lidskými jaterními mikrosomy s dobou inkubace jedna, čtyři a dvanáct hodin.

Téma této bakalářské práce jsem si vybrala z důvodu bližšího poznání (*S*)-kathinonu a jeho derivátů, dále pak z možnosti zapojení se do výzkumu ohledně (*S*)-kathinonu v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Díky této možnosti jsem si mohla vyzkoušet práci v analytické laboratoři a rozšířit své znalosti ohledně vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

Tato práce je rozdělená na dvě hlavní části, a to teoretickou a praktickou část. V teoretické části se zaměřím zejména na pět hlavních témat. Prvním je biotransformace, neboli metabolismus léčiv. Zabývám se zde obecným principem biotransformace a jeho rozdělením na první, druhou a třetí fázi, u kterých zmiňuji především jednotlivé reakce, jejich princip a hlavní enzymy. Dále se v samostatné kapitole věnuji i *in vitro* modelům biotransformace, s důrazem na přípravu, složení a na obsažené enzymy. Druhým hlavním tématem teoretické části je popis principu a instrumentace kapalinové chromatografie, kde je pozornost zaměřena na princip chromatografické separace a základním charakteristikám tohoto procesu. Následuje kapitola o hmotnostní spektrometrii, principu a instrumentaci této metody, kde představuji typy skenů a záznamů, především pak ty použité v experimentální části práce. V samostatné kapitole se věnuji i validačním parametrům pro analytické a bionalytické metody a obecně vývoji metod necílené LC-MS analýzy. Poslední dílčí téma se pak týká (*S*)-kathinonu a jeho derivátů. Tato pasáž poskytuje informace o původu (*S*)-kathinonu, o jeho využití a farmakologických účincích. V poslední kapitole teoretické části se nachází informace o současných poznatcích ohledně biotransformace této látky a jejích derivátů.

V experimentální části je nejprve představen výčet chemikálií, specializovaných pomůcek, přístrojů a počítačových programů, se kterými je při výzkumu pracováno. V dalších kapitolách se nachází souhrn přípravy všech vzorků a biotransformačních experimentů. Představeny jsou zvolené metody pro účely analýzy a její optimalizaci. Nakonec dochází, což je v kontextu práce to nejzásadnější, k identifikaci a charakterizaci metabolitů (*S*)-kathinonu především pro hodinovou a dvanáctihodinovou inkubaci v prostředí HLM. Pro obě doby inkubace se v poslední kapitole stanoví i stabilita (*S*)-kathinonu, resp. jeho rozložené množství.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Biotransformace léčiv

Slovo metabolismus bylo vyvinuto z řeckého „meta“ – přes a „balló“ – házím a antičtí Řekové by jím zřejmě rozuměli provedení změny. (*přispěvatelé Wikipedie, 2019*). Dnes je metabolismem neboli látkovou výměnou chápán soubor veškerých chemických dějů, které probíhají uvnitř organismu a které jsou katalyzované enzymy. Metabolismus je důležitý z hlediska získání energie a k tvorbě potřebných látek pro činnost a stavbu organismu.

Všechny živé organismy se dostávají do kontaktu s cizorodými látkami (xenobiotiky) každý den. Tyto cizorodé látky se v různé míře zapojují do metabolismu, podobně jako vlastní látky organismu (eobiotika). Do organismu se mohou dostat prostřednictvím gastrointestinálního traktu, dýchacích cest nebo v menší míře kůží. Mezi cizorodé látky řadíme například léčiva, návykové látky, aditiva nebo barviva v potravinách. Xenobiotika mohou být pro organismus zatěžující či nebezpečná, a z toho důvodu je důležité, aby každý organismus měl svůj systém, kde se tyto cizorodé látky metabolizují na neškodné produkty.

Obecný princip metabolizace, resp. biotransformace, zahrnuje změnu struktury daného xenobiotika působením všech enzymů, se kterými se xenobiotika v organismu setkávají. Většina xenobiotik se metabolizací oxiduje na polárnější molekuly, čím se obvykle zamezí případnému procházení do dalších tkání a ulehčí se jejich eliminace v organismu. Těmito chemickými změnami však vznikají nové chemické látky, tedy metabolity, které mají odlišné fyzikálně-chemické či biologické vlastnosti. Tím je způsobené i rozdílné chování v organismu. Jako příklad takové změny je možné uvést bioaktivaci nesteroidního protizánětlivého léčiva nabumeton nebo cytostatikatumoxifen, která se po biotransformaci stávají biologicky aktivnějšími. Metabolismus léčiv je tedy komplexní a zpětnovazebně regulovaný děj probíhající vlivem nejrůznějších enzymů. Právě na základě typu enzymatických reakcí a typu přeměny struktury xenobiotika ho lze rozdělit na metabolismus první, druhé a třetí fáze.

### 1.1.1 První fáze biotransformace

Jelikož jsou biotransformace léčiv většinou kaskádové enzymatické reakce s časovou sousledností, mohou být rozděleny do reakcí I. fáze zvané jako funkcionalizace a do reakcí II. fáze pod pojmem konjugace. Během první fáze metabolismu dochází k zavedení polárních skupin nebo k jejich odkrytí<sup>1</sup> v molekule léčiva za účelem usnadněného navázání endogenní molekuly v druhé fázi metabolismu.

---

<sup>1</sup> Termin odkrytí funkcí skupiny se objevuje v některých učebnicích biochemie (např. Skálová et al., 2011), kde označuje chemickou reakci, která v daném kontextu vede ke vzniku určité relevantní funkční skupiny ve struktuře substrátu (např. hydroxylové skupiny).

Metabolity první fáze vznikají oxidací, redukcí, hydrolýzou, cyklizací, decyklizací a často i kombinací těchto reakcí.

#### 1.1.1.1 Oxidace

Nejdůležitější a nejvíce zastoupenou reakcí během první fáze metabolismu je oxidace, jejíž enzymový systém zapojený do metabolismu se vyskytuje hlavně v endoplazmatickém retikulu buněk jater, dále pak u buněk ledvin, plic a střev. Katalyzátory oxidačních biotransformačních reakcí mohou být:

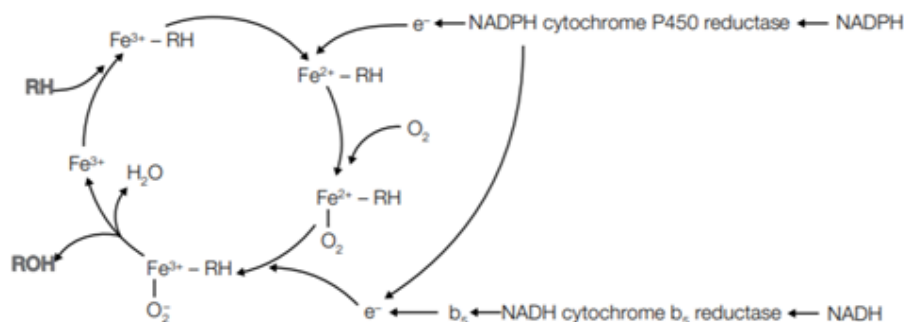
- Cytochrom P450 (CYP),
- Monooxygenázy obsahující flavin (FMO).

#### Cytochrom P450

Cytochromy P450 (tzv. CYP) jsou hemoproteiny, vyskytující se v membráně hladkého endoplazmatického retikula převážně v játrech. Cytochromy P450 jakožto fakultativní monooxygenasy katalyzují reakce, které jsou založené na principu zavedení atomu kyslíku ze vzduchu do molekuly léčiva (*Clementi a Fumagalli, 2012*).

Jelikož se cytochromy P450 vyskytují v různých izoformách, jsou proto řazeny do genetických rodin a podrodin podle podobnosti sekvence aminokyselin proteinových molekul. Prvním číslem za zkratkou P450 se označují rodiny cytochromů P450. Následující velké písmeno pak označuje podrodinu a posledním číslem se rozlišují jednotlivé izoenzymy. Jako příklad můžeme uvést izoenzym P450 1A2, který je členem rodiny 1, přičemž náleží do enzymové rodiny A a má izoformu 2. Do stejné rodiny patří ty izoformy, u nichž byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence. Pokud by u nich byla nalezená homologie více než 60 %, pak by je bylo možné přiřadit do stejné podrodiny (*Stiborová et al. 1999*)

Oxidační reakce s CYP vyžadují přítomnost molekul kyslíku, nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) a oxidázového systému sestávajícího ze dvou enzymů, NADPH-cytochrom-P450-reduktázy a cytochromu P450, zabudovaných do fosfolipidové matrice endoplazmatického retikula. V prvním kroku se substrát naváže na atom  $Fe^{3+}$  hemu a vytvoří komplex substrát-enzym. Poté se přenosem elektronu poskytnutým NADPH-cytochrom-P450-reduktasou redukuje železitý iont na železnatý. Molekula kyslíku je pak s dalším elektronem z NADPH-cytochrom-P450-reduktázy přijatá redukováným komplexem enzym-substrát. Biotransformací substrátu cytochromem P450, vyžadujícím jednu molekulu aktivního kyslíku, se vytvoří jedna molekula oxidovaného substrátu a voda. Toto schéma je popsáno na Obr. 1.



**Obrázek 1:** Schéma znázorňující katalytický cyklus cytochromu P450. RH: substrát, ROH: hydroxylovaný produkt. Převzato z: Clementi, Fumagalli 2012.

V lidském organismu se vyskytuje několik desítek izoform CYP, přičemž 18 z nich dle posledních studií biotransformují xenobiotika. Nejvýznamnějším zástupcem CYP je izoforma CYP 3A4, která dokáže biotransformovat až 50 % všech v praxi aktuálně užívaných léčiv. Širokospektrá aktivita CYP je nicméně významně ovlivňována různými inhibitory (např. ketonazol, makrolidová antibiotika) či induktory se schopností regulovat nejen jejich aktivitu, ale také i míru exprese (např. rifampicin, barbituráty).

V souvislosti s reaktivitou pestrých enzymů z nadrodiny CYP je nutné konstatovat, že některá léčiva či xenobiotika mohou ve výše zmíněném katalytickém kruhu CYP (Obr. 1) převzít roli molekuly kyslíku O<sub>2</sub> a stát se akceptorem elektronů železnatého iontu hemu. Tento mechanismus vysvětluje možnost reduktasové aktivity CYP, díky němuž se mohou některé substráty anaerobně redukovat. Molekuly kyslíku v tomto případě působí dokonce jako inhibitory katalytické aktivity CYP (Gan et al., 2009).

### Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou další enzymy, působící v první fázi biotransformace. Nacházejí se hlavně v hepatocytech, jež je možné lokalizovat v membránách endoplazmatického retikula. FMO lze rozdělit do šesti rodin, přičemž FMO<sub>3</sub> enzymy jsou v játrech převládající. Substráty FMO mohou být derivované organické látky, které obsahují atomy dusíku, síry, fosforu nebo selenu.

#### 1.1.1.2 Redukce

V jaterních mikrosomech dochází také k redukčním biotransformacím, které jsou ale méně časté než ty oxidační. Příkladem redukce xenobiotik je významná přeměna karbonylových skupin na sekundární alkohol, který pak může vstoupit do konjugační reakce ve druhé fázi biotransformace. Je katalyzována cytosolickými aldo-ketoreduktasami, používajícími NADPH jako donor elektronů (Matouš, 2010). Za zmínku stojí též fakt, že za určitých okolností vykazují reduktasovou aktivitu i enzymy z nadrodiny CYP. Podrobnější informace o enzimech s reduktasovou aktivitou může čtenář získat v odkazované odborné literatuře (Barski et al., 2008).

### 1.1.1.3 Hydrolýza

Během první fáze biotransformace dochází často k hydrolýze xenobiotik obsahující ve své molekule esterové či amidové vazby za vzniku kyselin a příslušných alkoholů či aminů. Hydrolýza je katalyzovaná esterasami, amidasami, nebo může být katalyzovaná epoxidasami, které redukují epoxidy<sup>2</sup> na dioly. Taková reakce často detoxifikuje kancerogenní aromatické epoxidy na méně toxické produkty (Matouš, 2010). Hydrolyzovány mohou být též produkty konjugace 2. fáze biotransformace.

#### *Epoxidové hydrolázy*

Epoxidové hydrolázy (EHs) působí na epoxidy a transformují je v dioly. Epoxidy jsou vysoce reaktivní elektrofilní sloučeniny, které se vážou na nukleofilní skupiny v proteinech, deoxyribonukleové kyselině (DNA) a ribonukleové kyselině (RNA). Tím zapříčiňují mutace a buněčnou toxicitu. EHs tedy slouží k inaktivaci potenciálně toxických metabolitů, které mohou vzniknout např. z aromatických látek působením oxidas (např. 7,8 - epoxybenzo[*a*]pyren působením CYP).

### 1.1.2 Druhá fáze biotransformace

Reakce druhé fáze biotransformace jsou relativně četné a zahrnují různé skupiny enzymů. Tyto enzymy, až na několik výjimek, přeměňují substráty na více hydrofilní produkty, které mají často vyšší molekulovou hmotnost. Tyto reakce jsou zprostředkovány celou řadou konjugačních enzymů, které napadají funkční skupiny jako -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH. Tyto skupiny se buď přirozeně vyskytují v cílové molekule xenobiotika, nebo byly vytvořeny v průběhu I. fáze biotransformace. (Clementi a Fumagalli, 2012)

#### 1.1.2.1 Glukuronidace

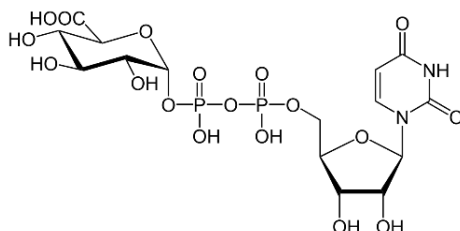
Glukuronidace se dá považovat za nejdůležitější reakci druhé fáze biotransformace díky vysokému počtu endogenního kofaktoru kyseliny uridindifosfoglukuronové (UDP-GA), zobrazené na Obr. 2. Tyto reakce jsou katalyzovány uridindifosfátglukuronosyl-transferásou (UGT) a všemi jejími izoformami, většinou lokalizovaných v endoplazmatickém retikulu různých tkání. Doposud bylo identifikováno devatenáct genů, které kódují UGT v lidském genomu, z toho 9 z jich je kódováno genem UGT1 a 10 podle rodiny genů UGT2. Tyto izoformy reagují s různými induktory a vykazují selektivitu vůči určitým třídám substrátů.

Glukuronidační reakce spočívají v přenosu zbytků kyseliny glukuronové z kofaktoru UDP-GA na funkční skupiny substrátů. Kofaktor UDP-GA se produkuje metabolismem glykogenu a vyskytuje se ve všech tělesných tkáních. Produkty glukuronidačních reakcí, tedy glukuronidy, jsou generovány z velkého množství látek,

---

<sup>2</sup> Enzymatický rozklad epoxidového kruhu probíhá součinným mechanismem, kdy kyslík karboxylátu asparaginu epoxyhydrolasy jakožto nukleofil napadá uhlík epoxidu a vodík hydroxyly tyrosinu epoxyhydrolasy přechází na kyslíkový atom epoxidu. Vzniklý ester se za účasti histidinu epoxyhydrolasy vodou rozkládá na diol xenobiotika a regenerovanou epoxyhydrolasu. V některých učebnicích (např. Matouš, 2010) je rozklad epoxidů považován též za redukční proces, neboť se u epoxidu vazba O-C chemicky mění na O-H.

jako například alkoholů, fenolů, hydroxylaminů, karboxylových kyselin, aminů, sulfonamidů a thiolů. Podle funkční skupiny můžeme glukuronidy rozdělit na O-glukuronidy, tedy glukuronidy vázané na kyslík, N-glukuronidy vázané na dusík a S-glukuronidy vázané na síru. Velmi zřídka se vyskytují i na uhlík vázané glukuronidy (C-glukuronidy) v přítomnosti nukleofilních atomů uhlíku (Clementi a Fumagalli, 2012).



**Obrázek 2:** Kyselina uridindifosfoglukuronová.

### 1.1.2.2 Sulfatace

Dalším důležitým typem konjugačních reakcí je sulfatace či sulfonace, kterou se biotransformují hlavně fenoly, alkoholy, aminy a v menší míře thioly. Sulfataci katalyzují sulfotransferázy (SULT), což jsou enzymy, které se nacházejí v cytosolu buňkách jatrech, ledvin, střev a kůže. SULT a jejich třináct izoform katalyzují přenos anorganických sulfátových skupin (tj. síranu  $SO_4^{2-}$ ) na hydroxylové skupiny fenolů a alifatických alkoholů, čímž se produkují estery kyseliny sírové. Kofaktorem v těchto reakcích je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), který je syntetizovaný v cytosolu ze sulfátu a adenosintrifosfátu (ATP). Síran potřebný pro syntézu PAPS je poskytován cysteiny relativně komplexním oxidačním procesem.

### 1.1.2.3 Methylace

Méně významná cesta druhé fáze biotransformace xenobiotik je methylace, což jsou syntézní reakce zaměřené na biotransformaci endogenních sloučenin. Nicméně v plicích nebo jiných tkáních se nacházejí methyltransferázy, kterými mohou být methylována některá léčiva. Využívá se zde S-adenosylmethionin (SAM) jako kofaktor, který je generován reakcí mezi methioninem a ATP katalyzovanou methionin-adenosyltransferasou. Methyltransferázy jsou relativně specifické a můžeme je klasifikovat podle substrátu a odpovídajícího methylovaného produktu na tři druhy methyltransferas, a to katechol-O-methyltransferasa (COMT), fenol-O-methyltransferasa (POMT) a thiopurin-S-methyltransferasa (TSMT).

Methylační reakce přenáší methylové skupiny ze SAM na kyslík alkoholu, na dusík aminových skupin nebo na síru thiolů. Produkty těchto reakcí jsou methylované substráty, které mají sníženou rozpustnost ve vodě a S-adenosylhomocystein. Methylace je jednou z mála cest biotransformace, která může vést ke zvýšení lipofility xenobiotik.

### 1.1.2.4 Acetylace

Acetylace patří mezi nejčastější biotransformace xenobiotik obsahující aromatické aminy nebo hydrazinové skupiny a vedou k N-acetylovým derivátům (tj.

acetamidům), které mohou být méně rozpustné ve vodě než původní sloučeniny. Kofaktor v těchto reakcích je acetylkoenzym A produkovaný z glykolýzy nebo přímou interakcí acetátu a koenzymu A zprostředkovaného CoA-S-acetyltransferásou. Transfer acetylových skupin z acetylkoenzymu A je zprostředkovaný cytosolovými enzymy, N-acetyltransferásami (NAT), které se nachází v mnoha tkáních. U lidí jsou NAT kódovány dvěma geny. NAT1, které jsou přítomny ve všech tkáních a NAT2, vyskytující se pouze v játrech a střevech.

#### 1.1.2.5 Konjugace s aminokyselinami

Karboxylové kyseliny exogenního původu mohou tvořit deriváty s koenzymem A a reagovat s endogenními aminy za vzniku konjugátů. U konjugace s aminokyselinami se na rozdíl od jiných konjugací aktivuje xenobiotikum (tj. karboxyl) spíše než kofaktor. Zúčastněné aminokyseliny jsou obvykle glycin, glutamin a ornithin. Další aminokyseliny jsou pak arginin a taurin, které slouží jako acyl-akceptor při konjugaci žlučových kyselin.

V prvním kroku konjugace s aminokyselinami se karboxylová kyselina xenobiotika aktivuje koenzymem A, přičemž tuto ATP dependentní reakci katalyzují acyl-CoA-synthetasy. Xenobiotikum se takto převede na více reaktivní thioesterový derivát koenzymu A. Ve druhém kroku pak vzniklý thioester koenzymu A reaguje s thiolovou skupinou cysteinu N-acyltransferasy. Následně je původní acyl xenobiotika přenesen na aminoskupinu endogenní aminokyseliny.

#### 1.1.2.6 Konjugace s glutathionem

Glutathion je tripeptid tvořený glycinem, kyselinou glutamovou a cysteinem. Vznik glutathionu je katalyzovaný  $\gamma$ -glutamylcystein-synthetasou a glutathion-synthetasou. Vzhledem k jeho schopnosti odstranit potenciálně toxické elektrofilní sloučeniny je glutathion v organismu velmi důležitá sloučenina. S glutathionem mohou reagovat různé elektrofilní sloučeniny endogenního a exogenního charakteru za vzniku netoxických konjugátů. Epoxidy, nitroalkany, alkeny a azo- a nitro- aromatické sloučeniny jsou látky, které snadněji konjugují. Tyto konjugáty se pak mohou vyloučit močí, žlučí nebo podstoupit další metabolické procesy.

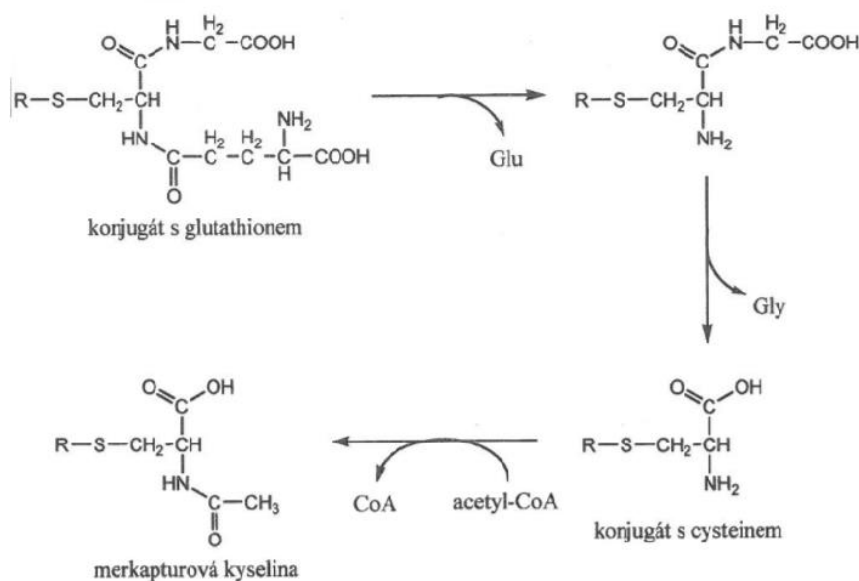
Přenos nukleofilního glutathionu na molekulu xenobiotika obsahující elektrofilní heteroatom (-O, -N a -S) je katalyzován glutathion-S-transferásou (GST), která se vyskytuje v krvi, játrech, ledvinách a nadledvinkách. U lidí bylo identifikováno více než 20 izoform GST, které jsou rozdělené na cytosolické a mikrosomální izoformy. Mikrosomální GST katalyzují biotransformaci endogenních sloučenin, zatímco biotransformaci xenobiotik a léčiv katalyzují cytosolické izoformy GST. Tyto izoformy jsou odlišné selektivitou substrátu a reakční rychlostí, která je 5 až 40krát vyšší v cytosolických izoformách.

### 1.1.3 Třetí fáze biotransformace

V soudobé odborné literatuře se setkáváme rovněž s 3. fází biotransformace, která představuje soubor různých biochemických změn a transportních procesů

pozorovaných u produktů konjugací fáze biotransformace xenobiotik (Almazro *et al*, 2017). Zůstává ale otázkou pro diskuzi, zda např. v této souvislosti zmiňované transportní dráhy metabolitů realizované pomocí ATP-vázajících kazetových transporterů nepovažovat spíše za eliminační fázi než za biotransformační fázi (Omiecinski *et al*, 2010).

Příkladem biochemického procesu, který je považován 3. fázi biotransformace, je modifikace konjugátů s glutathionem. Netoxické konjugáty, které vznikají v reakcích druhé fáze při reakci s glutathionem se mohou dále biotransformovat na konjugáty acetylcysteinu (kyselina merkapturová) (Skálová, 2017). Tato reakce je zobrazena na Obr.3. Při této reakci dochází k odstranění glutamylového zbytku v molekule glutathionu pomocí  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidázy, což je enzym, který se vyskytuje převážně v játrech a ledvinách. Ze vzniklého cysteinylglycinového konjugátu se pak pomocí peptidas odstraněním glycylového zbytku stane cysteinový konjugát, který se podrobí N-acetylaci za vzniku merkapturové kyseliny. N-acetylace je reakce vratná, přičemž je katalyzována N-acetyltransferasou. Další využití konjugátů i merkapturové kyseliny může být v podobě substrátu pro b-lyasu, která štěpí thioetherové vazby (Skálová, 2017).



**Obrázek 3:** Přeměna konjugátu s glutathionem na merkapturovou kyselinu. Převzato z: Skálová, 2017.

## 1.2 *In vitro* modely biotransformace

Základním cílem studia *in vitro* metabolitů je poskytnout přehled modelových systémů a predikovat schopnost biotransformace xenobiotik (Asha, S., & Vidyavathi, M, 2009). Screeningové testy *in vitro*, které zahrnují experimentální systémy odvozené z lidských jater, představují efektivní přístup k odhadu metabolických osudů xenobiotik *in vivo*. Doposud bylo vyvinuto několik modelů lidských jater *in vitro*:

- Lidské jaterní mikrosomy



- Supersomy
- Perfundovaná játra
- Plátky jater
- Hepatocyty
- Cytosolové frakce
- S9 frakce
- Buněčné linie

Pro svoji aktivitu vyžadují všechny tyto modely kromě primárních hepatocytů, buněčných linií, plátků jater a izolovaných perfundovaných jater exogenní kofaktory, jako například systém regenerující NADPH nebo uridin-difosfoglukuronovou kyselinu (UDP-GA). NADPH je vyžadován pro měření oxidázové aktivity katalyzované cytochromem P450, monooxygenázou obsahující flavin, NADPH-P450 reduktasou a mnoha dalších oxidasových enzymů.

#### *Lidské jaterní mikrosomy*

Lidské jaterní mikrosomy (*human liver microsomes*, HLM), využití v této bakalářské práci, jsou pravděpodobně nejrozšířenějším *in vitro* systémem pro hodnocení metabolického profilu chemických látek. Obsahují vezikuly endoplazmatického retikula hepatocytů jaterních buněk a připravují se homogenizací jater s následnou diferenciální centrifugací (Asha, S., & Vidyavathi, M, 2009). HLM jsou široce a levně dostupné z komerčních zdrojů. Výhody lidských jaterních mikrosomů jsou jejich nízké náklady, jednoduchost použití a snadné skladování. HLM je také jeden z nejlépe charakterizovaných modelů *in vitro* pro výzkum metabolismu léčiv a lze jím studovat i rozdíly mezi jednotlivci, kteří se liší věkem, rasou, pohlavím či zdravotním stavem. Další výhodou je, že enzymatická aktivita může být udržována v krystalických (zmrazených) formách po mnoho let. Nevýhody zahrnují nevhodnost pro kvantitativní odhady *in vivo* lidské biotransformace, a to kvůli přítomnosti CYP a UGT bez konkurence s ostatními enzymy, jako jsou NAT, ST, GST, které HLM neobsahují.

#### *Supersomy*

Supersomy jsou cennou náhradou HLM v *in vitro* modelech biotransformace. Je to mikrosomální frakce homogenizovaných hmyzích buněk, které jsou infikované geneticky upraveným virem *baculo* a exprimují lidský CYP nebo UGT (Asha, S., & Vidyavathi, M, 2009). Jako kofaktor musí být při biotransformačních studiích přidán systém regenerující NADPH.

#### *Cytosolové frakce lidských jater*

Cytosolové frakce, které se dosud ve výzkumu biotransformace xenobiotik příliš často nepoužívaly, se získávají diferenciální centrifugací homogenizovaných jater, jako je tomu například u HLM. Tyto frakce obsahují enzymy druhé fáze biotransformace, jako je glutathion-S-transferáza (GST), N-acetyltransferáza (NAT) a sulfotransferáza (ST). Do frakce je nezbytné přidat kofaktory jako například acetylkoenzym A (acetyl CoA) nebo dithiothreitol a acetyl CoA jako regenerační systém pro NAT. Dále pak adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfát pro ST a glutathion (GT) pro GST. (Brandon et al. 2003).

### *Lidská jaterní S9 frakce*

Frakce jater S9 se získává jakožto supernatant z jaterního homogenátu po centrifugaci s odstředivým zrychlením 9000 g. S9 frakce obsahují jak mikrosomální, tak cytosolové enzymy hepatocytů. Do této frakce je nutné dodat NADPH a CYP enzymy (Brandon *et al.* 2003). Frakce S9 umožňují zobrazení úplného profilu metabolitů, jelikož zahrnují jak většinu enzymů první fáze, tak fáze druhé, což nám umožňuje vyhodnocení obou fází biotransformace.

### *Jaterní nádorové buněčné linie*

Buněčné linie se používají hlavně pro studie cytotoxicity léčiva a jeho metabolitů. Lidské jaterní buněčné linie mohou být izolované z primárních nádorů jaterního parenchymu po chronické hepatitidě nebo cirhóze. Důležitým požadavkem na buněčné linie je podoba s normální fyziologií lidských hepatocytů *in vivo*. Při porovnání jsou méně populární na rozdíl od předešlých modelů *in vitro* z důvodu jejich nerozlišených buněčných charakteristik a neúplné exprese všech rodin metabolických enzymů. V současnosti rozlišujeme několik typů buněčných linií. K biotransformačním studiím využíváme především buněčné linie HepG2, což jsou dostupné lidské buňky z hepatocelulárního karcinomu.

### *Hepatocyty*

K zjištění o metabolismu xenobiotika můžeme dospět také pomocí hepatocytů, jejichž výsledky dobře korerují s *in vivo*. Primární hepatocyty podléhají postupně ztrátě jaterně specifických funkcí a dochází k snížení exprese CYP, zatímco hepatocyty v kultuře si zachovávají aktivitu většiny enzymů fáze I a fáze II (Asha, S., & Vidyavathi, M, 2009).

### *Jaterní řezy*

Dalším příkladem ke studiu metabolismu *in vitro* mohou být plátky jater v médiu bohatém na živiny. Aktivita enzymů je však krátká, a to kvůli narušené difúzi živin a kyslíku v jaterních řezech. Prozatím neexistují žádné dostupné plátky lidských jater, tudíž se mohou využívat jen řezy zvířecích jater.

### *Perfundovaná játra*

Poslední možný a nejméně používaný je model perfundovaných zvířecích jater, protože jak už bylo zmíněno, tak k využití lidských jater pro účely výzkumu nedochází. Tento model má však špatnou reprodukovatelnost, je náročný na pracovní sílu a jeho funkčnost je omezena pouze na 3 hodiny. I přes to je ale považován za správný model biotransformace léčiv, jelikož je nejbližší podmínkám *in vivo*.

## 1.3 Princip a charakterizace chromatografické separace v LC

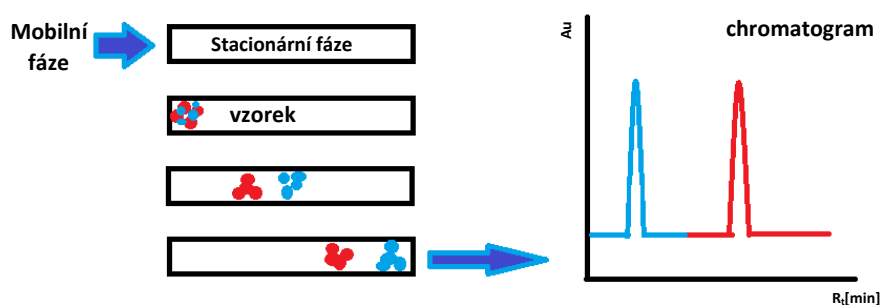
### 1.3.1 Princip LC

Chromatografie je separační metoda založená na selektivním rozdělení složek mezi dvě nemísitelné fáze, a to mezi mobilní fází, která protéká fází stacionární. Stacionární fáze je tuhá látka nebo kapalina umístěna na tuhém nosiči. Ve formě sorbentu je pak stacionární fáze součástí kolony, kde protéká fáze mobilní, tedy kapalina, podle které je technika pojmenována. Princip chromatografické separace je popsán na Obr. 4. Podle povahy mobilní fáze můžeme rozlišovat plynovou chromatografii (GC), kapalinovou chromatografii (LC) nebo superkritickou fluidní chromatografii (SFC) (Niessen, 2006). V této bakalářské práci je pracováno s metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, *High performance liquid chromatography*), která se od LC liší přiváděním mobilní fáze za vysokého tlaku.

Separace v LC je umožněna díky rozdílné interakci látek mezi mobilní a stacionární fází. Distribuci složek mezi tyto dvě fáze lze popsat distribuční konstantou  $K_D$ , kde:  $c_s$  = koncentrace složky ve stacionární fázi,  $c_m$  = koncentrace složky v mobilní fázi (1).

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1)$$

Hodnota distribuční konstanty *de facto* u LC odpovídá tomu, jak dlouho daná molekula setrvává ve stacionární fázi, tím tedy i její retenci, která je daná retenčním faktorem.



**Obrázek 4:** Princip chromatografické separace dvou látek.  $A_u$  = absorpční jednotka,  $R_t$  = retenční čas. Zpracování: autorka.

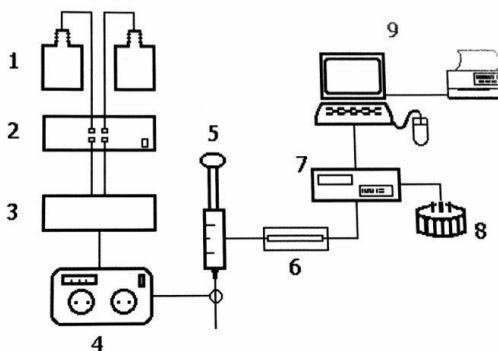
Povahou stacionární a mobilní fáze můžeme ovlivnit separaci a eluci složek směsi. Eluci lze realizovat použitím buď isokratické nebo gradientové eluce. Při isokratické eluci je složení mobilní fáze konstantní, zatím co u gradientové eluce je složení MF měněno ve prospěch složky s vyšší eluční silou. Separované složky jsou pak detekovány detektorem a převedeny v podobu chromatogramu, který je charakteristický svými píky (elučními křivkami) (Nováková et al. 2013).

### 1.3.2 Instrumentace LC

Základní model kapalinového chromatografu se zpravidla skládá z několika základních částí, které mají různé funkce a jsou zobrazeny na Obr. 3.

Jednotlivé funkce kapalinového chromatografu lze rozdělit na:

- Uchovávání a transport mobilní fáze (zásobníky MF, vysokotlaké čerpadlo)
- Dávkování vzorku (autosampler)
- Separace látek (chromatografická kolona)
- Detekce látek (detektor)
- Záznam dat a vyhodnocení (počítač a software)



**Obrázek 5:** Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu, převzato z: Nováková, Douša 2013.

Do transportu mobilní fáze se řadí zásobníky mobilních fází (1), ve kterých jsou umístěné speciální filtry, zachycující tuhé částice před vstupem do odplyňovače (2), kde se mobilní fáze odplyňuje. Odplynění MF je velmi důležitý krok z důvodu možnosti uvolnění plynů z mobilní fáze v koloně při změně tlaku. Při gradientové eluci využíváme směšovač (3), který slouží pro mísení proudů MF ze zásobovačů. K tomuto mísení může dojít před čerpadlem, kdy je pak mobilní fáze vedena do vysokotlakého čerpadla (4). Nebo k mísení dochází za vysokotlakým čerpadlem.

V současnosti jsou k dávkování vzorku (5) využívány nejvíce automatické dávkovače tzv. autosamplery. Ty jsou spojeny se zásobníkem vzorků, kde se vzorky nachází ve skleněných mikrozkmavkách (tzv. vialkách) v přesně označené poloze. Z vialky je pak vzorek nasáván do systému pomocí jehly autosampleru. Vialky mohou mít různé objemy, nejčastěji se vyskytují 2 ml, pokud jsou však vzorky v menším množství, vkládají se do vialek tzv. inserty s menším objemem. (Nováková et al. 2013) Následně pak dojde k mísení vzorku s mobilní fází pomocí šesticetných ventilů.

Smíšená mobilní fáze se vzorkem se dostane do chromatografické kolony (6), které jsou uloženy v termostatu a dojde k separaci látek. Kolony jsou rozděleny do dvou částí, a to do těla kolony a do dvou koncovek kolony. Tělo kolony je tvořené kovovým pláštěm, kovovou fritou, stacionární fází a ochranným kroužkem. Koncovka kolony nám zajišťuje hlavně těsnost systému. Termostat nám zajišťuje rovnovážnou distribuci tepla a zamezuje vzniku teplotním výkyvům, které by pak negativně ovlivnily separaci látek.

Detekce látek, které prošly kolonou, jsou detekovány pomocí detektoru. Detektory zaznamenávají změny v signálu při průchodu čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analytem. V této bakalářské práci byl jako detektor použit absorpční detektor

pro ultrafialovou a viditelnou část spektra (UV-VIS) a vysokorozlišovací spektrometr (HRMS), který poskytuje i údaje o identitě látky ze vzorku.

### 1.3.3 Základní charakteristiky separačního procesu

Jako základní veličiny pro dělené látky v LC uvádíme retenční čas ( $t_R$ ) a retenční objem ( $V_R$ ). Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima křivky (píku) v detektoru. Je kvalitativní charakteristikou dané látky. Retenční objem je objem mobilní fáze, která protékla za retenční čas. Stejnou rychlostí se pohybuje inertní látka, což je látka, která není zadržovaná na stacionární fázi a má tedy retenční čas ( $t_0$ ) a objem ( $V_0$ ) tzv. mrtvý. Mezi kvantitativní charakteristiky pak řadíme plochu pod píkem ( $A$ ) nebo výšku píku ( $h$ ).

Základní kvantitativní veličinou, která charakterizuje účinnost chromatografické separace v daném chromatografickém systému je bezrozměrná veličina nazývaná počet teoretických pater ( $N$ ). Separace je účinnější, čím vyšší je počet teoretických pater, jelikož dochází méně k rozšiřování analytu při průchodu kolonou. Počet teoretických pater lze ovlivnit délkou kolony, retenčním časem, velikostí částic stacionární fáze, rychlosti průtoku mobilní fáze, teplotou nebo viskozitou mobilní fáze. Pro výpočet  $N$  se využívá rovnice, kde:  $w$  = šířka píku v jeho příslušné výšce, často v polovině označovaná jako  $w_{50}$ ,  $t_R$ =retenční čas (2).

$$N = konst \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

Jelikož je pro posuzování účinnosti chromatografické separace potřebné uvádět délku kolony, byla zavedena veličina výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ , výška patra), která se používá pro porovnání kolon o různých délkách. Výšku patra můžeme definovat jako část délky kolony  $L$  připadající na jedno teoretické patro  $N$  (3):

$$H = \frac{L}{N} \quad (3)$$

Na účinnost separace chromatografického procesu má dále vliv rozmývání eluční zóny, což zapříčiňuje změnu tvaru chromatografického píku. Děje, které přispívají k rozmývání elučních zón popisuje van Deemterova teorie. Van Deemterova rovnice (4) je pro daný chromatografický systém vyjádřena jako závislost výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$  na lineární rychlosti průtoku mobilní fáze, kde:  $A$  = vířivá difúze,  $B$  = podélná difúze,  $C$  = odpor proti přenosu hmoty ve stacionární i mobilní fázi,  $u$  = lineární rychlost průtoku mobilní fáze.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (4)$$

Další veličinou udávající kvalitu chromatografické separace je tzv. asymetrie píku, kterou lze definovat dvěma způsoby: faktor chvostování ( $T_f$ , tailing factor) a faktor asymetrie ( $A$ ), který se v ideální symetrii rovná 1. Asymetrie je obecně podílem doby trvání nárůstu chromatografického píku a doby klesání píku v chromatogramu.

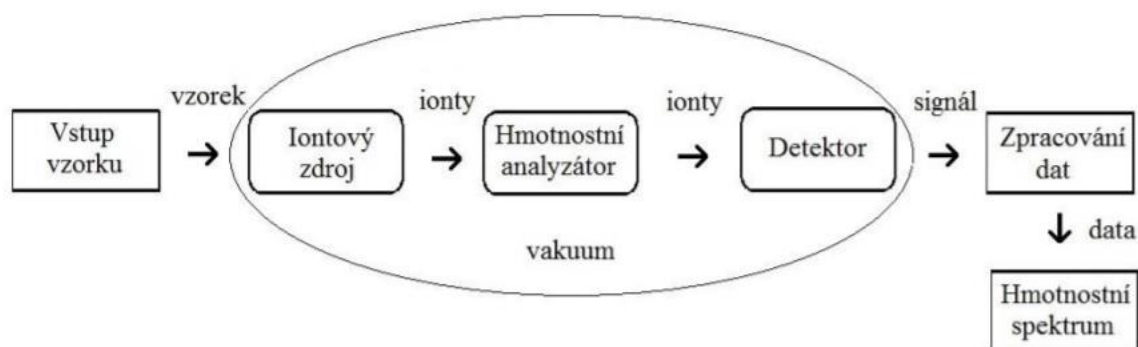
Pokud má narůstající část chromatografického píku delší trvání než jeho sestupující část, jedná se o případ frontujícího píku. Pokud je poměr trvání nárůstu a poklesu chromatografického píku obrácený, hovoříme o chvostujícím píku.

## 1.4 Princip a základní typy hmotnostní spektrometrie

### 1.4.1 Princip metody

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda založena na tvorbě iontů z neutrálních molekul ionizací vzorku a studiu jejich elektromagnetických a setrvačných vlastností. Ionty se buď mohou připravit ionizací v iontovém zdroji nebo mohou být přivedeny mobilní fází například u spojení hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií. Tyto ionty jsou pak separovány nebo filtrovány podle poměru jejich hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) a následně detekovány.

Hmotnostní spektrometr se v podstatě skládá z pěti částí: zaváděcí element pro vzorek, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a počítač pro následnou analýzu dat. Tyto části jsou popsány na Obr. 6. Zavedení vzorku může být buď přímé nebo prostřednictvím separačního zařízení, jako je plynová chromatografie, kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza (CE).



**Obrázek 6:** Základní schéma hmotnostního spektrometru. Převzato z: Siegel, 2014.

### *Ionizační techniky*

K ionizaci vzorku se využívá celá řada ionizačních technik, které se volí podle specifik dané látky. Ionizační techniky lze rozdělit podle velikosti využívané ionizační energie na „měkké“ ionizační techniky, ze kterých při ionizaci vznikají tzv. protonované či deprotonované molekuly, dále pak na ionizační techniky „tvrdé“.

Příkladem ionizačních technik měkkých je ionizace za atmosférického tlaku (API), zahrnující (ESI), což je ionizace elektrosprejem. Dále pak zahrnuje i ionizaci chemickou za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI) a jako poslední ionizaci desorpce laserem za účasti matrice (MALDI).

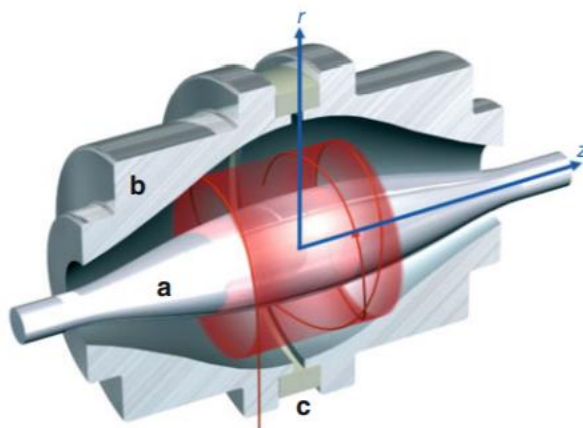
Jak uvádí Nováková (2013), u tvrdých ionizačních technik často dochází k rozsáhlé fragmentaci molekul. Typickým příkladem je (EI), což je elektronová

ionizace, při níž dochází k ovlivnění elektromagnetických polí a uvolnění valenčního elektronu, což vede ke vzniku molekulárního iontu  $M^{+}$ .

### *Hmotnostní analyzátořy*

Po vytvořeni iontů v plynné fázi se dále přivedou do hmotnostního analyzátořu, který je rozdělí podle jejich poměru  $m/z$  a poté umožní jejich urychlení a fokusaci. Dělení iontů může probíhat na základě různých fyzikálních principů uvedených v Tabulce 1. Na základě stabilizace oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného se střídavým napětím pracuje například kvadrupólový analyzátoř, který je složený ze čtyř rovnoběžně umístěných válcovitých tyčí. Protilehlé tyče jsou nabitě kladným a záporným potenciálem stejnosměrného napětí a na všechny tyče se zároveň přivádí vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty jsou zavedené do kvadrupólového pole a začnou kmitat v rovině kolmé na délku tyče. Podle jejich  $m/z$  a stabilních oscilací pak procházejí přes kvadrupólový filtr na detektor nebo jsou vedeny do fragmentační části hmotnostního spektrometru.

Na základě analýzy různé frekvence harmonických oscilací iontů pracuje nejnovější hmotnostní analyzátoř orbitrap, který byl použit v této bakalářské práci. Orbitrap funguje na principu iontové pasti, kde se využívá vnější a středová elektroda, zobrazené na Obr.7. Ionty jsou přivedené ke středové elektrodě, kolem které rotují a současně podélně oscilují v závislosti na jejich  $m/z$  a vloženém kvadrologaritmickém napětí. Rozlišení iontů závisí na helikálních oscilacích, které jsou charakteristické pro různé ionty. Zachycené ionty jsou pak detekovány a převedeny na hmotnostní spektrum pomocí Fourierovy transformace výstupního superponovaného frekvenčního signálu orbitrapu.



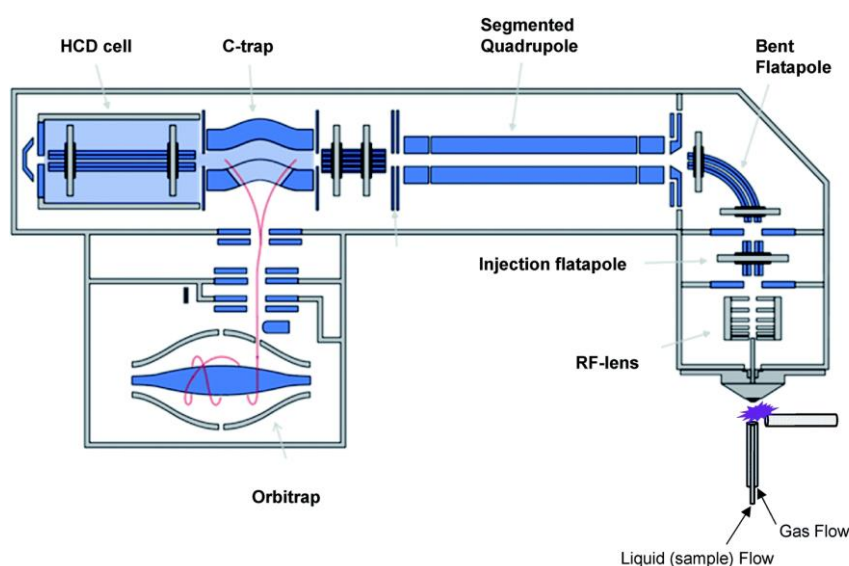
**Obrázek 7:** Schéma orbitrapu. a: středová/centrální elektroda, b: vnější dvoudílná elektroda, c: izolační keramický prstenec, který slouží k rozdělení vnější elektrody.

*Převzato z: Gross,2017.*

**Tabulka 1:** Typy analyzátorů a jejich princip separace. Vytvořeno podle: Nováková, Douša 2013.

Typ MS analyzátoru	Symbol	Princip separace
Magnetický analyzátor	B	Zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém poli
Kvadrupólový analyzátor	Q	Stabilita oscilací iontů
Iontová past	IT	Stabilita oscilací iontů
Analyzátor doby letu	TOF	Různá doba letu iontů
Orbitrap	OT	Různá frekvence oscilací iontů
Iontový cyklotronová rezonance	ICR	Různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v magnetickém a elektrickém poli

V této bakalářské práci byl používán hybridní kvadrupól-orbitrapový hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus (od firmy ThermoFisher) s vysokým rozlišením, který se skládá z několika základních částí. První částí je vyhřívaný iontový zdroj typu elektrosprej, který připravuje ionty pro hmotnostní analýzu. Za iontovým zdrojem se nachází evakuovaná iontová optika složená s tzv. RF čoček. Dále je zapojen pokročilý aktivní vodič paprsků (AABG), který zakřivuje dráhu vybraných iontů do úhlu 90°. Za vodičem paprsků je kvadrupólový hmotnostní filtr, který umožňuje přesný výběr prekurzorových iontů pro další analýzu. Ionty, které procházejí kvadrupólem následně vstupují do speciální regulační C-pasti, kde jsou proudy ionty buď směřovány do kolizní cely, nebo jsou vedeny do vlastního orbitrapu. C-past také slouží jako uložení iontových fragmentů, které jsou v závislosti na skenovacím režimu vpouštěny do z kolizní cely do orbitrapu. Koordinovanou funkci C-pasti zajišťuje elektronika a ovládací software. Vysoký stupeň vakua a přívod dusíku jako kolizního plynu zajišťují speciální pumpy a regulační prvky. Q Exactive Plus byl navržen s cílem poskytnout analytikům spolehlivý nástroj pro charakterizaci a kvantifikaci široké škály analytů (Obr. 8).

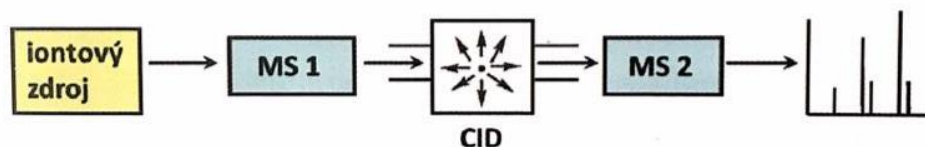


**Obrázek 8:** Schéma hmotnostního spektrometru Q Exactive Plus. Převzato z: Hoegg et al., 2017.



## Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Experimenty pomocí MS/MS využívají spojení dvou hmotnostních analyzátorů a fragmentaci iontů pomocí CID (kolizně indukovaná disociace), zobrazené na Obr. 9. Pomocí prvního hmotnostního spektrometru se vyberou dané ionty, které projdou a fragmentují se srážkami s inertním plynem. Tyto fragmentované ionty se pak analyzují ve druhém hmotnostním spektrometru (Karst, 2007).



**Obrázek 9:** Schéma tandemové hmotnostní spektrometrie. Převzato z: Nováková, Douša 2013.

## Detektory

U moderních detektorů se nejčastěji přeměňuje energie dopadajících iontů na elektrický signál, který se vyhodnocuje a zpracovává počítačem do hmotnostního spektra. Příkladem detektoru u hmotnostní spektrometrie je elektronový násobič, Faradayův detektor nebo jím může být i orbitrap, který slouží jako hmotnostní analyzátor i jako detektor. Orbitrap detekuje zachycené ionty a převádí je na hmotnostní spektrum pomocí Fourierovy transformace (Záruba, 2016).

## Hmotnostní spektrum

Výsledkem měření je MS spektrum tvořící graf závislosti intenzity (osa y) iontů na poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$  (osa x). Hodnota intenzity je převáděna na %, tedy nejintenzivnější pík v MS spektru bude mít hodnotu 100 %.

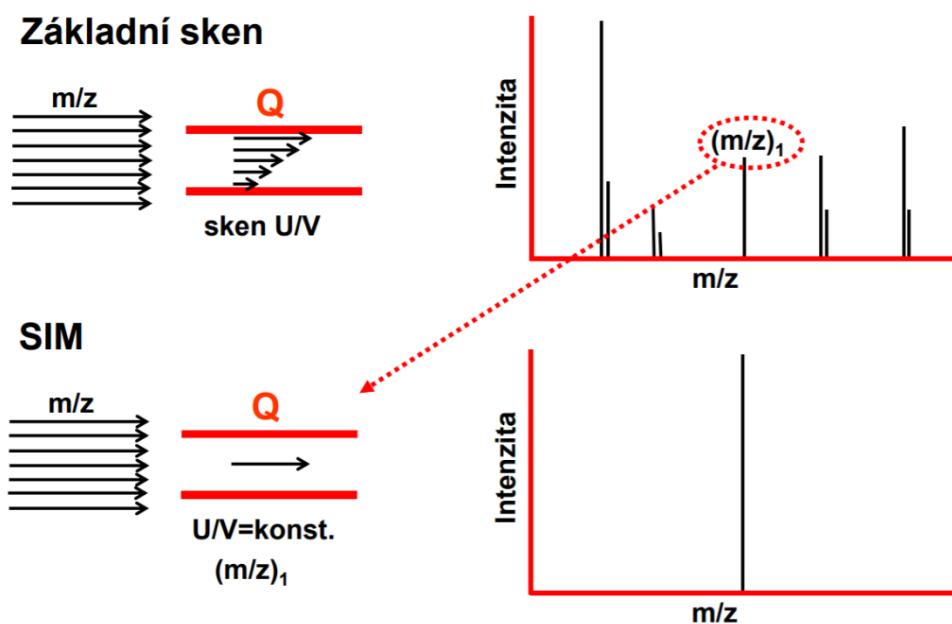
### 1.4.2 Základní typy skenů a chromatografických záznamů

Pomocí skenování hmot  $m/z$  získáváme záznamy sloužící k identifikaci látek a k určení jejich molekulové hmotnosti. Hmotnostní spektrometr lze využívat i samostatně, ale běžnější je jeho zařazení za LC, kde slouží jako detektor a umožňuje tak tvorbu chromatogramů. První způsob, kterým lze zobrazit záznam všech intenzit iontů, je chromatogram celkového iontového proudu (TIC), ze kterého lze získat extrahovaný iontový chromatogram (XIC), kdy se zobrazuje chromatogram pouze jednoho iontu. (Nováková, Douša 2013)

Typy MS skenů můžeme rozdělit podle použité metody na:

1. Jednoduché skeny, kam patří tzv. full scan a selektivní záznam jednoho nebo více iontu (single ion monitoring, SIM)
2. MS/MS skeny, kam patří sken produktových iontů, sken iontů prekursoru, sken neutrálních ztrát a sken jedné nebo více iontových reakcí

Díky základnímu skenu měříme hmotnostní spektra v plném rozsahu  $m/z$  (full scan) a získáváme kompletní informace o iontech analyzované látky. Základní sken nám může poskytnout záznam intenzity vybrané  $m/z$  v čase nazývaný rekonstruovaný iontový proud (Reconstructed ion current, RIC). Z RIC je pomocí softwaru možné získat výše zmíněný chromatogram XIC (Nováková, Douša 2013). Selektivní záznam jednoho nebo více iontů (Selected Ion Monitoring, SIM) nám poskytuje výběr jednoho iontu pomocí nastavených parametrů. SIM měří intenzitu pouze jednoho iontu, čím se výrazně zvyšuje citlivost na rozdíl od základního skenu. Základní sken, který používáme pro kvalitativní analýzu a SIM používaný pro kvantitativní analýzu jsou zobrazeny na Obr. 10.



**Obrázek 10:** Selektivní záznam vybraného iontu ( $m/z$ ). Převzato z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>.

Sken produktových neboli dceřiných iontů (Product Ion Scan, PR) měří fragmentované ionty, které vznikly tandemovou spektrometrií z vybraného iontu jako prekurzoru. PR poskytuje bohatější informace o struktuře látky než sken prekurzorových iontů neboli rodičovských iontů (Precursor Ion Scan, PI). Skenem neutrálních ztrát (Neutral Loss Scan, NL) monitorujeme všechny ionty, které podlely ztrátě částice o určité  $m/z$ . Dále pak můžeme sledovat fragmentační reakce určitého iontu pomocí selektivního záznamu jedné (SRM) nebo více reakcí (MRM) (Nováková, Douša 2013).

V této bakalářské práci jsme použili ještě další typy záznamů, a to fragmentaci všech iontů (all ion fragmentation, AIF) a data dependentní skenování (dd-MS<sup>2</sup>) v kombinaci s full skenem. U metody full sken/AIF se v prvním skenovacím kroku provádí úplná kontrola iontů v jejich daném hmotnostním rozsahu (tzv. Full MS). V druhém skenovacím kroku jsou pak všechny ionty fragmentovány (AIF), shromážděny a analyzovány (Kumar *et al.* 2013). Full sken a AIF se během analýzy stále opakují s rozestupem několika desetin vteřiny. Metoda Full MS/dd-MS<sup>2</sup> zahrnuje výběr

nejintenzivnějších iontů z full skenu, které pak podrobí fragmentaci a dalšímu skenu těchto produktových iontů.

## 1.5 Metody identifikace chemických struktur ve vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrii

Vývoj hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (*high resolution*, HR) hraje klíčovou roli v identifikaci metabolitů, a to se zlepšenou přesností, stabilitou a kvalitou. U metody identifikace látek pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie můžeme predikovat za určitých podmínek elementární složení dané molekuly nebo pomocí fragmentace určit strukturní vlastnosti. Elementární složení analytu se určuje pomocí několikanásobné lineární regrese nebo empiricky na základě porovnání experimentální a teoretické izotopické distribuce zkoumaného iontu (izotopické obálky) (Holčapek, 2001). Uplatňují se také různá pravidla, která lze ve zkratce uvést takto:

- hledání kombinace očekávaných prvků jako C, H, O, N, S, P, popř. halogenů,
- sudý počet elektronů,
- dusíkové pravidlo,
- pravidlo ekvivalentů kruhů a dvojných vazeb (RDB pravidlo),
- charakteristická izotopická distribuce (např. u Cl a Br),
- správný poměr H/C atomů.

Při identifikaci metabolitů se na základě empirických předpokladů hledá domnělý metabolit jako neznámý iont, charakterizovaný  $m/z$ , který má vztah k parentní látce. Hlavním vodítkem je tu necílená LC-MS/MS analýza metabolického produktu, vzorku tzv. blankového biotransformačního prostředí a čistého roztoku zkoumané parentní struktury. Nezbytná je tandemová analýza MS, rozbor iontového chromatogramu a podrobné studium hmotnostního spektra, ze kterého vyvozujeme strukturu metabolitu na základě srovnávání jednotlivých fragmentů, jejich  $m/z$  a intenzity. Odtud získáváme informace, jak se původní iont rozpadl a jakou má pravděpodobnou strukturu, jelikož funkční skupiny poskytují charakteristické ztráty (například změna  $m/z = -18,01528$  z důvodu odštěpení molekuly vody z primárního alkoholu). (Záruba, 2016) Při velmi náročném určování chemické struktury z jejího HRMS fragmentačního spektra lze s výhodou využívat speciální software (např. MassFrontier, MetWorks) a databáze hmotnostní spekter (např. HMTB, mzCloud). Dále se využívají programy, které predikují lipofilitu molekul (např.  $\log P$ ), na jejímž základě lze interpretovat pozorované chromatografické vlastnosti neznámých metabolitů (tj. retenční čas).

U identifikace struktur uplatňujeme obecná pravidla jako (Holčapek, 2001):

1. pravidlo sudého počtu elektronů:
  - Fragmentací iontů s lichým počtem elektronů vznikají opět ionty s lichým počtem elektronů nebo ionty se sudým počtem elektronů

- Fragmentací iontů se sudým počtem elektronů vnikají pouze ionty se sudým počtem elektronů
- 2. Dusíkové pravidlo, platící pro ionty  $EE^+$ 
  - Při liché hodnotě  $m/z$  má molekula sudý počet dusíků
  - Při sudé hodnotě  $m/z$  má molekula lichý počet dusíků

## 1.6 Základní validační parametry pro analytické a bioanalytické metody

Validace je nezbytným krokem kontroly kvality u vyvíjených analytických metod a zároveň poskytuje důkaz, že daná analytická metoda bude poskytovat výsledky odpovídající daným specifikacím. Dle zákona musí každá klinická analytická či bioanalytická laboratoř provádět validaci metod. Validace se požaduje i u odborných vědeckých časopisů a článků. Validací analytických metod se zabývají organizace jako FDA (*Food and Drug Administration*), EMA (*European Medicines Agency*) a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Nováková, Douša 2013).

Výběr validačních parametrů je dán podle předpisů ICH (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) a zahrnuje:

- Správnost (accuracy),
- Přesnost (precision),
- Selektivitu
- Mez detekce
- Mez stanovitelnosti
- Linearitu
- Rozsah
- Robustnost

Správnost metody (accuracy, u českého názvosloví mají validační kritéria několik alternativ, kdy se například pro accuracy doporučuje používat termín přesnost) definujeme jako míru shody mezi nalezenou (výsledkem měření) a skutečnou (referenční) hodnotou, jejichž rozdíl se nazývá chyba výsledku. Chyba výsledku může být systematická (soustavná), nebo náhodná, kterou nelze odstranit. Poměr nalezené a referenční hodnoty se nazývá výtěžnost/návratnost a značí se v %.

Správnost dané metody můžeme zjistit:

1. analýzou modelového vzorku,
2. analýzou vzorku s přídatkem standardní látky,
3. analýzou vzorku s přídatkem známých nečistot,
4. použitím jiné nezávislé metody.

Přesnost metody (precision, popř. současně doporučený český ekvivalent preciznost) vyjadřuje míru shody nalezených výsledků pro více stanovení,

provedených se stejným vzorkem za předem daných podmínek. Přesnost můžeme vyjádřit jako opakovatelnost, mezilehlou přesnost a reprodukovatelnost.

- Opakovatelnost (repeatability) vyjadřuje přesnost metody mezi navzájem nezávislými výsledky za stejných podmínek a v krátkém časovém rozmezí.
- Mezilehlá přesnost (intermediate precision) vyjadřuje míru shody výsledků provedené v jedné laboratoři za možnosti analýzy jiným pracovníkem v rozdílný den nebo na jiném zařízení.
- Reprodukovatelnost (reproducibility) vyjadřuje přesnost shody výsledků analyzovaných mezi různými laboratořemi.

Linearita (linearity) se vyjadřuje jako schopnost dané metody v daném rozsahu poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. K určení linearity se připraví sada kalibračních roztoků o různých koncentracích, pokrývající rozsah metody (range). Rozsah metody se charakterizuje jako uzavřený interval hodnot, pro který je daná metoda použitelná. Používají se zde označení LLOQ (lower limit of quantitation), což je dolní mez stavitelnosti. A poté ULOQ (upper limit of quantitation), tedy horní mez stavitelnosti (Nováková, Douša 2013).

Mez detekce (detekční limit, LOD, limit of detection) je nejnižší koncentrace daného analytu ve vzorku, kterou lze detekovat. Mez stanovitelnosti neboli kvantitativní limit je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze stanovit s dostatečnou přesností a správností.

Selektivita metody (method selectivity) je schopnost dané metody charakterizovat kvalitativní i kvantitativní složení vzorku v přítomnosti dalších látek. Lze ji testovat na základě porovnání výsledků naměřených vzorků se vzorky standardu. Jelikož je selektivita metody závislá na použitém technickém vybavení, musí se proto vytvořit pro každý systém individuální program stanovení (Nováková, Douša 2013). Selektivita metody úzce souvisí s její specifitou, což je schopnost metody měřit pouze veličinu, která má být stanovena. Je také potřeba důkaz, že sledovaná látka neinterferuje s jinou látkou a zda se nevyskytují v dané analytické metodě významné matricové efekty.

Robustnost metody je míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení. K měření robustnosti metody se sledují změny dané metody (např. změny průtoku mobilní fáze, změny teploty kolonového termostatu). Robustnost lze stanovit pro změny jedné proměnné a vyjádřit ji dopadem na sledovaný retenční čas, chromatografickou selektivitu, přesnost kvantifikace či linearitu kvantifikace (jednorozměrná analýza dat). Lze také provést takzvanou vícerozměrnou analýzu dat, kdy se testují změny na základě plánovaných pokusů (Nováková, Douša 2013). Vedle robustnosti se rovněž ověřuje během validace tzv. působilost systému (system suitability test, SST), která v podstatě udává, zda jsou analytické přístroje pro danou metodu vhodné a poskytují stále spolehlivé výsledky i při malých odchylkách různých technických parametrů. SST je úzce spjat s běžnou praxí, kdy se pro validaci analytických metod mohou využívat jen tzv. kvalifikované a kalibrované přístroje.

## 1.7 Metody vývoje necílené LC-MS analýzy *in vitro* metabolitů

Studie metabolismu hrají důležitou roli při objevování, vývoji a charakterizaci léčiv. Důležitým nástrojem při identifikaci metabolitů léčiv je právě spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením. Dříve se k studiu metabolitů využívala spíše plynová chromatografie (GC), což je vysoce účinná a citlivá technika. Její nevýhoda spočívá v rozsáhlé přípravě vzorků, jelikož se při ní využívají pouze těkavé sloučeniny nebo sloučeniny, které se po derivatizaci stávají těkavé. Z toho důvodu se nyní upřednostňují vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra vysoce účinná kapalina chromatografie (UHPLC), u kterých není potřeba derivatizace analytů, lze je provádět při laboratorní teplotě a je u nich možná komplexnější analýza látek s využitím pestrého spektra stacionárních a mobilních fází a elučních režimů. U necílené LC-MS analýzy se využívá hmotnostní spektrometr, jako je TOF, Q-TOF nebo orbitrap, pracující v režimu plného skenování (*Gorrochategui, 2016*). Tento tzv. full scan režim umožňuje detekovat ionty analytů v širokém rozmezí hodnot  $m/z$ , což je východiskem pro odhalení neznámých látek ve zkoumaném vzorku. Z chromatografického pohledu je pro necílenou LC-MS analýzu vhodné využívat především gradientové eluční programy, které mohou separovat látky s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi během relativně krátké doby.

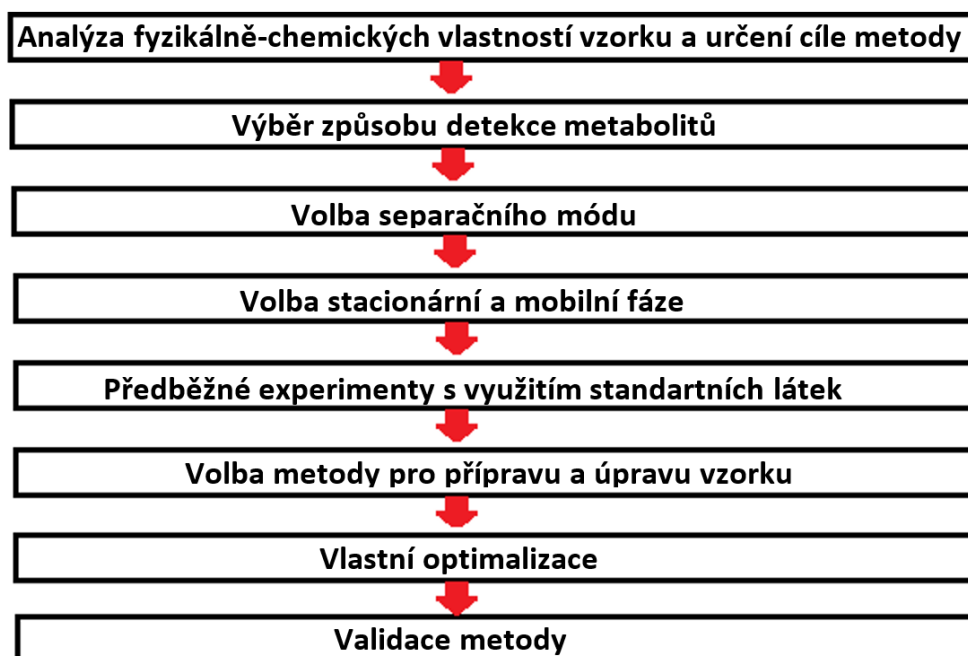
Spojení LC-MS a zlepšování analytických technik pro studium metabolitů vedlo k rozšíření datových souborů, jelikož z hmotnostní spektrometrie získáváme velké množství dat k velkému počtu měření (tj. MS spektrum v každém retenčním čase). Analýzu dat proto rozdělujeme analogicky k LC-MS analýzám na cílené a necílené studie metabolitů. U cílených studií se zaměřujeme na výzkum známých metabolitů, zatímco u necílené studie hledáme komplexnější informace ke studiu metabolitů, abychom mohli určit jejich neznámou chemickou strukturu a případně i množství. Z toho důvodu vyžaduje analýza dat pro necílené studie velmi rozsáhlé zpracování LC-MS chromatogramů (*Gorrochategui, 2016*).

Vývoj chromatografické metody zahrnuje volby podmínek k dosažení co nejdokonalejší separace pro následnou detekci látek, a to co v nejkratším možném čase. Předně se zkouší různé systémy stacionární a mobilní fáze. U mobilních fází se při vývoji např. obměňují kombinace rozpouštědel s různou eluční silou, upravuje se pH nebo se přidávají různá aditiva a modifikátory. Klasickou součástí vývoje chromatografické metody jsou testy elučních režimů (normální, polárně organický, reverzní) a elučních programů (např. gradientový, více krokový). Při vývoji chromatografické metody je nutné ale pamatovat na to, že v případě hmotnostně spektrometrické detekce jsou na mobilní fázi kladené určité podmínky (např. nepřítomnost látek s vysokou teplotou tání, nepřítomnost látek s vysokou persistencí v částech spektrometru) (*Riter et al. 2005*).

V rámci necílené hmotnostně spektrometrické analýzy je nutné volit kompromisní nastavení, které umožní stanovení nejvyššího počtu předpokládaných

analytů. V první řadě je potřeba zvolit polaritu detekčního módu a nastavit iontový zdroj (např. elektrické napětí, teplotu a průtok plynů u HESI). U některých hmotnostních spektrometrů lze k nejuvhodnějšímu nastavení využít autokonfigurační funkci nebo je možné správné parametry pro danou analytickou metodu nalézt v manuálu přístroje. Obecně se optimalizuje celá řada parametrů, které jsou specifické pro konkrétní typ hmotnostního spektrometru (např. napětí na S čočkách, kolizní energie). Pro úspěšnou identifikaci neznámých metabolitů má také zásadní vliv nastavení skenovacích režimů (např. velikost  $m/z$  oken, nastavení kolizní energie, tabulek či funkcí pro selekci prekurzorových iontů apod.)

Vývoj a optimalizaci LC-MS lze shrnout do následujících kroků zobrazených na Obr.11. Ke konfiguraci LS-MS metod lze rovněž využít některé počítačové programy a statistické techniky, které jsou schopné provádět multiparametrovou optimalizaci (Hecht et al. 2016).



**Obrázek 11:** Vývoj a optimalizace analytické metody.

## 1.8 Metody kvantifikace v LC-MS

Cílem analytických metod je vedle kvalitativního určení složek zkoumaného vzorku také stanovení množství jednotlivých složek. K tomuto účelu se v LC využívají různé metody kalibrace, které poskytují spolehlivý matematický vztah mezi velikostí odezvy detektoru a množstvím zkoumané složky vzorku. Z pohledu zpracování pozorovaných dat se tvorba kvantitativní metody LC vždy opírá matematickou regresi, pomocí níž se odvodí korelační vztah mezi plochou píku v chromatogramu (popř. i výškou píku za určitých podmínek) a odpovídajícím množstvím sledované látky ve vzorku. Nutnou podmínkou pro správnou konfiguraci kvantitativní analytické metody je v podstatě splnění validačních kritérií, která byla uvedena v předchozích kapitole. Validovanou analytickou metodou lze tedy primárně použít pro kvantifikaci jednoho či více analytů.

Principem kalibrace kvantitativních analytických metod je v podstatě vytvoření predikčního statistického modelu na základě strojového učení (tzv. machine learning) ze známých empirických dat. Kalibraci detekce jak v LC-UV či LC-MS metodách lze uskutečnit pomocí série kalibračních měření, jejichž technické provedení závisí na metodě úpravy zkoumaného vzorku a typu chyb, které při měření očekáváme. V analytické praxi se využívají tyto metody (Nováková, 2013):

- metoda vnějšího standardu (tzv. kalibrační křivky),
- metoda přídatku standardu,
- metoda vnitřního standardu,
- metoda vnitřní normalizace.

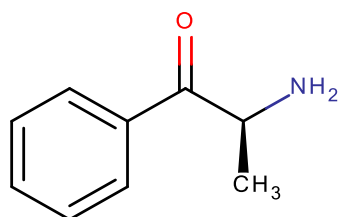
Metoda vnějšího standardu neboli kalibrační křivky je klasickou variantou odvození kvantitativní analytické metody. Je založena většinou na sestavení kalibrační přímky mezi nejméně 5 páry hodnot koncentrací a pozorovaných ploch pod píkem. V menší míře se také používají i jiné regresní funkce, jako je exponenciála. Tato data se stanoví LC-UV nebo LC-MS analýzou kalibrační série analytických standardů s koncentracemi, které rostou geometrickou řadou. Rovnice kalibrační přímky, která udává, jaká plocha pod píkem bude pozorována při analýze vzorku s určitou koncentrací analytu, slouží pak k vyhodnocení analýzy vzorků s neznámou koncentrací analytu. Protože jádrem kvantifikace je aplikace spolehlivého predikčního modelu, provádějí se kalibrační měření na všech kalibračních hladinách koncentrací třikrát a před akceptováním modelu se hodnotí výsledná statistická kritéria, jako je koeficient determinace, standardní reziduální odchylka nebo normalita reziduí.

Metoda externího standardu byla použita i pro kvantifikaci v této bakalářské práci. Ostatní metody kvantifikace se používají, když potřebujeme např. korigovat chyby, ke kterým dochází během úpravy vzorku (např. nepřesné pipetování, odpařování rozpouštědla) nebo, když postačuje určení relativní koncentrace analytu (metoda vnitřní normalizace). Podrobnosti o těchto metodách lze nalézt v citované odborné literatuře (Nováková, 2013).

## 1.9 Vlastnosti kathinonu a jeho derivátů

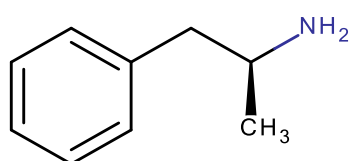
Kathinon, přesněji (S)-kathinon, je alkaloid obsažený v rostlině *Catha edulis* u které přispívá k jejím psychostimulačním účinkům. V čisté formě je (S)-kathinon nažloutlým práškem s nízkou teplotou tání ( $T_t = 46.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), který je dobře rozpustný v diethyleteru a methanolu, hůře však ve vodě (Pubchem). Chemicky je (S)-kathinon primárním aminem, podobný amfetaminům, liší se však obsahem prochirální ketonové funkční skupiny (Fojtíková, 2017). Tuto strukturní podobnost můžeme vidět na Obrázcích 12 a 13. Přičemž můžeme rovněž usoudit, že obě látky mají podobné fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti.





**Obrázek 12:** Strukturální vzorec (*S*)-kathinonu

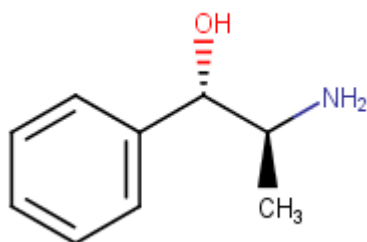
$$pK_A=7,55 \log P=1,176 \log D_{7,4}=0,79$$



**Obrázek 13:** Strukturální vzorec amfetaminu

$$pK_A=10,01 \log P=1,804 \log D_{7,4}=-0,81$$

*Catha edulis* (*khat*) je nejznámějším zástupcem rodu *Catha* z čeledi Celastraceae (jesencovité). Je to stromovitý keř původem z Etiopie, pěstuje se ale i uměle v jihovýchodní části arabského poloostrova a v řadě afrických států, jako například v Keni, Somálsku a Tanzanii (*Patočka, 1999*). V roce 1930 byl v této rostlině identifikovaný alkaloid jménem katin (Obr.14), který byl u ní považován za dominantní a hlavní aktivní složku. To se ale změnilo roku 1975, kdy byly katinové listy znovu analyzovány a zjistila se přítomnost dalšího alkaloidu, katinonu, který má podobnou strukturu jako katin. Testování účinků katinonu v roce 1994 potvrdilo, že (*S*)-katinon ((*S*)-(-)-2-amino-1-fenyl-propan-1-on) je hlavní účinná látka v rostlině *Catha edulis* a katin ((1*S*,2*S*)-2-amino-1-fenylpropan-1-ol, *D*-norpseudoefedrin) je jeho méně aktivní metabolit.



**Obrázek 14:** Strukturální vzorec katinu

$$pK_A=9,34 \log P=0,885 \log D_{7,4}=-1,09$$



**Obrázek 15:** Čerstvé listy khatu (*Catha edulis*). Převzato z: Wolff et al. 2016.

(S)-Kathinon je nestabilní látka, která se při sušení kathy po několika dnech rozkládá a dimerizuje na neaktivní 3,6-dimethyl-2,5-difenylpyrazin. Kromě (S)-kathinonu a kathinu katha produkuje rozmanité taniny, flavonoidy, steroidy a polyhydroxylované seskviterpeny (tzv. katheduliny). Pro své psychoaktivní účinky se (S)-kathinon stal předlohou strukturou několika desítek syntetických „kathinonů“, které nacházejí uplatnění ve farmakoterapii nebo jsou zneužívané jako psychostimulační drogy. Další informace o (S)-kathinonu jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

### 1.9.1 Farmakologie a toxikologie kathinonu

Během žvýkání mladých listů *Catha edulis* (Obr.15) se uvolňují aktivní složky kathy, z nichž je (S)-kathinon kvůli vyšší rozpustnosti v tucích více psychoaktivní než ostatní alkaloidy. (S)-Kathinon je v rostlině enzymaticky degradován na méně aktivní kathin. Degradace se v důsledku vystavení slunečního světla a tepla zrychluje, proto se rostliny obvykle balí do banánových listů.

Ve 100 g listů khatu se vyskytuje okolo 78-343 mg (S)-kathinonu. Během žvýkání se uvolní okolo 90 % účinné látky, jejichž účinky se objevují do 30 minut a trvají okolo 3 hodin. Mezi hlavní subjektivní účinky (S)-kathinonu patří euforie, pocit zvýšené bdělosti a nadbytku energie. Hlavní cesta absorpce kathinonu je ústní sliznice, kde se absorbuje přibližně ze 60 %. Zbytek požitého (S)-kathinonu je následně absorbován gastrointestinálním traktem. (S)-Kathinon se metabolizuje v lidském těle z části na kathin, norefedrin a norpseudoefedrin. Ze 7 % dávky se pak vylučuje nezměněný močí (Amitava Dasgupta, 2019).

Komplikace při užívání (S)-kathinonu jsou podobné komplikacím pozorovaným při používání amfetaminů. (S)-Kathinon je však méně psychostimulační než amfetamin, ačkoliv některé studie prokázaly ekvivalentní dopaminergní účinek na centrální nervový systém (CNS). Negativní účinky (S)-kathinonu na lidský organismus zahrnují kardiovaskulární potíže, zvýšený krevní tlak a je zde spojení se zvýšeným

rizikem mrtvice a úmrtí. V některých případech byla též pozorována souvislost abusu khatu se vznikem rakoviny jazyka a s poškozením jater. Khat účinkem na periferní nervový systém způsobuje zácpu, zadržování moči a akutní kardiovaskulární problémy. Působení na CNS dále vyvolává zvýšenou bdělost, závislost a psychiatrické příznaky. Vysoké dávky (*S*)-kathinonu vyvolávají psychotické reakce, po odeznění účinku naopak přichází deprese, podrážděnost, anorexie a nespavost.

### 1.9.2 Mechanismus účinku kathinonu

(*S*)-Kathinon působí na CNS podobnými stimulačními účinky jako amfetaminy. Všechny kathinony, zahrnující přírodní (*S*)-kathinon a jeho syntetické deriváty, jsou inhibitory monoaminových transportérů. Mechanismus účinku (*S*)-kathinonu spočívá ve stimulaci uvolňování dopaminu a inhibici jeho zpětného vychytávání, podobně jako u amfetaminu. (*S*)-Kathinon se dále váže na dopaminové a serotoninové receptory, nejvyšší afinitu má však k norefedrinovým receptorům.

### 1.9.3 Využití kathinonu

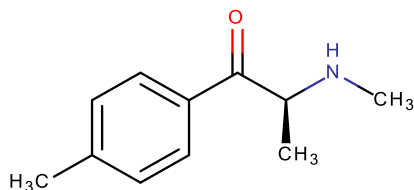
Přírodní kathinony v listech *Catha edulis* se mohou žvýkat nebo sušit na čaj, který je známý pod názvem „Abyssinia“. Dále se pak khat vysušuje na prášek, který lze konzumovat jako pasta s medem, nebo se využívají jeho alkoholové výtažky. Kathinon se objevil i ve formě tobolek, jako například kapsle Hagigat, které obsahují 200 mg kathinonu (*Kelly John P., 2011*). Tyto kapsle byly v izraelských ulicích dostupné jako přírodní stimulant a afrodiziakum. Globální distribuce khatu se v posledních desetiletích výrazně zvýšila, tudíž je khat dostupný na evropském i americkém trhu. Objevil se například na nezákonných drogových trzích Spojených států, Kanady nebo Nového Zélandu. Kathinon byl přidán do seznamu kontrolovaných látek v roce 1993 a je zakázán v evropských zemích, Spojených státech a v Kanadě. Naproti tomu je užívání rostlin khat legální v Jemenu, Somálsku a Etiopii.

Syntetické kathinony se mohou užívat orálně, intravenózně nebo rektálně a mají podobné účinky kokainu a metamfetaminům. K dostání jsou syntetické kathinony především v krystalické formě jako koupelové soli a dají se zakoupit v internetových obchodech např. pod anglickými názvy (Bliss, Magic, Meow Meow). Užíváním těchto látek může dojít ke komplikacím jako jsou halucinace, paranoia, neklid nebo sebevražedné myšlenky. Dále pak k poruchám srdečního rytmu, hypertenzi nebo špatnému prokrvení periferních tkání.

### 1.9.4 Deriváty kathinonu

V současné době známe přibližně 30 derivátů kathinonu, které zahrnují širokou škálu látek, jako je například butylon, ethylon, methylon a mefedron (4-methylmethkathinon). Tyto látky jsou takzvané beta-keto značkové léky a vznikly změnou struktury kathinonu. Nejběžněji dostupné beta-keto kathinony prodávané na nelegálním trhu až do roku 2010 byly mefedron a methylon (*Brunt et al., 2011*). Mefedron (Obr.16) je syntetická stimulační droga, která může být ve formě kapslí, tablet nebo bílého prášku. Do roku 2009 byl mefedron velice rozšířen jako legální a levná alternativa k 3,4-methyldioxymethamfetaminu (extáze, MDMA). Dále se pak

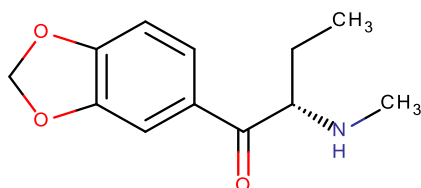
může objevit ve směsi s methylonem jako produkt zvaný „bubliny“ nebo jako směs s butylonem.



**Obrázek 16:** *Strukturní vzorec mefedronu*

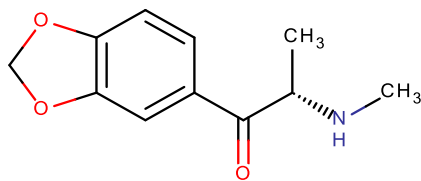
$$pK_A=8,05 \log P=2,122 \log D_{7,4}=1,39$$

Dalšími deriváty katinonu jsou methylon a butylon, zobrazené na obrázcích 17,18. Methylon se objevil pod obchodním názvem „Exploze“ kolem roku 2004 a podobně jako mefedron vykazuje účinky souhlasné k MDMA. V Nizozemsku se prodává jako kapalina v lahvičkách, označené jako „osvěžovač vzduchu“. (Bossong 2005) Butylon působí jako stimulant s podobnými účinky jako methylbenzodioxylbutanamin (MBDB). Spolu s methylonem je zakázán pouze ve Velké Británii, USA a Dánsku (López-Arnau, 2012).



**Obrázek 17:** *Strukturní vzorec butylonu*

$$pK_A=8,12 \log P=1,754 \log D_{7,4}=0,96$$

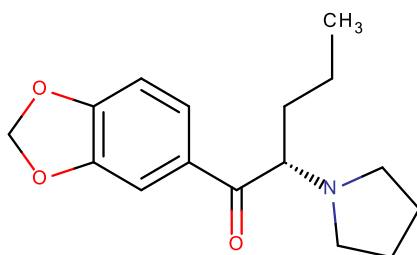


**Obrázek 18:** *Strukturní vzorec methylonu*

$$pK_A=7,96 \log P=1,231 \log D_{7,4}=0,57$$

Další syntetický derivát vyvinut roku 1969 jako centrální stimulant je MDPV (3,4-methylenedioxyprovaleron), zobrazený na Obr.19. Podobně jako methylon se MDPV

prodává ve specializovaných a internetových obchodech pod různými názvy jako: Magic, Maddie, Black Rob nebo Ivory. Obvykle se vyskytuje jako bílý, hnědý nebo žlutozelený amorfni krystalický prášek.



**Obrázek 19:** Strukturální vzorec MDPV

$$pK_A=7,31 \log P=2,987 \log D_{7,4}=2,73$$

## 1.10 Současné poznatky o biotransformaci kathinonu a jeho derivátů

### 1.10.1 Biotransformace kathinonu

Hlavní biotransformace tzv. prvního průchodu (neboli first-pass effect či předsystémový metabolismus) (*S*)-kathinonu probíhá u člověka v játrech, kde z něj primárně vzniká norefedrin ((1*S*,2*R*)-2-amino-1-fenylpropan-1-ol), což je diastereomer kathinu ((1*S*,2*S*)-2-amino-1-fenylpropan-1-ol, *D*-norpseudoefedrin). Biotransformace probíhá poměrně rychle, přičemž poločas eliminace kathinonu z plasmy je přibližně  $1.5 \pm 0.8$  hodiny. Naproti tomu poločas eliminace u kathinu má hodnotu zhruba  $5.2 \pm 3.4$  hodiny.

V roce 1975 provedli Maitai a Mugera experiment s močí čtyř dobrovolníků, kterým byly podávány listy *Catha edulis*. V moči se pomocí metody TLC (thin layer chromatography) a plynové rozdělovací chromatografie (GLC) cíleně identifikoval *D*-norpseudoefedrin neboli kathin jako hlavní metabolit. Výsledek v tomto experimentu vyšel pozitivní, jelikož sloučenina izolovaná z moči měla stejnou  $R_f$  hodnotu jako referenční kathin ve všech použitých systémech rozpouštědel.

Použitá rozpouštědla:

1. butanol-kyselina octová-voda (60:15:25),
2. butanol nasycený vodou,
3. methanol-amoniak (100:1,5),
4. isopropanol-voda-amoniak (80:15:5).

U plynové rozdělovací chromatografie (GLC) vyšel retenční čas pro základní sloučeninu izolovanou z moči stejně jako u kathinu. Tento výsledek potvrdily i pozdější experimenty s (*S*)-kathinonem, kde se pracovalo také s metodou TLC a GLC (*Guantai a Maitai 1983*).

Dalším zkoumáním metabolitů (*Brenneisen a Geisshüsler 1986*) se zjistilo, že kathinon je metabolizován redukcí  $\beta$ -keto skupiny na aminoalkoholy, vylučované močí. Cílem této práce bylo identifikovat hlavní metabolity kathinonu v lidské moči a studovat možné rozdíly v metabolické cestě opticky čistých izomerů a racemátů syntetického kathinonu. Racemický kathinon hydrochlorid byl syntetizován modifikovanou verzí Gabrielovy syntézy používající propiofenon jako výchozí materiál. Enantiomery kathinonu pak byly připraveny separací racemátu kyselinou (+)-P-gáforsulfonovou. Opticky čisté kathinonové enantiomery se stanovily podle použité metody *Berrang et al. (1982)*, kde se využila příprava diastereomerních, nesymetrických močovín a produkty se pak analyzovaly pomocí HPLC. (S)-(-)-kathinon byl získán v 96% čistotě a (R)-(+)-kathinon v 90% čistotě. V tomto experimentu byl lék podáván třem dobrovolníkům perorálně ve formě tablet, obsahující (S)-kathinon oxalát, (R)-kathinon oxalát nebo (R)-kathinon hydrochlorid. Vzorky moči pak byly odebrány po více než 24 hodinách. Metabolity se identifikovaly pomocí GC/MS a HPLC jako norefedrin a norpseudoefedrin. Pro metodu plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) se využívala metoda derivatizace kyselinou trifluoroctovou (TFA). Nastavené podmínky pro GC analýzu byly:

1. nosný plyn helia při průtokové rychlosti 3 ml.min<sup>-1</sup>
2. kapilární kolona s oxidem křemičitým OV-1701 s 25 m (Carlo Erba, Milano)
3. teplotní program od 84° do 170° při 3° za min<sup>-1</sup>

Výsledky metody GC/MS:

1. kathinon-TFA: retenční čas 18,1 min a hmotnostní fragmentační spektrum identické se spektrem získaným ze syntetického materiálu kathinonu s ionty  $m/z$  (rel. intenzita) 77 (40), 105 (100), 140 (3).
2. Norpseudoefedrin-TFA: retenční čas 25,1 min, hmotnostní spektrum identické s hmotnostním fragmentačním spektrem syntetického norpseudoefedrinu s ionty  $m/z$  77 (45), 79 (80), 105 (15), 107 (100), 126 (5), 141 (80)
3. Norefedrin-TFA: retenční čas ve výši 25,4 min a stejné hmotnostní spektrum jako norpseudoefedrin-TFA
4. Amfetamin-TFA (interní standard): retenční čas 15,6 min a ionty  $m/z$  77 (5), 91 (50), 118 (95), 140 (100).

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) se využila pro kvantitativní stanovení hlavního metabolitu kathinonu. Použita byla achirální stacionární fáze typu C18 a isokratická eluční metoda. Naměřené retenční časy byly:

1. kathinon 10,6 min
2. (+)-amfetamin (inertní standard) 12,4 min
3. R/S-(-)-norefedrin 15,0 min,
4. R/R-(-)-norpseudoefedrin 15,9 min

Brenneisen a kol. prokázali dále, že hlavním metabolitem (R)-kathinonu vylučovaným močí je norpseudoefedrin ((1R,2R)-2-amino-1-fenylpropan-1-ol), a dedukovaly tudíž závěr, že během biotransformace dochází u obou enantiomerů kathinonu ke stereospecifické redukci ketoskupiny ze strany *Si*. Z jejich jednoduché studie vyplynulo, že u enantiomerů kathinonu dochází při biotransformaci k částečně

racemizaci, protože k racemizaci těchto látek docházelo zřejmě díky příspěvku keto-enol tautomerie i v čistých vodných roztocích. Přítomnost jiných metabolitů katinonů v moči tato studie nezjišťovala.

Taschwer a kol. vyvinuli roku 2014 chirální isokratickou HPLC metodu, pomocí které dokázali separovat směs 20 derivátů katinonu a 6 derivátů amfetaminu. K separaci využili klasickou reverzní fázi typu C18 (tj. LiChrospher 100 RP-18e, 250 x 4 mm / 5 um) a mobilní fázi obsahující sulfatovaný  $\beta$ -cyklodextrin jakožto chirální selektor. Optimální výsledky byly získány při použití MF s 2.5 % methanolu, 97.5 % methanolu (v/v) a 2 % sulfatovaného  $\beta$ -cyklodextrinu na celkový objem MF.

V odborné literatuře lze nalézt další LC-MS studie, které se věnovaly analýze katinonu či jeho derivátů např. ve vzorcích vlasů, slin, krve, moči či odpadních vod.

### 1.10.2 Biotransformace derivátů katinonu

*Mefedron:*

Zjistit metabolity mefedronu bylo cílem studie z roku 2010 (*Meyer M.*), kdy se zkoumala lidská a potkaní moč pomocí technik GC/MS. V moči potkanů bylo zjištěno šest fází metabolitů mefedronu, zatímco v lidské moči se našlo sedm metabolitů. Pro metabolismus mefedronu byly stanoveny následující překrývající se metabolické dráhy:

1. odstraněním methylové skupiny mefedronu vznikají primární aminy, zodpovědné za metabolity nor-mefedron, nordihydromefedron a nor-hydroxytolyl mefedron,
2. redukcí ketonové skupiny vznikají alkoholy produkující nordihydromefedron a 4-karboxydihydromefedron,
3. tolylové skupiny se oxidují na odpovídající alkohol a karboxylovou kyselinu jako metabolity hydroxytolyl mefedron a nor-hydroxytolyl mefedron.

*MDPV (3,4-Methylenedioxypropylvaleron):*

Studie provedená Meyerem roku 2010 na základě analýzy moči potkana ukázala, že MDPV podstupuje složitější biotransformační kroky, které také zahrnují oxidaci a hydroxylaci. Stejněho roku provedli Strano-Rossi a jeho kolegové výzkum, kde použili *in vitro* model s pomocí lidských jaterních mikrosomů a buněčných S9 frakcí. Výsledné metabolity byly následně extrahovány a analyzovány jako deriváty trimethylsilylu (TMS) použitím plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Dále byl použit kapalinový chromatograf ve spojení s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem s měřením doby letu (LC / QTOF) pro přesné potvrzení struktury metabolitů. Studie prokázaly, že hlavními metabolity MDPV jsou katechol a methylkatecholpyrovaleron.

## 2 Cíl a metodologie práce

Cílem této bakalářské práce bylo provést *in vitro* biotransformaci (S)-kathinonu pomocí lidských jaterních mikrosomů a s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem identifikovat a charakterizovat vzniklé metabolity.

Cíle bakalářské práce můžeme vyjádřit následujícími body:

- Popsat základy biotransformace a její základní *in vitro* modely
- Charakterizovat základy LC ve spojení s MS
- Uvést poznatky o (S)-kathinonu a jeho biotransformaci
- Provést biotransformační experiment s (S)-kathinonem v prostředí HLM
- Navrhnout a optimalizovat LC-MS metodu
- Identifikovat a charakterizovat metabolity (S)-kathinonu
- Stanovit stabilitu (S)-kathinonu v HLM prostředí



## 3 Praktická část

### 3.1 Použité chemikálie

V experimentální části této bakalářské práce byly jako *in vitro* modely biotransformace využité lidské poolované jaterní mikrosomy (HLM), k jejichž aktivaci byl použit roztok RapidStart. HLM se připravily z lidské jaterní tkáně od 200 dárců různého pohlaví a dodavatel u HLM deklaroval aktivitu cytochromu b5 (0,369 nmol/mg proteinu), aktivitu cytochromů P450 (0,478 nmol/mg proteinu) a NADPH cytochromu-c-reduktásovou aktivitu ( $162 \pm 7$  nmol/mg proteinu/min). Roztok RapidStart NADPH regenerační systém byl složen z 0,5 ml 100 mM NADP, 0,5 ml 500 mM glukózy-6-fosfátu a 0,5 ml glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy. HLM i Rapid start byli zakoupeny od firmy XenoTech.

(S)-kathinon použitý v této bakalářské práci byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich jako roztok (S)-hydrochloridu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml (označení C-019-1ML).

K přípravě vzorku pro metabolickou studii byl použit chlorid hořečnatý (HPLC čistota, Sigma Aldrich), fosfátový pufr (HPLC čistota, Sigma Aldrich) a ultračistá voda (kvalita ASTM typu I). Pro ukončení metabolického experimentu se používal vychlazený acetonitril (ACN, LCMS čistota, Sigma Aldrich) na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Mobilní fáze A byla připravena přidáním kyseliny mravenčí (FA, LCMS čistota, Sigma Aldrich) do ultračisté vody (0,1 %, v/v). U mobilní fáze B se FA přidala do acetonitrilu (0,1 %, v/v).

### 3.2 Použité přístroje, pomůcky a počítačové programy

#### 3.2.1 Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 složený z binárního vysokotlakého čerpadla LPG - 3400RS, vakuového odplynovače, kolonového termostatu TCC - 3000, autosampleru WTS - 3000 s nástřikovou smyčkou o objemu 25  $\mu\text{l}$  a UV/VIS detektoru DAD - 3000 (ThermoFisher Scientific, Německo)
- Hmotnostní spektrofotometr Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Německo)
- Analytické váhy Sartorius CPA225D - 0CE (Sartorius AG, Německo)
- Přístroj pro ultračistou vodu Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (ThermoFisher Scientific, Bremen, Německo)
- Třepačka Labdancer IKA (Merci, s.r.o, Brno)
- Ultrazvuková lázeň Elma S 40 (UNIPRO - ALPHA C. S., spol s r.o., Praha)
- Přístroj Eppendorf ThermoTop Thermomixer C (Eppendorf, North America)
- Ultracentrifuga Universal 320R (Schoeller Instruments s.r.o., Praha)

### 3.2.2 Pomůcky

- Pipety Eppendorf® Reference (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)
- Skleněné konické inserty (Fischer Scientific)
- Laboratorní špičky Eppendorf® pro pipety
- Lednice (- 20 °C) a hlubokomrazící box (pro - 80 °C)

### 3.2.3 Výpočetní programy

- Chromeleon 6.80
- Xcalibur 3.0.63
- Mass Frontier 7.0
- ChemOffice 2012
- MarvinSketch 18.10
- Microsoft Excel 365 ProPlus

## 3.3 Použité chromatografické kolony

- Kolona Kinetex C18, 150x3 mm, 2,6 µm, Phenomenex
- In-line filtr s kovovou fritou s velikostí pórů 2 µm

## 3.4 Příprava vzorků (*S*)-kathinonu a mikrosomálního prostředí

Zásobní roztok (*S*)-kathinonu v methanolu ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) byl uchováván v chladničce při  $- 20 \text{ °C}$  bez přístupu světla. Před použitím byl zásobní roztok (*S*)-kathinonu vytažen z lednice a na laboratorním stole samovolně vytemperován na laboratorní teplotu. Ze zásobního roztoku (*S*)-kathinonu se poté připravila kalibrační řada roztoku (*S*)-kathinonu v methanolu o koncentraci  $5 \text{ µM}$ ,  $10 \text{ µM}$ ,  $25 \text{ µM}$ ,  $50 \text{ µM}$ ,  $75 \text{ µM}$  a  $100 \text{ µM}$ . Vypočítané množství zásobního roztoku (*S*)-kathinonu bylo rozpuštěno v methanolu tak, aby objem výsledného roztoku činil 1 ml.

Dále jsme si připravili i lidské jaterní mikrosomy a aktivační roztoky RapidStartu. Zmrazené HLM jsme po doručení nechali volně rozmrazit při laboratorní teplotě a poté je rozdělili do plastových mikrozkušavek (tzv. eppendorfek) po 25 µl. Tyto eppendorfky jsme následně popsali a uložili do hlubokomrazícího boxu při teplotě  $- 80 \text{ °C}$  pro další použití. Roztoky RapidStartu jsme připravili smícháním 1,5 ml původního RapidStartu s 3,5 ml ultračisté vody. Tento roztok jsme protřepali na třepačce, rozdělili je do vialek po 50 µl, popsali a uložili do hlubokomrazícího boxu při  $-80 \text{ °C}$ . Z alikvotů HLM a RapidStartu bylo připraveno mikrosomální prostředí pro biotransformační experimenty, jak je podrobně popsáno v následující kapitole.

## 3.5 Biotransformační experimenty

Biotransformační experiment byl proveden ve třech eppendorfkách, kdy se do každé z nich přidalo 25 µl HLM a 50 µl RapidStartu. Tato směs se poté 10 sekund třepala na laboratorní třepačce (vortexu) a následně se do ní přidalo 10 µl roztoku (*S*)-kathinonu v methanolu o takové koncentraci, aby ve finálním objemu 500 µl bylo dosaženo těchto koncentrací (*S*)-kathinonu:  $25 \text{ µM}$ ,  $50 \text{ µM}$  a  $75 \text{ µM}$ . Následně se do eppendorfek přidalo 405 µl z připraveného roztoku solno-fosfátového pufru

v ultračisté vodě ( $c = 200 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ), Solno-fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním 1 tablety PBS v 200 ml ultračisté vody. Jako poslední se přidalo 10  $\mu\text{l}$  roztoku chloridu hořečnatého v ultračisté vodě o koncentraci 200 mM. Tyto tři eppendorfky se u prvního experimentu umístily na 12 hodin do temperované třepačky a inkubovaly se při 37 °C a 500 otáčkách/minutu. U dalších experimentů se doba inkubace lišila a daný experiment se inkuboval po dobu 1 hodiny a 4 hodin. Po dokončení inkubační doby se metabolismus ukončil přidáním (tzv. zhašením) 500  $\mu\text{l}$  ACN vychlazeného na -20°C. Po ukončení metabolismu se eppendorfky umístily do centrifugy a vzniklá mikrosuspence se separovala při 20 °C po dobu 20 minut a odstředivé síle 21250 g. Z eppendorfek se pak odebralo 200  $\mu\text{l}$  supernatantu do tří skleněných insertů s plochým dnem a následovala LC-MS/MS analýza. Tento postup byl vyvinut v laboratoři CBV a navazoval na předchozí biotransformační studie (Nepovimova et al., 2015).

### 3.6 Návrh a optimalizace LC-MS metody pro analýzu metabolitů katinonu

Pro každou analýzu jsme si nejprve připravili mobilní fáze o složení MF1: H<sub>2</sub>O+ 0,1% FA, MF2: ACN+ 0,1% FA. Takto připravené mobilní fáze jsme odplynili v ultrazvukové lázni po dobu minimálně 5 minut a poté zapojili do chromatografického systému. Podmínky metody HPLC před spuštěním metody jsme nastavili podle Tabulky 2 a podmínky metody hmotnostní spektrometru podle Tabulky 3.

**Tabulka 2:** Parametry nastavení HPLC metody.

Parametr metody	Hodnota
Délka metody	20 min
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Nástřikový objem	5 $\mu\text{l}$
Teplota kolonového termostatu	27 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Eluční program	Lineární gradient
Kolona	Kinetex C18, 150x3 mm, 2,6 $\mu\text{m}$
Mobilní fáze	MF1: H <sub>2</sub> O + 0,1% FA (v/v) MF2: ACN + 0,1% FA (v/v)
Vlnové délky při UV-VIS detekci	210, 254, 270, 290 nm
Vlnové délky pro spektrální detekci 3D Field	210-350 nm / krok 2 nm

**Tabulka 3:** Parametry nastavení MS metody.

Parametr metody	Hodnota
Průtok stínícího plynu	50
Průtok pomocného plynu	13
Průtok rozptylového plynu	3
Teplota sprejovací kapiláry	300 °C

<b>Teplota pomocného plynu</b>	300 °C
<b>Počet mikroscanů</b>	1
<b>Nastavení S-lens</b>	50
<b>Maximální nástřikový čas</b>	200 ms
<b>Kontrola automatického zisku</b>	3e6
<b>Napětí sprejovací kapiláry v MS+ módu</b>	3,5 kV
<b>Normalizovaná kolizní energie NCE</b>	35

V této bakalářské jsme použili tři typy záznamů hmotnostního spektrometru. A to fragmentaci všech iontů (all ion fragmentation, AIF), data dependentní skenování (dd-MS<sup>2</sup>) v kombinaci s Full MS. A jako třetí selektivní záznam jednoho nebo více iontů (Selected Ion Monitoring, SIM). Parametry daných typů záznamů jsou uvedeny v Tabulce 4.

*Tabulka 4: Typy záznamů MS a jejich parametry.*

<b>Metoda</b>	<b>Full-MS/AIF</b>	<b>SIM/MS<sup>2</sup></b>	<b>Full-MS/ddMS<sup>2</sup></b>
<b>Rozlišení</b>	140 000	140 000	70 000
<b>AGC</b>	3e6	5e5	2e5
<b>Maximální IT</b>	100 ms	100 ms	100 ms
<b>NCE</b>	35	35	35
<b>Rozsah skenování</b>	50 to 750 <i>m/z</i>	50 to 750 <i>m/z</i>	50 to 750 <i>m/z</i>
<b>Počet smyček</b>	-	1	1
<b>Izolační okno</b>	-	4.0 <i>m/z</i>	4.0 <i>m/z</i>

Během LC-MS analýz bylo nastavení MS různě obměňováno, ale celkově nejlepších výsledků co do počtu identifikovaných metabolitů bylo dosaženo metodami popsány v Tabulce 4. U metody SIM/MS<sup>2</sup> byly na základě předchozích analýz, provedených v této bakalářské práci, do tzv. inclusion listu zahrnuty 4 ionty, které odpovídaly protonovaným iontům (S)-kathinonu a jeho 3 identifikovaným metabolitům (tj. *m/z* = 151.091, 152.107, 166.086, 182.081).

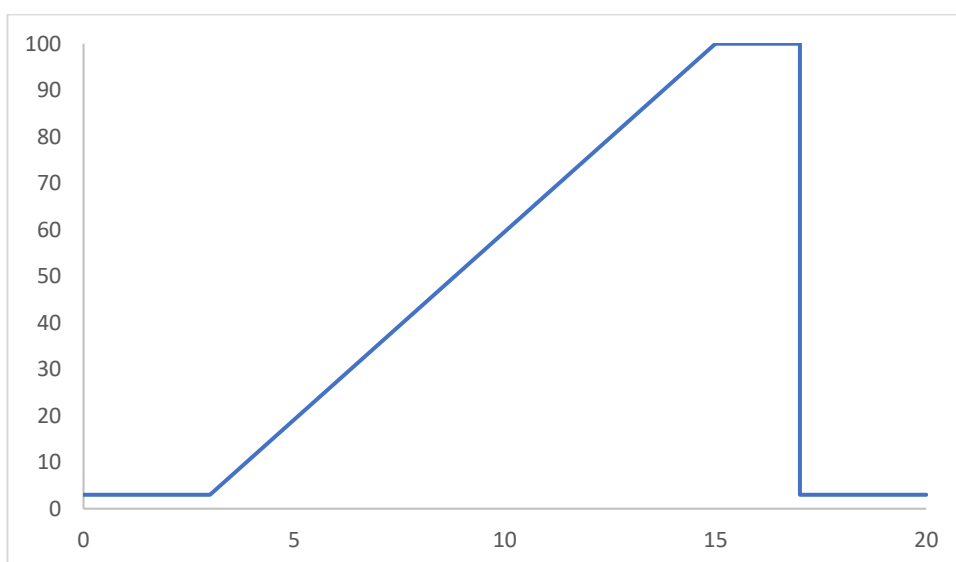
LC-MS metoda byla vyvinuta s využitím citované odborné literatury a na základě našich analytických zkušeností.

## 3.7 Identifikace a charakterizace metabolitů (*S*)-kathinonu

### 3.7.1 LC-MS analýza roztoku (*S*)-kathinonu v methanolu ( $c = 50 \mu\text{M}$ )

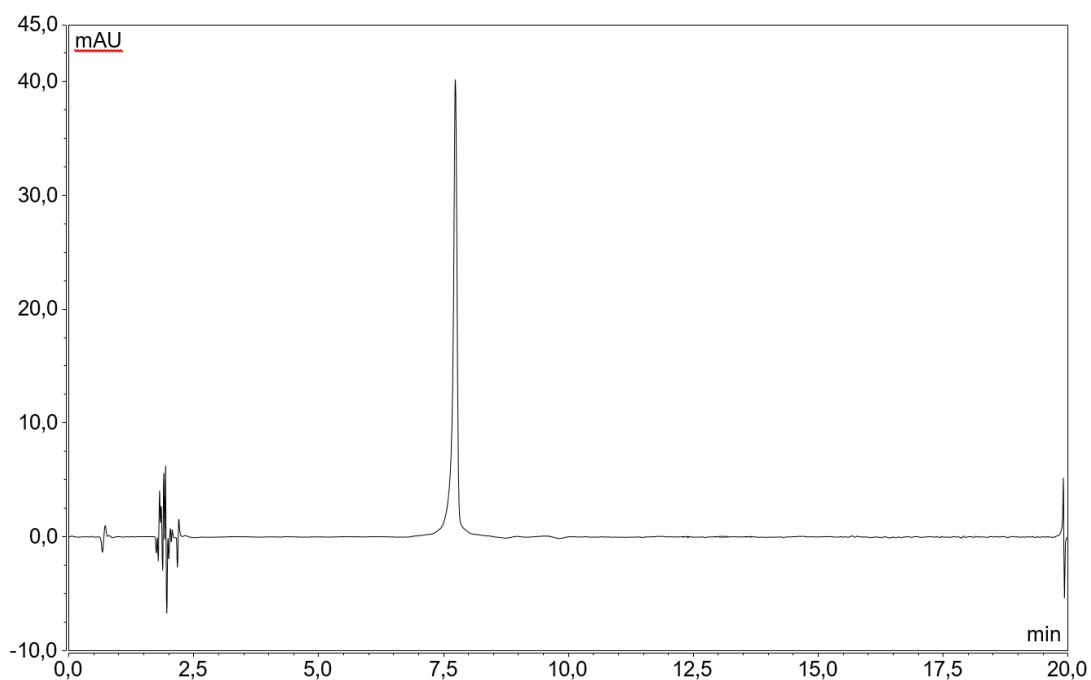
Jako první se analyzoval roztok parentní látky, tedy (*S*)-kathinonu v methanolu pomocí LC-MS/MS analýzy s vřazenou UV detekcí, díky čemuž se zkoumané látky charakterizují jak pomocí UV chromatogramu (Obr.21), tak pomocí extrahovaného iontového chromatogramu (XIC, Obr. 22) a fragmentačního hmotnostního spektra.

Pro chromatografické analýzy byl používán eluční systém reverzního typu, přičemž mobilní fáze byla kombinována lineárním gradientem ze dvou složek (MF1:  $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{FA}$  (v/v), MF2:  $\text{ACN} + 0.1\% \text{FA}$ ). Podrobnosti o nastavení analytické metody byly uvedeny v Tabulkách 3. a 4. Použitý lineární gradient je charakterizován na Obrázku 20.



**Obrázek 20:** Použitý lineární gradient pro LC-MS/MS analýzu.

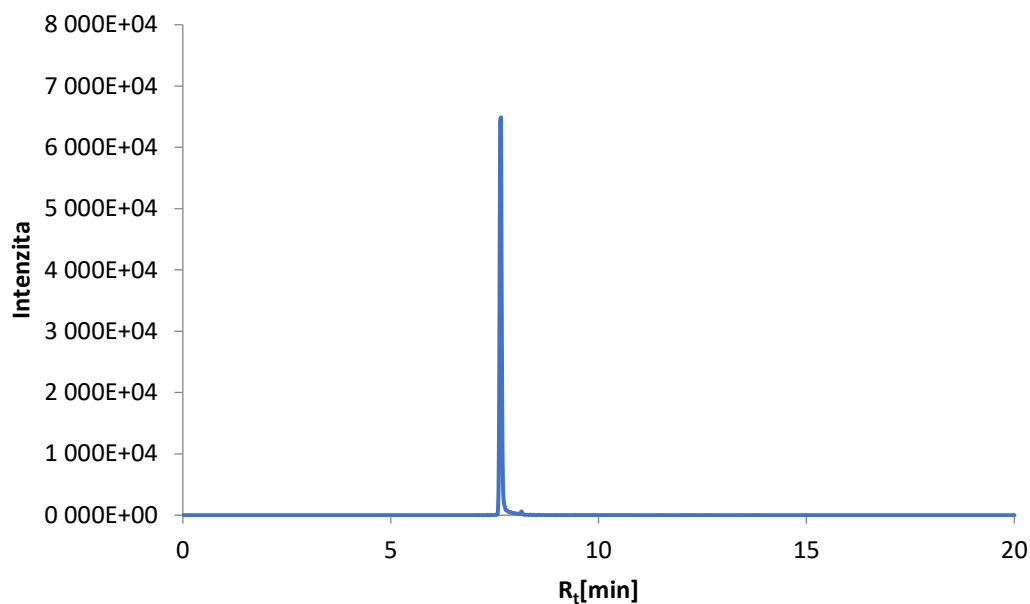
UV chromatogram (*S*)-kathinonu stanovený LC-UV analýzou je zobrazen na Obr. 21, chromatografický pík má retenční čas 7,639 minut a spolu s dalšími chromatografickými vlastnostmi je uveden v Tabulce 5.



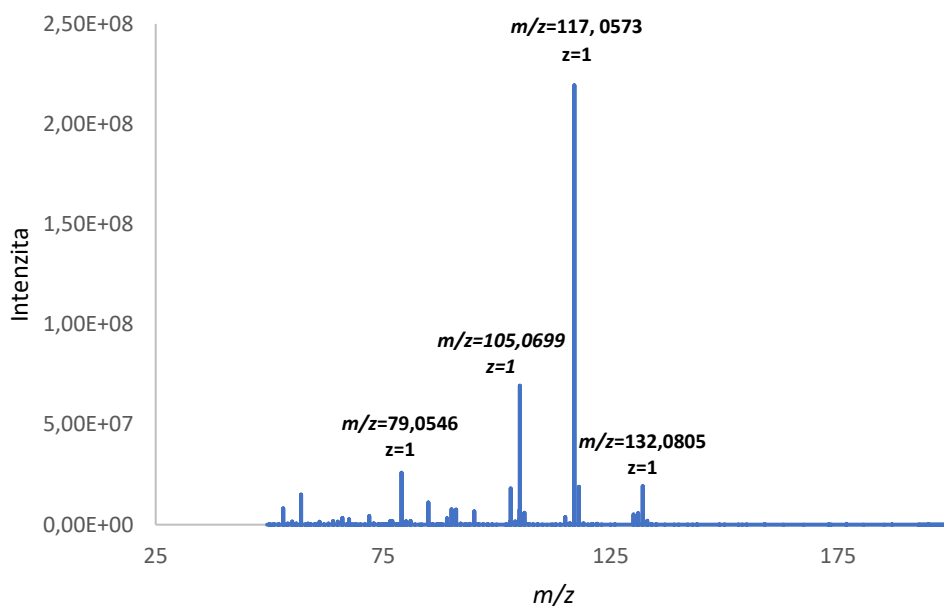
**Obrázek 21:** UV Chromatogram roztoku *S*-kathinonu v methanolu ( $c = 50\mu\text{M}$ ). Chromatogram byl získán gradientovou eluční metodou na stacionární fázi typu C18 při vlnové délce 254 nm.

**Tabulka 5:** Chromatografické vlastnosti *S* stanovené pomocí LC-UV analýzy, která je zobrazená na Obrázku č.21.

Parametr	Hodnota
Retenční čas [min]	7,637
Výška píku [mAU]	10,699
Plocha pod píkem [mAU.min]	0,566
Šířka píku v polovině výšky [min]	0,05
Koncentrace [ $\mu\text{M}$ ]	50
Asymetrie	1,16
Počet teoretických pater	140351
S/N číslo	189,1

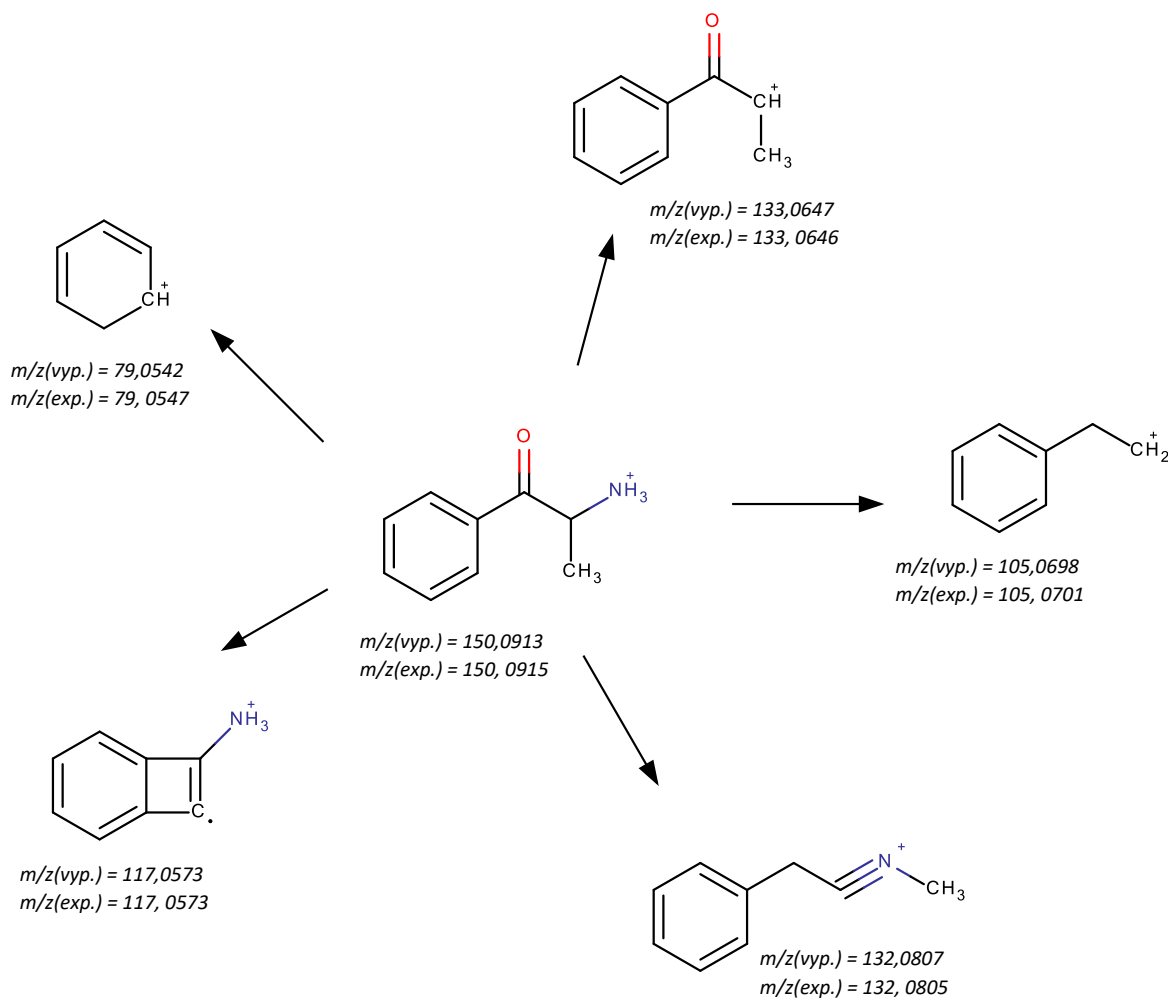


**Obrázek 22:** Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) (*S*)-kathionu ( $m/z = 150.089 - 150.092$ ).



**Obrázek 23:** Fragmentační spektrum *S*-kathionu s vyznačenými nejintenzivnějšími fragmenty.

Na základě komplexní analýzy fragmentačního spektra (Obr. 23) jsme následně určili hypotetické fragmenty parentní látky, které lze vidět na Obr. 24. Tyto fragmenty a jejich sumární vzorce jsme určovali pomocí programu X-calibur a Mass frontier. Těž jsme využívali různá empirická pravidla pro rozbor hmotnostních spekter, jako např. RDB pravidlo, a v neposlední řadě také vlastní chemickou intuici.



**Obrázek 24:** 5 hypotetických fragmetů S-kathionu. Pod jednotlivými vzorci jsou uvedeny vypočítané (vyp.) a experimentálně stanovené (exp.) hodnoty  $m/z$ .

Problematika odvození hypotetických struktur fragmentů bude důkladně rozebrána až v kapitole Diskuze. Nyní jen zdůrazníme, že hypotetické struktury fragmentů by bylo potřeba nejprve ověřit kvantově-chemickou studií a pokročilou tandemovou MS vyšších řádů, abychom je mohli považovat za přijatelné.

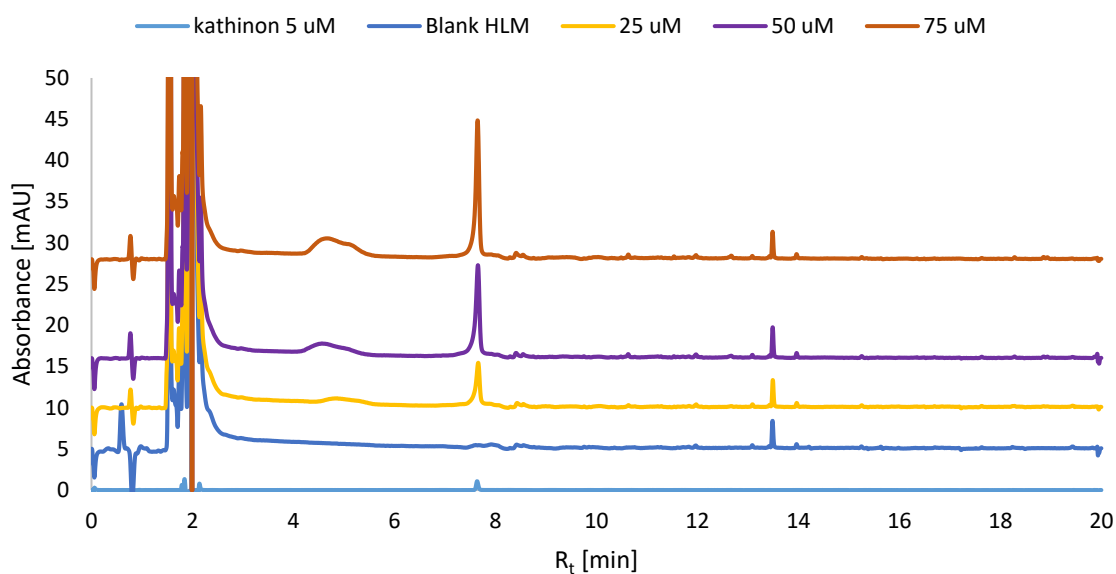


### 3.7.2 Biotransformační experimenty s kathinonem v prostředí HLM

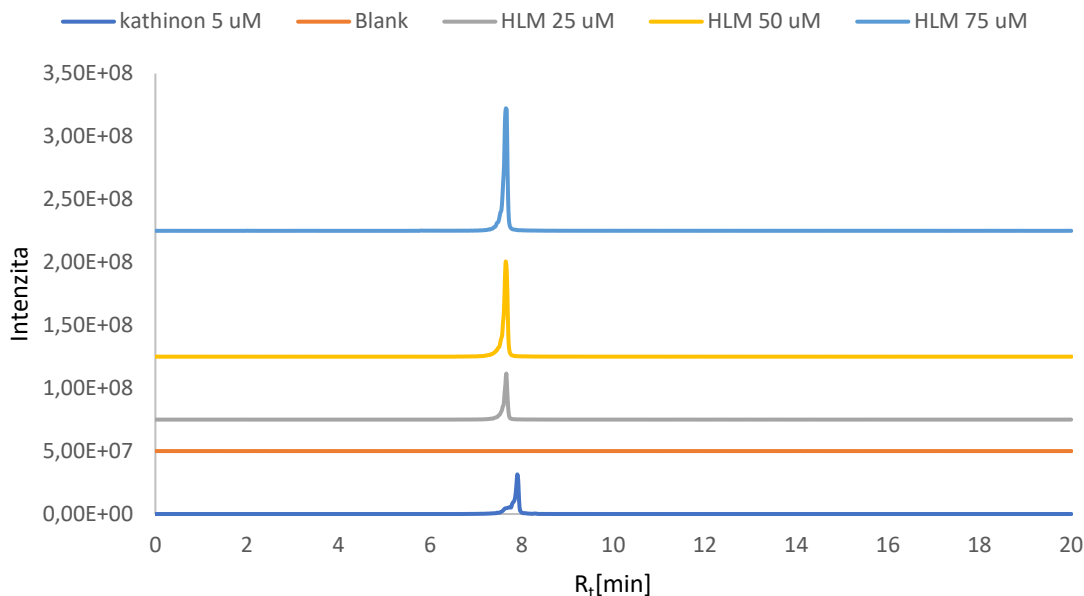
Metabolity (S)-kathinonu byly zkoumány třemi biotransformačními experimenty s hodinovou, čtyřhodinovou a dvanáctihodinovou inkubací. Podrobně si nyní probereme výsledky u hodinové a dvanáctihodinové inkubace, kdy bylo na hmotnostním spektrometru zaznamenáno několik metabolitů, a to M1, M2 a M3.

#### 3.7.2.1 Inkubace 1h

Přítomnost nízké koncentrace metabolitů (S)-kathinonu lze prokázat pomocí UV chromatogramu na Obr. 25, porovnáním s čistým vzorkem HLM (Blank HLM), kde se nenachází (S)-kathinon. Na Obr. 26 pak máme zobrazený iontový chromatogram (S)-kathinonu v přítomnosti HLM o koncentracích 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 75  $\mu\text{M}$ .



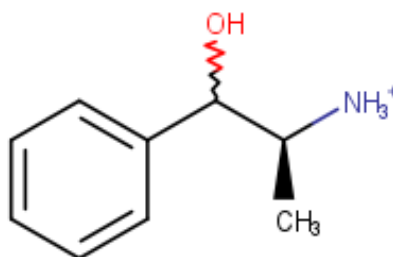
**Obrázek 25:** UV chromatogram (254 nm) (S)-kathinonu po biotransformaci v přítomnosti HLM.



**Obrázek 26:** Iontový chromatogram S-kathionu, získaný LC-MS analýzou reakční směsi po 1h inkubaci s HLM.

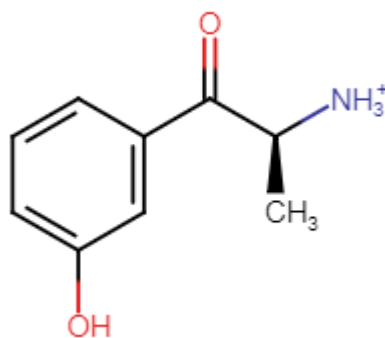
### 3.7.2.2 Metabolity – inkubace 1h

Na následujících obrázcích se nachází iontové chromatogramy jednotlivých metabolitů S-kathionu v koncentracích 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 75  $\mu\text{M}$ . Metabolity jsme stanovili hledáním vyšší hodnoty  $m/z$  nežli má S-kathinon, tedy hodnoty  $m/z$  v rozmezí 150-200. K tomu byly aplikovány 3 metody MS, a to fullms/aif, fullms/ddMS<sup>2</sup> a sim/MS<sup>2</sup>. Pro metabolit M1 je  $m/z=152,1069$ , pro metabolit M2 je  $m/z=166,0863$  a pro M3  $m/z=182,0812$ . Strukturální vzorce těchto metabolitů jsou zobrazeny na Obr.27, 28, 29. Pro jednotlivé metabolity jsme zkoumali i fragmentační spektra a jednotlivé fragmenty jsou vypsány v Tabulce 6.



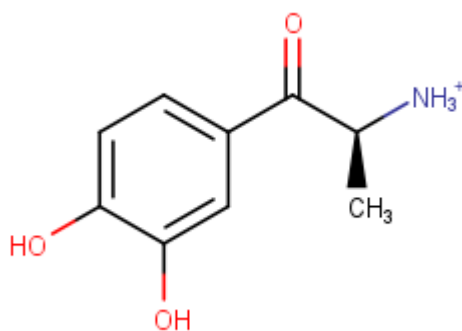
**Obrázek 27:** Strukturální vzorec M1 s  $m/z=152,1069$

$$pK_A=7,55 \quad \log P=-1,86 \quad \log D_{7,4}=-1,05$$



**Obrázek 28:** Hypotetický strukturní vzorec M2 s  $m/z=166,0863$

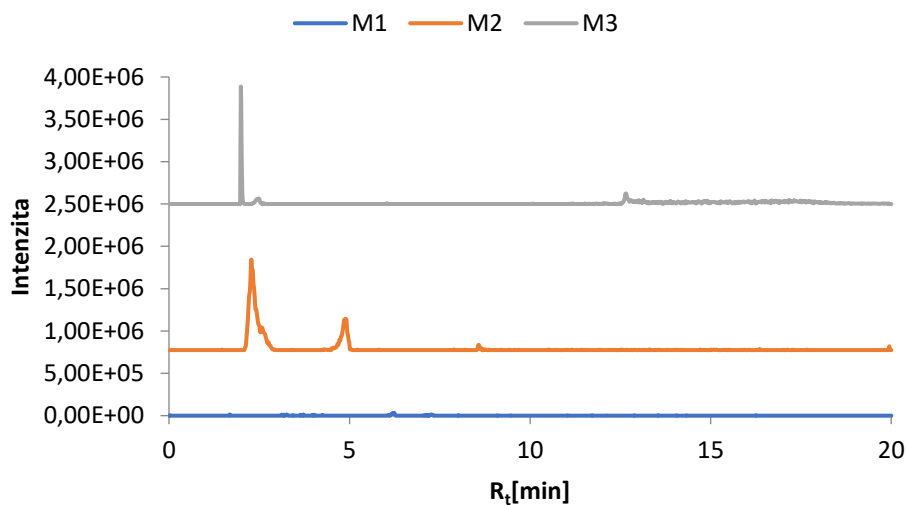
$$pK_A=7,51 \log P=-2,16 \log D_{7,4}=0,69$$



**Obrázek 29:** Hypotetický strukturní vzorec M3 s  $m/z=182,0812$

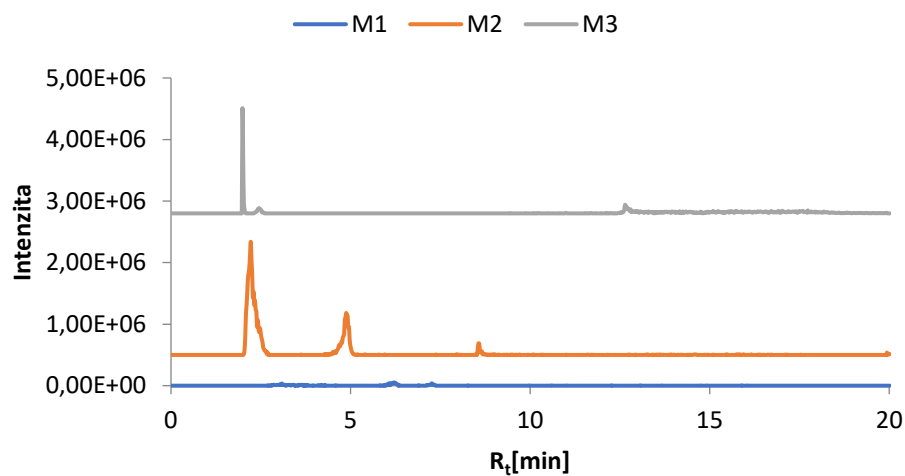
$$pK_A=7,36 \log P=-2,46 \log D_{7,4}=0,08$$

Z Obr.30 iontového chromatogramu metabolitů při koncentraci 25  $\mu\text{M}$  je patrné, že M1 eluje při retenčním čase 1,199 minut, M2 při  $R_t$  2,28 a druhý pík v minutě 4,84. Pro poslední metabolit M3 je retenční čas 6,24 minut.



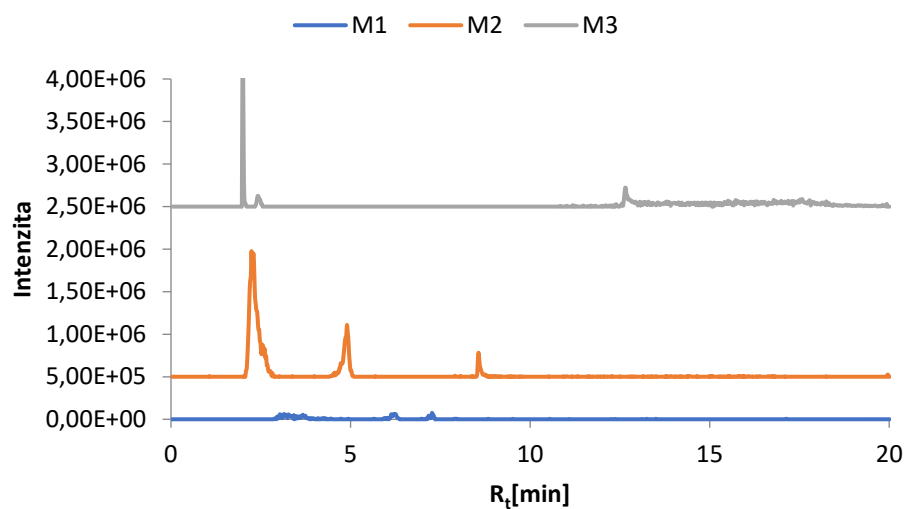
**Obrázek 30:** Extrahované iontové chromatogramy metabolitů *S*-kathinonu pro koncentraci 25 µM.

Z Obr. 31 iontového chromatogramu metabolitů při koncentraci 50 µM eluuje M1 také při retenčním čase 1,199 minut, M2 eluuje v minutě 2,22 a 4,89. Metabolit M3 u koncentrace 50 µM eluuje v 7,27 minutě.



**Obrázek 31:** Iontový chromatogram metabolitů *S*-kathinonu pro koncentraci 50 µM.

Z Obr. 32 iontového chromatogramu metabolitů při koncentraci 75 µM pozorujeme, že M1 eluuje při retenčním čase 2,01 minut. Metabolit M2 má při koncentraci 75 µM tři píky v retenčních časech  $R_t=2,24$   $R_t=4,91$  a  $R_t=8,58$ . Metabolit M3 eluuje v 6,24 minutě.



**Obrázek 32:** Iontový chromatogram metabolitů *S*-kathinonu pro koncentraci 75  $\mu\text{M}$ .

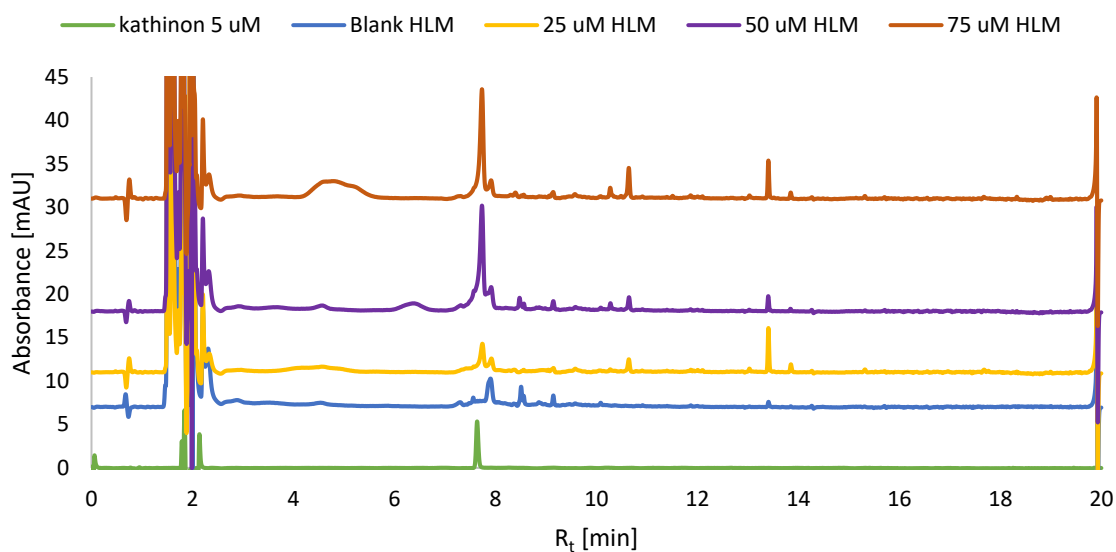
Zkoumáním fragmentačních spekter M1, M2 a M3 při hodinové inkubaci jsme objevili následující fragmenty:

**Tabulka 6:**  $m/z$  fragmentů metabolitů M1, M2 a M3 stanovené LC-MS/MS. Fragmenty jsou seřazené podle klesajících relativních intenzit.

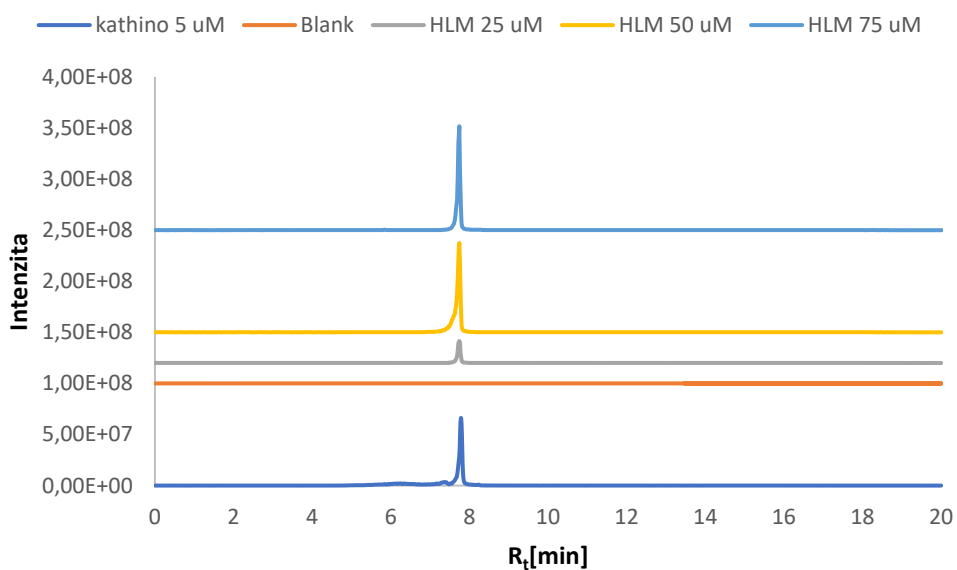
M1	M2	M3
<b>135,0443</b>	114,0913	<b>108,0440</b>
<b>149,0235</b>	124,0872	<b>123,0565</b>
<b>136,0619</b>	102,0919	<b>136,0619</b>

### 3.7.2.3 Inkubace 12h

Daší experiment byl proveden při dvanáctihodinové inkubaci a stejně jako při hodinové jsme zde extrahovali UV chromatogram, který je zobrazený na Obr.33 a iontový chromatogram, zobrazený na Obr.34.



**Obrázek 33:** UV chromatogram (254 nm) (S)-kathinonu po biotransformaci v přítomnosti HLM. Doba inkubace 12h.

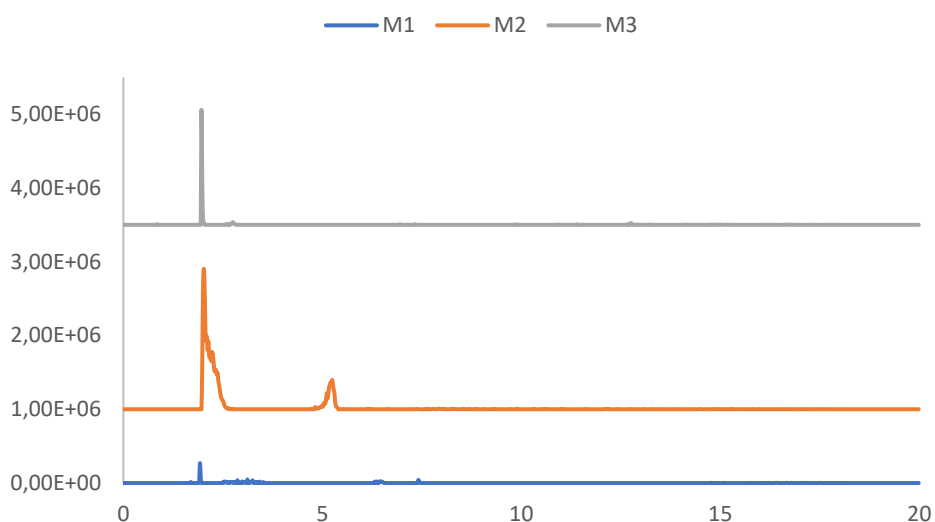


**Obrázek 34:** Ionový chromatogram S-kathinonu, který byl stanoven po experimentu v prostředí s HLM. Doba inkubace 12h.

### 3.7.2.4 Metabolity – inkubace 12h

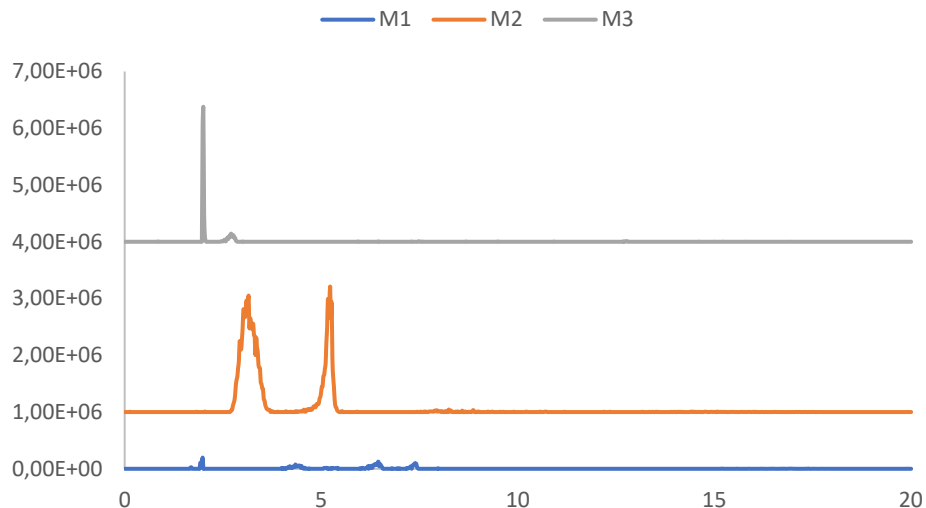
Stejně jako u hodinové inkubace, jsme pro dvanáctihodinovou inkubaci vyextrahovali iontové chromatogramy metabolitů o  $m/z$  pro M1 = 152,1069, M2 = 166,0863 a M3 = 182,0812. Iontový chromatogram pro koncentraci S-kathinonu 25  $\mu\text{M}$  se nachází na Obr.35, pro koncentraci 50  $\mu\text{M}$  na Obr.36 a 75  $\mu\text{M}$  iontový chromatogram na Obr.37. Pomocí fragmentačních spekter jsme pak určili  $m/z$  fragmentů těchto metabolitů. Fragmenty jsou vypsány v Tabulce 7.

Z iontového chromatogramu o koncentraci 25  $\mu\text{M}$  jsme pro metabolit M1 určili celkem tři eluční časy v minutě 1,926, 3,250 a 7,415. Metabolit M2 má retenční čas v minutě 2,202 a 5,265. Pro poslední metabolit M3 je retenční čas 1,964 minut.



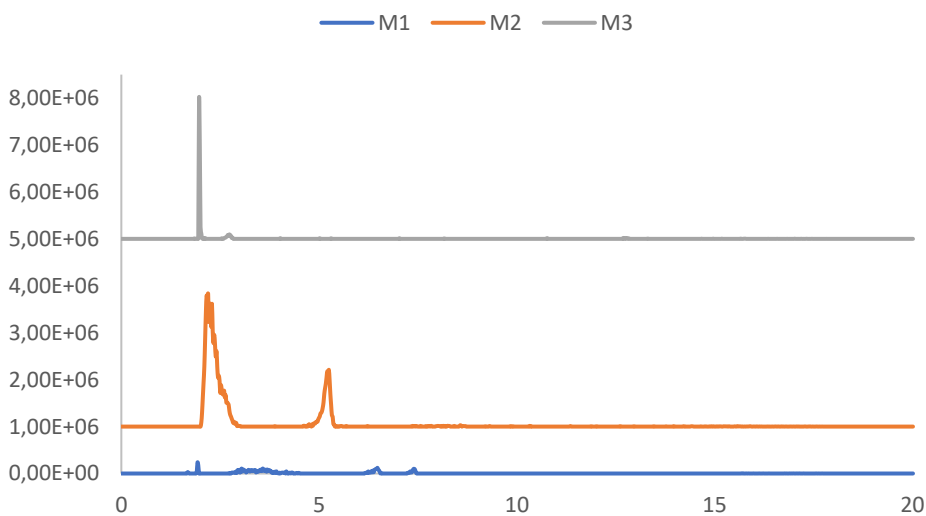
**Obrázek 35:** Extrahované iontové chromatogramy metabolitů S-kathinonu pro koncentraci 25  $\mu\text{M}$ .

U koncentrace 50  $\mu\text{M}$  eluuje metabolit M1 v čase 1,983 min, 4,345 min a 6,456 min. Metabolit M2 má retenční čas v minutě 3,116 a 5,171. Pro poslední metabolit M3 je retenční čas 1,984 a 2,790 minut.



**Obrázek 36:** Extrahované iontové chromatogramy metabolitů *S*-kathinonu pro koncentraci 50 µM.

U koncentrace 75 µM eluuje metabolit M1 v čase 1,926 min, 3,577 min a 6,475 min. Metabolit M2 má retenční čas v minutě 2,176 a 5,266. Poslední metabolit M3 má retenční čas 1,964 a 2,790 minut.



**Obrázek 37:** Extrahované iontové chromatogramy metabolitů *S*-kathinonu pro koncentraci 75 µM.

Pomocí fragmentačních spekter jsme pro každý metabolit určili a zaznamenali následující fragmenty:

**Tabulka 7:** *m/z* fragmentů metabolitů M1, M2 a M3. Fragmenty jsou seřazené podle klesajících relativních intenzit.

M1	M2	M3
<b>84,9602</b>	71,9525	80,0499
<b>117,0574</b>	102,9705	123,0552
<b>102,9706</b>	120,0808	110,0350



### 3.8 Stanovení stability kathinonu v mikrosomální prostředí

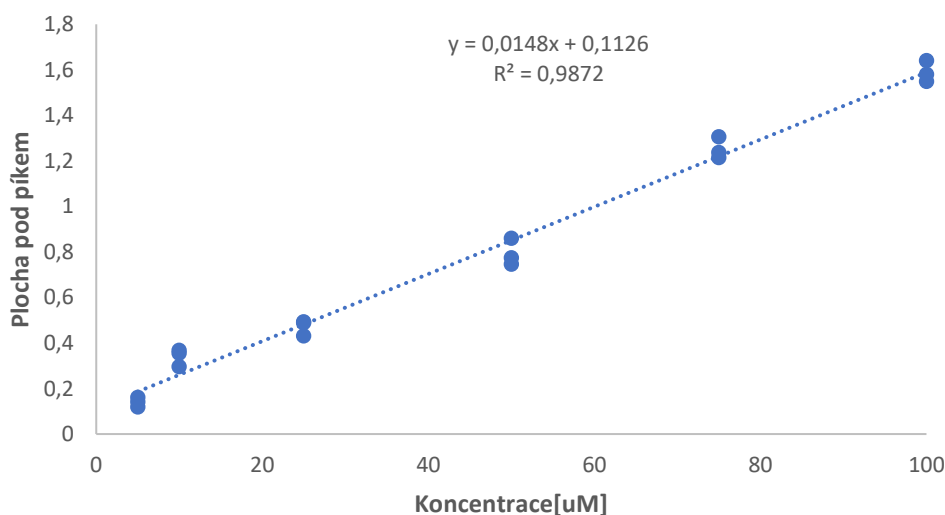
Stabilitu S-kathinonu v této bakalářské práci jsme určili pomocí metody vnějšího standardu, založené na analýze kalibračních roztoků o následujících koncentracích 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . Touto kvantitativní analýzou jsme zjistili množství S-kathinonu rozložené během metabolických procesů. U kalibrace se určuje závislost koncentrace dané látky na ploše pod píkem a pomocí rovnice přímky  $y=a+bx$  ( $a$ =koncentrace vzorku,  $b$ = směrnicе kalibrační přímky,  $x$ =hodnota plochy pod píkem) jsme vypočítali množství metabolizované látky.

#### 3.8.1.1 Inkubace 1h

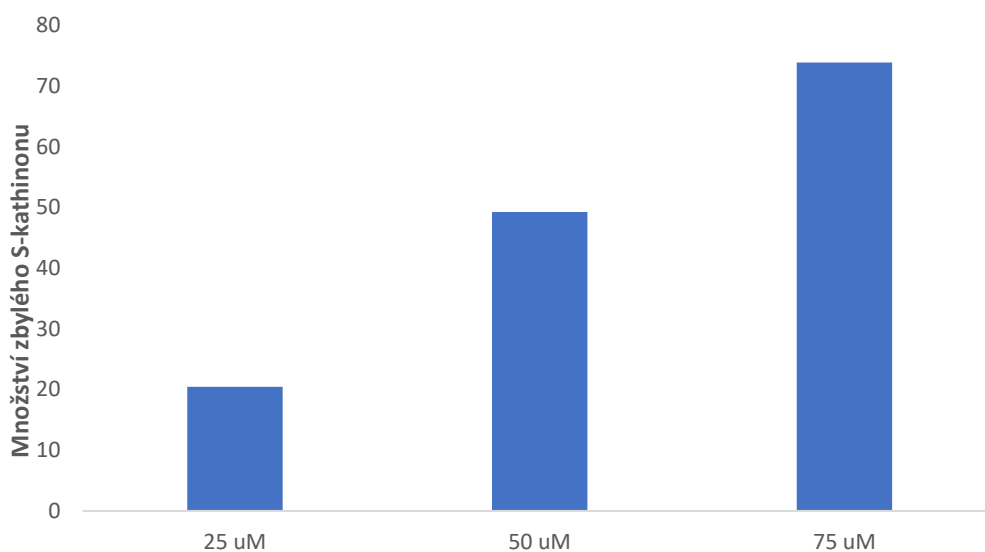
Hodnoty pro kvantitativní analýzu při hodinové inkubaci S-kathinonu se získaly z HPLC i z MS. Graf kalibrační závislosti S-kathinonu z hodnot HPLC je zobrazen na Obr.38 a z hodnot MS na Obr.40. Obě kvantitativní analýzy charakterizuje Standardní residuální odchylka a koeficient determinace ( $R^2$ ), jejichž hodnoty jsou vypsány v Tabulce 8. Stabilitu kathinonu jsme vyjádřili pomocí sloupcového grafu zobrazeném na Obr. 39, Obr.41 a pomocí hodnot v Tabulce 8 a 9.

**Tabulka 8:** Hodnoty standardní residuální odchylky a korelačního koeficientu pro HPLC a MS.

HPLC		MS	
Standardní residuální odchylka [ $\mu\text{M}$ ]	3,4344	Standardní residuální odchylka [ $\mu\text{M}$ ]	6,5601
$R^2$	0,9872	$R^2$	0,9727



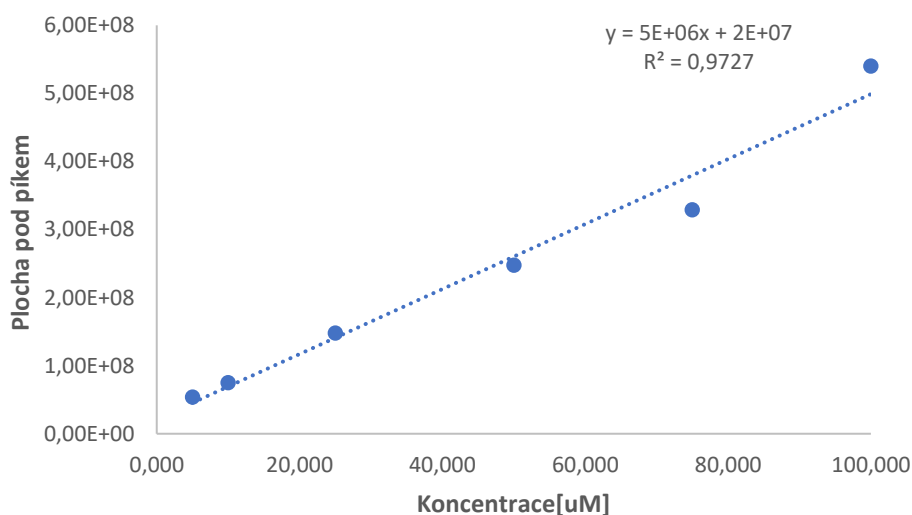
**Obrázek 38:** Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathinonu vytvořena ze záznamů LC-UV při 254 nm. Doba inkubace 1h.



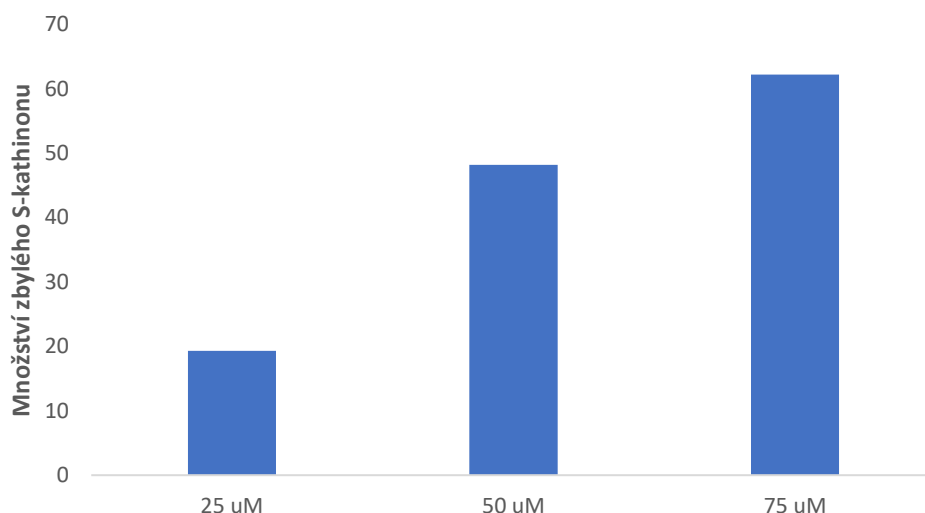
**Obrázek 39:** Sloupcový graf stability S-kathinonu v mikrozmátním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z LC-UVC při 254 nm.

**Tabulka 8:** Stabilita S-kathinonu v mikrozmátním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z HPLC při 254 nm.

Výchozí množství S-kathinonu	25 uM	50 uM	75 uM
Zbylé množství S-kathinonu [uM]	20.43±0.49	49,28±0,15	73,91±0,22
Zbylé množství S-kathinonu [%]	81,73	98,55	98,55



**Obrázek 40:** Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathinonu vytvořena ze záznamů LC- MS. Doba inkubace 1h.



**Obrázek 41:** Sloupcový graf stability S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z LC-MS.

**Tabulka 9:** Stabilita S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z MS.

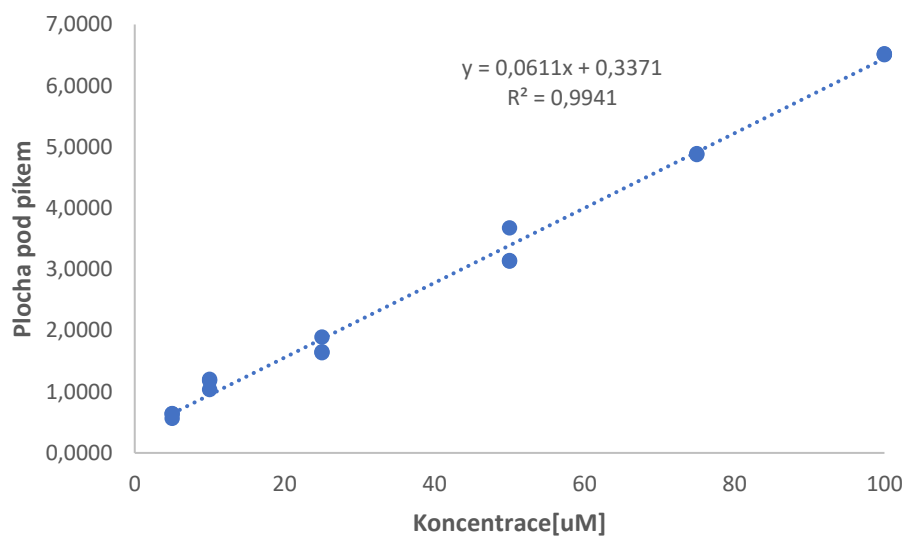
Výchozí množství S-kathinonu	25	50	75
Zbylé množství S-kathinonu [uM]	19,2948±0,52	48,1984±0,36	62,2348±0,48
Zbylé množství S-kathinonu [%]	77,16	96,40	82,98

### 3.8.1.2 Inkubace 12h

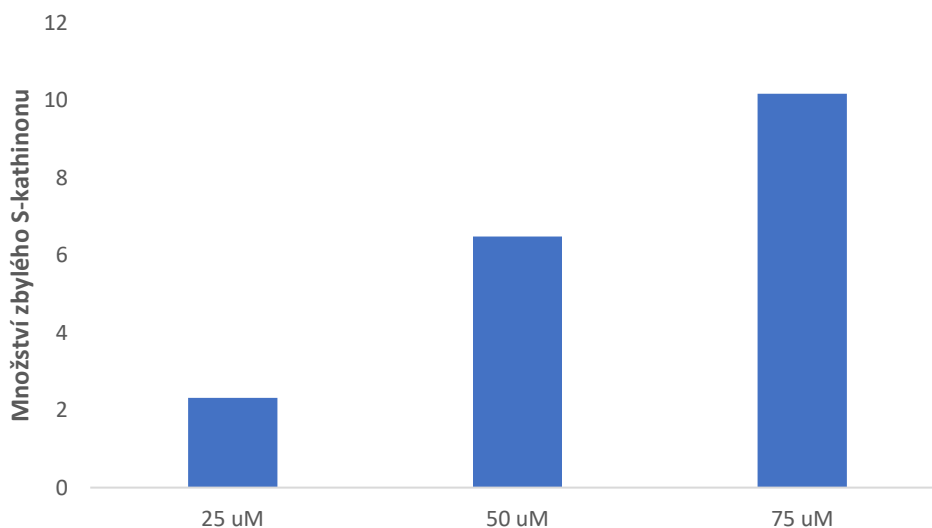
Graf kalibrační závislosti S-kathinonu při dvanáctihodinové inkubaci z hodnot HPLC je zobrazen na Obr.42, pro hodnoty z MS pak na Obr.44. Obě tyto analýzy charakterizuje Tabulka 10, kde se nachází hodnoty Standardní residuální odchylky a koeficientu determinace. Pro hodnoty z HPLC jsme sestrojili sloupcový graf (Obr.43), který vyjadřuje stabilitu S-kathinonu, podrobně jsou pak hodnoty zobrazené v Tab. 11. Sloupcovým grafem (Obr.45) jsme vyjádřili i hodnoty dvanáctihodinové inkubace z MS a stejně i hodnotami v Tabulce 12.

**Tabulka 10:** Hodnoty standardní residuální odchylky a korelačního koeficientu pro kalibrační křivku stanovenou pomocí LC-UV a LC- MS.

HPLC		MS	
Standardní residuální odchylka [uM]	4,978502	Standardní residuální odchylka [uM]	9,635356
R <sup>2</sup>	0,9941	R <sup>2</sup>	0,9875



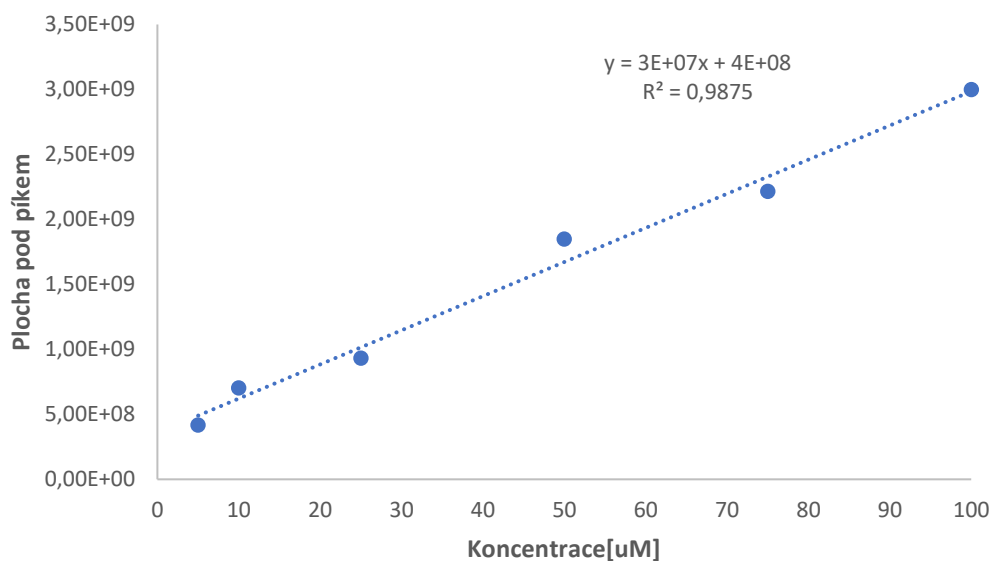
**Obrázek 42:** Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathinonu vytvořena ze záznamů HPLC při 254 nm. Doba inkubace 12h.



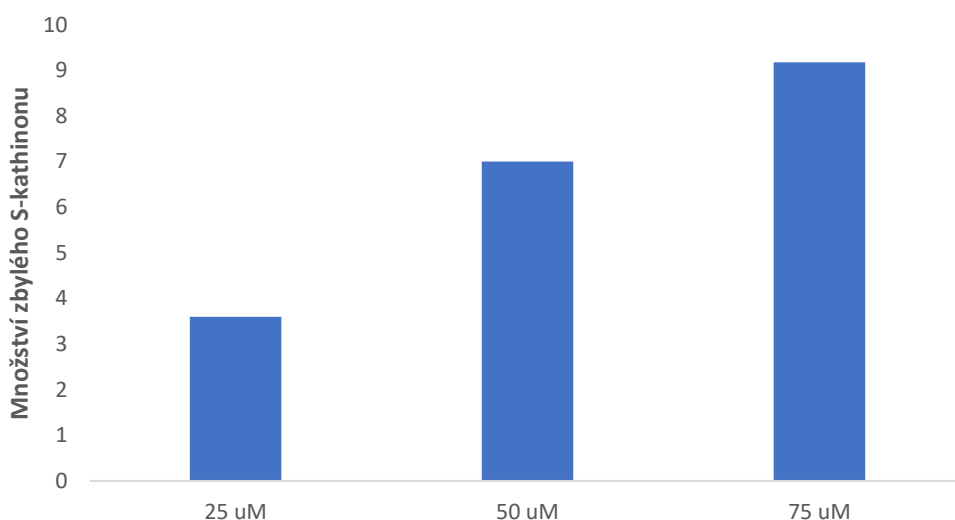
**Obrázek 43:** Sloupcový graf stability S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z HPLC při 254 nm.

**Tabulka 11:** Stabilita S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z HPLC při 254 nm.

Výchozí množství S-kathinonu	25	50	75
Zbýlé množství S-kathinonu [uM]	2,31±0,13	6,48±0,13	10,17±0,16
Zbýlé množství S-kathinonu [%]	9,24	12,96	13,56



**Obrázek 44:** Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathinonu vytvořena ze záznamů LC-MS. Doba inkubace 12h.



**Obrázek 45:** Sloupcový graf stability S-kathinonu v mikrozmátním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z LC-MS.

**Tabulka 12:** Stabilita S-kathinonu v mikrozmátním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z MS.

Výchozí množství S-kathinonu	25	50	75
Zbylé množství S-kathinonu[uM]	3,59±0,15	7,00±0,17	9,18±0,23
Zbylé množství S-kathinonu [%]	14,36	14,00	12,24

## 4 Diskuze

Metabolismus xenobiotik hraje klíčovou roli této bakalářské práce a běžně se dělí do tří fází důkladně popsanych v kapitole 2.1. První fáze biotransformace vede obecně k oxidaci, redukci, hydrolýze nebo cyklizaci parentní látky a je katalyzována hlavně jaterními cytochromy P-450. Metabolický experiment v této bakalářské práci byl proveden s lidskými jaterními mikrozomy (HLM) za účelem identifikace metabolitů I. fáze a následnému vyhodnocení *in vitro* stability S-kathinonu po 1 h a 12h inkubace za podmínek napodobujících lidský jaterní enzymový systém. Aby bylo možné získat kvantitativní informace o metabolických procesech, byla sestavena kalibrační řada o 6 koncentracích (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ), které byly všechny měřeny třikrát za použití systému LC-UV-MS/MS.

Vývoj metody LC-UV-MS/MS a její optimalizace byl v této bakalářské práci inspirován biotransformačními studiemi z roku 2015 (Nepovimová et al.). Tato univerzální LC-UV-MS/MS metoda je založena na chromatografické separaci produktu metabolizace s HLM pomocí klasické reverzní stacionární fáze C18 a gradientového elučního programu, který kombinoval acetonitril a vodu s přídatkem 0.1 % (v/v) kyseliny mravenčí. Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr byl nastaven pomocí autokonfigurační funkce ovládacího softwaru, přičemž se během analýz ladily především různé typy skenovacích režimů. Byly zaznamenávány MS/MS spektra a také UV-chromatogramy detekované při 210, 254, 278 a 290 nm a UV spektrum. Všechny parametry týkající se nastavení HPLC a MS metod jsou uvedeny v tabulkách 2,3 (viz kapitola 3.6). U hmotnostního spektrometru jsme použili tři typy skenovacích a fragmentačních režimů. A to AIF, dd-MS<sup>2</sup> a SIM/MS<sup>2</sup>, jejichž parametry jsou uvedené v tabulce 4 také v kapitole 3.6. Pomocí těchto analytických přístupů jsme nejprve charakterizovali chromatografické vlastnosti (S)-kathinonu a s využitím tandemové HRMS jsme určili hodnoty  $m/z$  jeho majoritních fragmentů. K predikci chemických struktur jsme kromě empirických pravidel (např. výpočet sumárního vzorce, RDB hodnoty, intuitivní návrhy chemických struktur fragmentů rozložením parentních struktur) využívali profesionální software MassFrontier 7.0. Pomocí přístupů necílené analýzy jsme následně hledali v iontových chromatogramech ionty, které nebyly přítomné v iontových chromatogramech získaných LC-UV-MS/MS analýzou čisté parentní látky a tzv. blankových mikrosomů. Předpokládali jsme, že biotransformací (S)-kathinonu budou vznikat metabolity, které budou mít vyšší  $m/z$  než parentní látka, budou mít nižší lipofilitu i retenční čas a budou pravděpodobně obsahovat v molekule další atomy kyslíku. Díky informacím získaným při rešerši odborné literatury jsme také předpokládali, že po experimentu s HLM objevíme v reakční směsi ionty s  $m/z = 152,1069$ , které odpovídají diastereomerům norefedrinu a norpseudofedrinu. Podrobnou analýzou iontových chromatogramů jsme zjistili, že reakční směsi po biotransformačním experimentu s HLM se vyskytují 3 chemická individua, která odpovídají principům biotransformace I. Tyto nalezené metabolity (S)-kathinonu jsme označili kódy M1, M2 a M3 (tj.  $m/z = 152,107$ ,  $166,086$ ,  $182,081$ ) a podrobili je dalším analýzám.

Chromatografické specifikace metabolitů M1-M3 jsou v souladu s principy metabolismu a dané metabolity se vyskytly v nižší retenční čas na chromatogramech

než retenční čas S-kathinonu ( $R_t = 7,639$  min,  $c=50 \mu\text{M}$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 150,091$ ). V případě hodinové inkubace při koncentraci  $50 \mu\text{M}$  měl metabolit M1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 152,107$ ) retenční čas v minutě 1,19. Metabolit M2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 166,086$ ) měl retenční čas v minutě 2,22 a 4,89. Metabolit M3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 182,081$ ) měl pak retenční čas v minutě 7,27. Pro dvanáctihodinovou inkubaci o koncentraci  $50 \mu\text{M}$  byly retenční časy pro M1  $R_t=1,983$  min, 4,345 min a 6,456 min, pro M2  $R_t=3,116$  min a 5,171 min. Pro poslední metabolit M3 byl  $R_t=1,984$  min a 2,790 min.

Iontové chromatogramy metabolitů M1-M3 byly získány extrakcí z TIC podle jejich hodnot  $m/z$ . Ve všech případech se v XIC metabolitů objevilo více píků se stejnými hodnotami  $m/z$ , avšak s rozdílnými intenzitami a retenčními časy. Tento fakt lze vysvětlit tak, že během biotransformačního experimentu došlo ke vzniku různých izomerů, které vykazují stejné hodnoty  $m/z$ . Podrobným zkoumáním fragmentačních spekter isobarických iontů v rozdílných retenčních časech byly odhaleny více méně drobné rozdíly hodnotách  $m/z$  a intenzitách produktových iontů. V případě M1 bylo vždy detekováno jen nepatrné množství iontů, ačkoli byly rozptýlené do několika píků v iontovém chromatogramu. Tento výskyt mnohočetných píků byl pozorován především v datech získaných metodami Full MS/AIF. V menší míře se objevoval v SIM/MS<sup>2</sup> a Full MS/dd-MS<sup>2</sup>. U M2 a M3 byl nalezeny dva velké píky, respektive jeden velký pík, a několik malých píků se stejnými hodnotami  $m/z$ .

Odvození hypotetických struktur daných metabolitů ( $m/z$  152,107, 166,086, 182,081) probíhalo na základě analýzy izotopové obálky iontů, predikovaných sumárních vzorců a srovnáním fragmentačních spekter metabolitů s fragmentačním spektrem parentní látky. Všechny tři metabolity zahrnovaly vložení jednoho nebo dvou atomů kyslíku, které byly snadno stanoveny pomocí matematické predikce molekulárního vzorce z hodnot  $m/z$  s vysokým rozlišením v programu Xcaliburu 3.0.63. K objasnění chemické struktury a navrhování hmotnostní daných struktur jsme dále využili i program Mass Frontier 7.0. Hmotnosti navrhovaných fragmentů struktur nalezených metabolitů souhlasily s experimentální hmotností fragmentů v MS/MS. Korespondence mezi predikovanými a nalezenými fragmenty metabolitů M1-M3 však nebyly kompletní. Abychom mohli hypotetické struktury metabolitů M1-M3 potvrdit, bylo by nutné provést další experimenty a výpočty, což by přesáhlo rámec této bakalářské práce. Konečný závěr o skutečné struktuře nalezených metabolitů by bylo možné vyslovit až po jejich separaci a analýze metodami NMR či rentgenostrukturální analýzou.

Hypotetická struktura metabolitu M1 byla odvozena z jeho  $m/z = 152,107$ . Nejprve jsme predikovali sumární vzorec metabolitu a zjistili jsme, že obsahuje oproti parentní struktuře jeden atom vodíku navíc. Na základě znalostí literatury jsme navrhli pro tento metabolit strukturu, která opovídá katinu, tedy redukovanému (S)-kathinonu. Pomocí programu Mass Frontier 7.0 jsme metabolit M1 hypoteticky navržený jako (2S)-1-hydroxy-1-fenylpropan-2-aminium, neboli katin fragmentovali (strukturní vzorec na Obr.27, viz kapitola 3.7.2.2). Zkoumáním spektra produktových iontů po hodinové inkubaci jsme objevili tři majoritní ionty s  $m/z = 135,0443$ ,  $m/z = 149,0235$  a  $m/z = 136,0619$ , které odpovídaly predikovaným produktovým iontům.

Podobné výsledky byly nalezeny v experimentu s 12h inkubací. Analýzou dat SIM/MS<sup>2</sup> a Full MS/dd-MS<sup>2</sup> byly odhaleny stejné fragmenty iontu M1.

Hypotetická struktura metabolitu M2 byla ve full MS charakterizovaná s hodnotou  $m/z = 166,086$ . Rozdíl mezi  $m/z$  hodnotami pro parentní látku a M2 činí, 15,995, což odpovídá připojení jednoho atomu kyslíku. Vzhledem k tomu, že jsme během literární rešerše nenašli žádné informace o metabolitech (*S*)-kathinonu s  $m/z$  odpovídající M2, pokusili jsme se navrhnout strukturu M2 intuitivně. Ze studií biotransformace účinkem enzymů z nadrodiny CYP je možné dedukovat, že k oxidacím na aromátech dochází v polohách ortho a para, je-li v poloze 1 na aromatickém substrátu funkční skupina s kladným mezomerním efektem (*M+*) (Rudik *et al.*, 2016). U aromatického jádra, které má v poloze 1 substituent se záporným mezomerním efektem *M-*, je možné předpokládat, že tzv. site of metabolism (SOM) bude v poloze meta. Na základě této úvahy a našich zkušeností s *in vitro* biotransformací v prostředí HLM jsme navrhli hypotetickou strukturu M1 jako meta hydroxyderivát (*S*)-kathinonu. Pomocí programu Mass Frontier 7.0 jsme metabolit M2 jakožto (2*S*)-1-(3-hydroxyfenyl)-1-oxopropan-2-aminium (Obr.28, viz kapitola 3.7.2.2.) fragmentovali a porovnali s experimentálními fragmentačními spektry. Zkoumáním spektra produktových iontů pro pík M2 s nejvyšším retenčním časem po hodinové inkubaci (zaznamenaná pro  $m/z = 166,086$ ) jsme narazili na tři majoritní ionty s  $m/z = 114,0913$ ,  $m/z = 124,0872$  a  $m/z = 102,0919$ . U dvanáctihodinové inkubace jsme našli ionty s  $m/z = 71,9525$ ,  $m/z = 102,9705$  a  $m/z = 120,0808$ , které měly relativně nejvyšší intenzitu. Pozorování a predikce fragmentů M2 korespondovaly jen v několika případech. To může být ale způsobeno tím, že MassFrontier 7.0 je program pro obecnou fragmentaci iontů, který nezohledňuje např. typ hmotnostního spektrometru a jeho nastavení. O limitech MassFrontieru 7.0 jsme se přesvědčili při porovnání experimentálního a predikovaného fragmentačního hmotnostního spektra v případě LC-MS/MS analýzy standardu (*S*)-kathinonu, kde je struktura známá. I zde byl souhlas mezi predikcí a našim experimentem pouze částečný.

Při interpretaci struktury M2 je ovšem nezbytné vzít v úvahu, že odpovídající hodnota  $m/z$  vytváří v XIC chromatogramech dva majoritní píky s rozdílným retenčním časem. Proto je nutné zdůraznit, že struktura M2 metabolitu je pouze spekulativní a na základě provedených studií ji nelze ani potvrdit ani vyvrátit. Je možné se domnívat, že při oxidaci aromatického kruhu (*S*)-kathinonu v prostředí HLM dochází ke vzniku polohových izomerů s různě vázanou hydroxyskupinou. Též je možné uvažovat o oxidaci jiného místa (*S*)-kathinonu než je aromatický uhlík. V úvahu by při experimentech s HLM přicházela N-oxidace na primární aminoskupině (*S*)-kathinonu. Na základě analýzy fragmentačních spekter iontů s  $m/z = 166,086$ , které eluovaly při různých retenčních časech, jsme však nebyli schopni zachytit významný rozdíl. Protože použitý Q Exactive Plus dokáže analyzovat jen MS/MS spektra s nejnižší hodnotou  $m/z = 50$ , ponechali jsme vyřešení otázky struktury isobarických iontů s hodnotou  $m/z = 166,086$  pro další výzkumný projekt.

Hypotetická struktura metabolitu M3 byla odvozena z  $m/z = 182,081$ . S využitím podobných úvah jako v případě M2 jsme navrhli pro M3 strukturu, která odpovídala zavedení dvou hydroxylových skupin do molekuly (*S*)-kathinonu. Tuto



hypotézu podporuje skutečnost, že rozdíl mezi  $m/z$  hodnotami M3 a parentní látky činí 31.990, což je přesná hmotnost dvou atomů kyslíku. I zde můžeme SOM u (*S*)-kathinonu predikovat na základě delokalizace elektronů, neboť je známo, že oxidace enzymy z rodiny CYP má obvykle elektrofilní mechanismus. Jako výhodná pozice pro vstup další hydroxylové skupiny na aromatické jádro (*S*)-kathinonu se jeví poloha para, a proto jsme pro M2 navrhli strukturu (2*S*)-1-(3,4-dihydroxyfenyl)-1-oxopropan-2-aminium. (strukturní vzorec metabolitu M3 na Obr.29 viz kapitola 3.7.2.2). Pomocí programu Mass Frontier 7.0 jsme tedy metabolit M3 fragmentovali a porovnali se spektry produktových iontů u nejintenzivnějšího píku pro M3 v iontovém chromatogramu. V hmotnostním spektru produktových iontů M3 u hodinové inkubace (zaznamenaná pro  $m/z = 182.081$ ) jsme narazili na tři majoritní ionty s  $m/z = 108,0440$ ,  $m/z = 123,0565$  a  $m/z = 136,0619$ . U dvanáctihodinové inkubace jsme našli ionty s  $m/z = 80,0499$ ,  $m/z = 123,0552$  a  $m/z = 110,0350$ . Při kritickém pohledu na výsledky získané analýzou metabolitu M3 lze vyslovit podobné argumenty, jako v případě metabolitu M2, i když v případě M3 již nalzáme v iontovém chromatogramu pouze jeden majoritní pík s odpovídající hodnotou  $m/z$ .

Celkově můžeme z výše popsané kvalitativní analýzy produktů biotransformace (*S*)-kathinonu odvodit závěr, že při biotransformaci nepochybně dochází ke vzniku širšího spektra metabolitů než jen ke vzniku diastereomerů norefedrinu, jak je uvedeno v citované literatuře. Hydroxylované metabolity jsou typickým produktem 1. fáze biotransformace, a proto není překvapivé, že byly objeveny naší analýzou i v případě (*S*)-kathinonu. Bylo by však potřeba studie ověřit, a to například syntézou předpokládaných metabolitů M1-M3 a jejich analýzou LC-MS/MS. Takto by bylo možné potvrdit chromatografické vlastnosti metabolitů M1-M3 (tj. retenční čas) a také ověřit jejich fragmentační spektra.

Stabilita *S*-kathinonu v HLM prostředí byla určena kvantitativně metodou vnějšího standardu pomocí kalibrační křivky z hodnot ploch pod píkem získaných UV i MS detekcí. Kvantifikace zbytkového (*S*)-kathinonu v reakční směsi byla provedena u biotransformačních experimentů jak po hodinové, tak 12-hodinové inkubaci. Kalibrační přímky odvozené lineární regresí dat z UV i MS detekce jsme charakterizovali koeficientem determinace, který udává míru variability pozorovaných dat vysvětlenou regresní přímkou a standardní reziduální odchylkou, která udává průměrnou odchylku mezi predikovanými a skutečnými hodnotami nezávisle proměnné (tj. koncentrace). Pro experiment s hodinovou inkubací jsme na základě LC-UV kalibrace odvodili regresní vztah s  $R^2=0,9872$ , z údajů získaných z hmotnostního spektrometru pak vztah s  $R^2=0,9727$ . Hodnota koeficientu determinace pro dvanáctihodinovou inkubaci z údajů LC-UV je  $R^2=0,9941$  a z údajů MS je  $R^2=0,9875$ . Pomocí kalibrační rovnice jsme vypočítali jednotlivé koncentrace (*S*)-kathinonu po biotransformaci v prostředí HLM. Z těchto statistických charakteristik vyplývá, že kalibrace s využitím UV detekce je robustnější, ačkoli se jednalo o jedny a tytéž analýzy, kde MS detekce následovala bezprostředně po UV detekci. LC-UV je ale pro kvantifikaci v komplexním vzorku nespolehlivá a museli jsme využít jen LC-MS variantu kalibrace. Z hodnot uvedených v tabulkách 9 a 11 (údaje z MS) si lze všimnout, že se parentní látka poměrně málo metabolizuje při 1h inkubaci na rozdíl od 12h inkubace. U hodinové inkubace se látka z výchozí koncentrace 25  $\mu\text{M}$  zmetabolisovala

z 23 % na rozdíl od dvanáctihodinové inkubace, kdy se zmetabolisovala z 86 %. U 12h inkubace jsme nepozorovali výrazný vliv výchozí koncentrace (*S*)-kathinonu na míru biotransformace, ale u 1h inkubace je možné zaznamenat, že zvýšená výchozí koncentrace (*S*)-kathinonu biotransformaci poněkud inhibuje a po ukončení experimentu (*S*)-kathinonu zbývá v reakční směsi více.

## Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo provedení metabolického experimentu *in vitro* s látkou (S)-kathinon v prostředí HLM s následnou identifikací a charakterizací vzniklých metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a vysokorozlišovací tandemové hmotnostní spektrometrie. Kathinon je alkaloid obsažený v rostlině *Catha edulis*, u které přispívá k jejím psychostimulačním účinkům. Chemicky je kathinon primárním aminem, podobný amfetaminům, liší se však obsahem ketonové funkční skupiny. Charakterem a identifikací metabolitů kathinonu a jeho derivátů se zabývala řada studií. Některé z nich jsou zmíněné i v této bakalářské práci.

Práce odhalila, že hlavní faktor, který působil na tvorbu metabolitů byla doba inkubace. Experiment byl proveden při hodinové, čtyřhodinové a dvanáctihodinové inkubaci, přičemž nejlepší výsledky jsme získali z údajů dvanáctihodinové inkubace. Charakterizované byly tři hypotetické struktury metabolitů s  $m/z = 152, 107, 166, 086, 182, 081$ , u kterých změna struktury zahrnovala vložení jednoho nebo dvou atomů kyslíku. Současně se tato práce zabývala i stanovením stability S-kathinonu v prostředí HLM. U dvanáctihodinové inkubace se látka zmetabolizovala z 86 %, tedy vzorek obsahoval 14 % zbylého S-kathinonu. Na rozdíl od hodinové inkubace, kdy vzorek obsahoval 77 % zbylého kathinonu, tedy zmetabolisoval pouze z 23 %.

Závěrem lze říci, že látka S-kathinon poskytuje zajímavé metabolity a pro biotransformační analýzy této látky je přínosnější dvanáctihodinová doba inkubace. V rámci této bakalářské práce tak byly naplněny všechny vytyčené cíle.

## Seznam použité literatury

- ALMAZROO, O. A., MIAH, M. K., VENKATARAMANAN, R. *Drug Metabolism in the Liver*. Clinics in Liver Disease. 2017, 21s.
- AMITAVA DASGUPTA, *Chapter 33 - Abuse of Magic Mushroom, Peyote Cactus, LSD, Khat, and Volatiles, Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition)*. Academic Press. 2019, 477-494.
- ASHA, S., & VIDYAVATHI, M. *Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2009, 160 s.
- ARAYA, Z., & WIKVALL, K. *6 $\alpha$ -Hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes*. Biochimica et Biophysica Acta. 1999, 47–54.
- BARSKI, O. A., TIPPARAJU, S. M., BHATNAGAR, A. *The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification*. Drug Metabolism Reviews. 2008, 553-624.
- BERRANG, B. D., LEWIN, A. H., CARROLL, F. I. *Enantiomeric .alpha.-aminopropiophenones (cathinone): preparation and investigation*. The Journal of Organic Chemistry. 1982, 47(13).
- BOSSONG, M., VAN DIJK, J., NIESINK, R. *Methylone and mCPP, two new drugs of abuse?* Addiction Biology. 2005, 321-323.
- BRANDON, E. F., SPARIDANS, A. *In vitro characterization of the human biotransformation pathways of aplidine, a novel marine anti-cancer drug*. Investigational New Drugs. 2006, 25 s.
- BRANDON, E. F., RAAP, C. D. *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2003, 233–246.
- BRENNEISEN, R., GEISSHÜSLER, S., SCHORNO, X. *Metabolism of cathinone to (-)-norephedrine and (-)-norpseudoephedrine*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1986, 298-300.
- BRUNT, T.M., POORTMAN, A., NIESINK, R.J., *Van den Brink, W. Instability of the ecstasy market and a new kid on the block: mephedrone*. J Psychopharmacol, 2011, 1543–1547.
- CASTRO-PEREZ, J.M. *Current and future trends in application of HPLC - MS to metabolite identification studies*. Drug discovery today. 2007.
- CLEMENTI F, FUMAGALLI G. *General nad molecular pharmacology, principles of drug action. 4th edition*. Hoboken: John Wiley and Sons. 2012, 786 s.
- COVEY, T. R., LEE, E. D., BRUINS, A. P., & HENION, J. D. *Liquid chromatography/mass spectrometry*. Analytical Chemistry. 1986.
- DE HOFFMANN, E. *Mass Spectrometry*. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 2005.
- FOJTÍKOVÁ, L., HOLUBOVÁ, B., KUCHARŤ, M., *Nové psychoaktivní látky*. Chemické listy. 2017
- GAN, L., VON MOLTKE, L., TREPANIER, L. A. *Role of NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome- b 5 /NADH- b 5 Reductase in Variability of CYP3A Activity in Human Liver Microsomes*. Drug Metabolism and Disposition. 2008, 90-96.

- GORROCHATEGUI, E., JAUMOT, J., LACORTE, S. *Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2016, 425-442.
- GUANTAI, A.N., MAITAI, C.K. *Metabolism of Cathinone to d-Norpseudoephedrine in Humans*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1983.
- GROSS, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook. 3.Edition*. Springer International Publishing. 2017. ISBN 978-3-319-54398-7.
- HOEGG, E. D., MARCUS, R. K., HAGER, G J. *Concomitant ion effects on isotope ratio measurements with liquid sampling – atmospheric pressure glow discharge ion source Orbitrap mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2018, 251-259.
- HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*, 2001.
- HECHT, E. S., OBERG, A. L. *Optimizing Mass Spectrometry Analyses: A Tailored Review on the Utility of Design of Experiments*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry. 2016, 767–785.
- KALIX, P. *Cathinone, a Natural Amphetamine*. Pharmacology & Toxicology. 1992, 77–86.
- KARST, U., NIESSEN, W.: *Liquid chromatography–mass spectrometry (Third edition)*. Anal Bioanal Chem. 2007.
- KELLY, J. P. *Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology*. Drug Testing and Analysis. 2011, 439-453.
- KONDROVÁ, E. *Studium úlohy biotransformaních enzymů v chemické karcinogenezi*. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta. Praha, 2008, 95s.
- KUMAR et al. *Targeted analysis with benchtop quadrupole–orbitrap hybrid mass spectrometer: Application to determination of synthetic hormones in animal urine*. Analytica chimica Acta. 2013.
- LÓPEZ-ARNAU, R., MARTÍNEZ-CLEMENTE, J., PUBILL, D. *Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone*. British Journal of Pharmacology. 2012, 407-420.
- MAITAI, C.K., MUGERA, G.M. *Excretion of the Active Principle of Catha edulis (Miraa) in Human Urine*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1975, 702-703.
- MATOUŠ ET AL. *Zákady lékařské chemie a biochemie*. 1. Vydání. Nakladatelství Galén. 2010, 540 s.
- MEYER, M. R., WILHELM, J., PETERS, F. T. *Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography–mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010, 397s.
- NEPOVIMOVA, E., KORABECNY, J., DOLEZAL, R. et al. *Tacrine–Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity*. Journal of Medicinal Chemistry. 2015,
- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.1. vyd.* Praha: Europrint. 2013, 299s.

- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. Vyd. Praha: Europrint a.s. 2013, 235.
- OMIECINSKI, C. J., VANDEN HEUVEL, J. P., PERDEW, G. H. *Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities*. Toxicological Sciences. 2011.
- PATEL, NB. *Mechanism of action of cathinone: The active ingredient of Khat (Catha Edulis)*. East African Medical Journal. 2009.
- PATOČKA, J., JAHODÁŘ, L. *Obsahové látky rostlin čeledi Celastraceae*. Chemické Listy 93. 1999.
- PLANT, N. *Strategie pro použití in vitro screenů v metabolismu léčiv*. Drug Discovery Today. 2004.
- RITER, L. S., VITEK, O., GOODING, K. M., HODGE, B. D. *Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry. 2005.
- RUDIK, A. V., DMITRIEV, A. V. *Prediction of reacting atoms for the major biotransformation reactions of organic xenobiotics*. Journal of Cheminformatics. 2016.
- SADÍLEK, M. *Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie*, Chem. Listy. 2020.
- SIEGEL, T. *Využití metod hmotnostní spektrometrie v identifikaci a lokalizaci významných molekul parazitických helmintů*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha. 2014.
- SKÁLOVÁ, L. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, Praha. 2017, 172 s., ISBN 9788024637334
- STIBOROVÁ, M., HUDEČEK, J., HODEK, P., FREI E., *Význam cytochromů p450 pro lidské zdraví*. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova. Praha, 1999.
- STRANO-ROSSI, S., CADWALLADER, A. B., DE LA TORRE, X. *Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylvalerone (MPDV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2010.
- WOLFF, K., WHITE, J. *The SAGE Handbook of Drug & Alcohol Studies*. London: SAGE Publications. 2016. ISBN 978-1-4462-9867-1.
- ZÁRUBA, K. *Analytická chemie I.díl*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.

## Elektronické zdroje

- Pubchem [online]. [cit. 2020-07-17]. Dostupné z:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62258#section=DSSTox-Substance-ID>
- Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Metabolismus [online]. 2019 [citováno 21. 07. 2020]. Dostupné z WWW:  
<https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Metabolismus&oldid=17447968>

## Seznam zkratek

(v/v)	Objemová procenta
AIF	Režim fragmentace všech iontů (All Ion Fragmentation)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku ( Atmospheric Pressure PhotoIonization)
ATP	Adenosintrifosfát
CE	Kapilární elektroforéza
CID	Kolizně indukovaná disociace
COMT	Katechol-O-methyltransferáza
CNS	Centrální nervová soustava
CYP	Cytochrom P450
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EHS	Epoxidové hydrolázy
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
FMO	Monooxygenázy obsahující flavin
GC	Plynová chromatografie (Gass Chromatography)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (Gass-Liquid Chromatography)
GST	glutathion-S-transferáza
HCD	Higher Energy Collisional Dissociation
HLM	Lidské jaterní mikrosomy (Human liver microsomes)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR	Vysoké rozlišení (High Resolution)
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (High Resolution Mass Spectrometry)
LC	Kapalinová chromatografie
LOD	Detekční limit, mez detekce (limit of detection)
LLOQ	Dolní mez stanovitelnosti (Lower limit of quantitation)
MALDI	Ionizace desorpce laserem za účasti matrice
MBDB	Methylbenzodioxylbutanamin
MDMA	3,4-methylenoxy-N-methylamfetamin
MDPV	3,4-methylendioxyprovaleron
MF	Mobilní fáze
MRM	Selektivní záznam více reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NAT	N-acetyltransferáza
NL	Sken neutrálních ztrát (Neutral Loss Scan)
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PI	Sken prekurzorových iontů (Precursor Ion Scan)
POMT	Fenol-O-methyltransferáza

PR	Sken produkovaných iontů (Product Ion Scan)
RIC	Rekonstruovaný iontový proud (Reconstructed Ion Current)
RNA	Ribonukleová kyselina
SAM	S-adenosylmethionin
SIM	Selektivní záznam jednoho nebo více iontů (Selected Ion Monitoring)
SF	Stacionární fáze
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SRM	Selektivní záznam jedné reakce
ST	Sulfotransferáza
SULT	Sulfotransferáza
TFA	Kyselina trifluoroctová
TIC	Chromatogram celkového iontového proudu
TOF	Analyzátor doby letu (Time Of Flight)
TSMT	Thiopurin-S-methyltransferáza
UDP-GA	Kyselina uridin difosfoglukuronová
UGT	Uridindifosfát-glukuronosyl-transferáza
ULOQ	Horní mez stavitelnosti (Upper Limit Of Quantitation)
XIC	Extrahovaný iontový chromatogram



## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Schéma znázorňující katalytický cyklus cytochromu P450. RH: substrát, ROH: hydroxylovaný produkt. Převzato z: Clementi, Fumagalli 2012.....	12
<b>Obrázek 2:</b> Kyselina uridindifosfoglukuronová.....	14
<b>Obrázek 3:</b> Přeměna konjugátu s glutathionem na merkapturovou kyselinu. Převzato z: Skálová, 2017.....	16
<b>Obrázek 4:</b> Princip chromatografické separace dvou látek. Au= absorpční jednotka, R <sub>t</sub> =retenční čas. ....	19
<b>Obrázek 5:</b> Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu, převzato z: Nováková, Douša 2013.....	20
<b>Obrázek 6:</b> Základní schéma hmotnostního spektrometru. Převzato z: Siegel, 2014. ....	22
<b>Obrázek 7:</b> Schéma orbitrapu. a: středová/centrální elektroda, b: vnější dvoudílná elektroda, c: izolační keramický prstenec, který slouží k rozdělení vnější elektrody. Převzato z: Gross,2017.....	23
<b>Obrázek 8:</b> Schéma hmotnostního spektrometru Q Exactive Plus. Převzato z: Hoegg et al., 2017.....	24
<b>Obrázek 9:</b> Schéma tandemové hmotnostní spektrometrie. Převzato z: Nováková, Douša 2013.....	25
<b>Obrázek 10:</b> Selektivní záznam vybraného iontu (m/z). Převzato z: <a href="http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php">http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php</a> .....	26
<b>Obrázek 11:</b> Vývoj a optimalizace analytické metody.....	31
<b>Obrázek 12:</b> Strukturní vzorec (S)-kathinonu.....	33
<b>Obrázek 13:</b> Strukturní vzorec amfetaminu.....	33
<b>Obrázek 14:</b> Strukturní vzorec kathinu.....	33
<b>Obrázek 15:</b> Čerstvé listy khatu (Catha edulis). Převzato z: Wolff et al. 2016.....	34
<b>Obrázek 16:</b> Strukturní vzorec mefedronu.....	36
<b>Obrázek 17:</b> Strukturní vzorec butylonu.....	36
<b>Obrázek 18:</b> Strukturní vzorec methylonu.....	36
<b>Obrázek 19:</b> Strukturní vzorec MDPV.....	37
<b>Obrázek 20:</b> Použitý lineární gradient pro LC-MS/MS analýzu.....	45
<b>Obrázek 21:</b> UV Chromatogram roztoku S-kathinonu v methanolu (c = 50µM). Chromatogram byl získán gradientovou eluční metodou na stacionární fázi typu C18 při vlnové délce 254 nm.....	46
<b>Obrázek 22:</b> Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) (S)-kathinonu (m/z = 150.089 – 150.092). ....	47
<b>Obrázek 23:</b> Fragmentační spektrum S-kathinonu s vyznačenými nejintenzivnějšími fragmenty. ....	47
<b>Obrázek 24:</b> 5 hypotetických fragmetů S-kathinonu. Pod jednotlivými vzorci jsou uvedeny vypočítané (vyp.) a experimentálně stanovené (exp.) hodnoty m/z. ....	48
<b>Obrázek 25:</b> UV chromatogram S-kathinonu v přítomnosti HLM.....	49
<b>Obrázek 26:</b> Ionový chromatogram S-kathionu , získaný LC-MS analýzou reakční směsi po 1h inkubaci s HLM. ....	50
<b>Obrázek 27:</b> Strukturní vzorec M1 s m/z=152,1069.....	50
<b>Obrázek 28:</b> Hypotetický strukturní vzorec M2 s m/z=166,0863.....	51
<b>Obrázek 29:</b> Hypotetický strukturní vzorec M3 s m/z=182,0812.....	51
<b>Obrázek 30:</b> Extrahované iontové chromatogramy metabolitů S-kathinonu pro koncentraci 25 µM. ....	52
<b>Obrázek 31:</b> Ionový chromatogram metabolitů S-kathinonu pro koncentraci 50 µM.....	52

<b>Obrázek 32:</b> Iontový chromatogram metabolitů S-kathionu pro koncentraci 75 $\mu\text{M}$ .....	53
<b>Obrázek 33:</b> UV chromatogram S-kathionu v přítomnosti HLM. Doba inkubace 12h.....	54
<b>Obrázek 34:</b> Iontový chromatogram S-kathionu, který byl stanoven po experimentu v prostředí s HLM. Doba inkubace 12h.....	54
<b>Obrázek 35:</b> Extrahované iontové chromatogramy metabolitů S-kathionu pro koncentraci 25 $\mu\text{M}$ .....	55
<b>Obrázek 36:</b> Extrahované iontové chromatogramy metabolitů S-kathionu pro koncentraci 50 $\mu\text{M}$ .....	56
<b>Obrázek 37:</b> Extrahované iontové chromatogramy metabolitů S-kathionu pro koncentraci 75 $\mu\text{M}$ .....	56
<b>Obrázek 38:</b> Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathionu vytvořena ze záznamů LC-UV při 254 nm. Doba inkubace 1h. ....	57
<b>Obrázek 39:</b> Sloupcový graf stability S-kathionu v mikrozomálním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z LC-UVC při 254 nm.....	58
<b>Obrázek 40:</b> Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathionu vytvořena ze záznamů LC- MS. Doba inkubace 1h.....	58
<b>Obrázek 41:</b> Sloupcový graf stability S-kathionu v mikrozomálním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z LC-MS.....	59
<b>Obrázek 42:</b> Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathionu vytvořena ze záznamů HPLC při 254 nm. Doba inkubace 12h. ....	60
<b>Obrázek 43:</b> Sloupcový graf stability S-kathionu v mikrozomálním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z HPLC při 254 nm. ....	60
<b>Obrázek 44:</b> Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci S-kathionu vytvořena ze záznamů LC-MS. Doba inkubace 12h.....	61
<b>Obrázek 45:</b> Sloupcový graf stability S-kathionu v mikrozomálním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z LC-MS.....	61

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Typy analyzátorů a jejich princip separace. Vytvořeno podle: Nováková, Douša 2013. ....	24
<b>Tabulka 2:</b> Parametry nastavení HPLC metody. ....	43
<b>Tabulka 3:</b> Parametry nastavení MS metody. ....	43
<b>Tabulka 4:</b> Typy záznamů MS a jejich parametry. ....	44
<b>Tabulka 5:</b> Chromatografické vlastnosti kathinonu S stanovené pomocí LC-UV analýzy, která je zobrazená na Obrázku č.21. ....	46
<b>Tabulka 6:</b> m/z fragmentů metabolitů M1, M2 a M3 stanovené LC-MS/MS. Fragmenty jsou seřazené podle klesajících relativních intenzit. ....	53
<b>Tabulka 7:</b> m/z fragmentů metabolitů M1, M2 a M3. Fragmenty jsou seřazené podle klesajících relativních intenzit. ....	56
<b>Tabulka 8:</b> Stabilita S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z HPLC při 254 nm. ....	58
<b>Tabulka 9:</b> Stabilita S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 1h inkubaci. Hodnoty získané z MS. ....	59
<b>Tabulka 10:</b> Hodnoty standardní residuální odchylky a korelačního koeficientu pro kalibrační křivku stanovenou pomocí LC-UV a LC- MS. ....	59
<b>Tabulka 11:</b> Stabilita S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z HPLC při 254 nm. ....	60
<b>Tabulka 12:</b> Stabilita S-kathinonu v mikrozomálním prostředí při 12h inkubaci. Hodnoty získané z MS. ....	61