

Biológiai hatású vegyületek és bomlástermékeik szililezése és acilezése hexametil-diszilazánnal és meghatározása GC-MS módszerrel

Doktori értekezés

Fodor Blanka

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Perlné Dr. Molnár Ibolya, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Mörthl Mária, Ph.D, osztályvezető
Dr. Alberti-Dér Ágnes, Ph.D, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottsága:

Elnök: Dr. Zelkó Romána, MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Csörgeiné Dr. Kurin Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Órfy László, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés: irodalmi áttekintés	7
1.1	A származékképzési tanulmány modellvegyületeinek jellemzése	8
1.1.1	A leggyakoribb növényi kannabinoidok és bomlástermékeik.....	8
1.1.2	Fehérjeépítő aminosavak tulajdonságai és jelentőségük	10
1.1.3	Biogén monoaminok és metabolitjaik	13
1.2	Modellvegyületek meghatározása származékképzés nélkül a GC módszerével 15	
1.3	Modellvegyületek GC-MS meghatározása származékképzést követően	19
1.3.1	Meghatározás trimetilszilil származékként	19
1.3.2	Meghatározás perfluoracilezett származékként.....	35
2.	Célkitűzések	41
3.	Módszerek és eljárások leírása	42
3.1	Felhasznált vegyszerek	42
3.2	A vizsgált minták	42
3.3	Alkalmazott eszközök.....	43
3.3.1	A mintaelőkészítés eszközei.....	43
3.3.2	A gázkromatográfiás elválasztás és tömegspektrometriás detektálás eszközei és körülményei.....	43
3.4	Mintaelőkészítés	45
3.4.1	Modelloldatok.....	45
3.4.2	Biológiai minták előkészítése.....	45
3.4.3	BCAA előkészítése és az ATE&ETA peptidek bontása savas hidrolízissel 46	
3.4.4	A származékká alakítás	46
3.5	A módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása, a kiértékelés módja .	47
4.	Eredmények.....	51

4.1	KNBD típusú vegyületek trialkilszilil-származékképzési tanulmánya.....	51
4.1.1	A reagensösszetétel optimalizálása	53
4.1.2	A HMDS alkalmazása szililezőszerként - vadkender KNBD-tartalmának meghatározása az optimalizált mintaelőkészítési eljárással	57
4.2	A HMDS új alkalmazási lehetőségei - egyidejű acilezés és szililezés	60
4.2.1	A kémiaiilag többfunkciós aminosavak származékká alakítása HMDS-sel 60	
4.2.2	Az egylépéses származékképzés kiterjesztése további multifunkciós vegyületekre.....	66
4.2.3	Az egylépéses származékképzés teljesítményjellemzőinek meghatározása AS-akkal	70
4.2.4	BMA-ok egyidejű acilezése és szililezése.....	73
5.	Megbeszélés.....	86
5.1	Növényi kannabinoidok mennyiségi meghatározása trimetilszilil származékokként mátrixaik jelenlétében.....	86
5.2	Egylépéses acilezés és szililezés a HMDS/PFKS reagenspárral	87
6.	Következtetések.....	90
7.	Összefoglalás	91
8.	Summary.....	92
9.	Irodalomjegyzék	93
10.	Saját publikációk jegyzéke	111
10.1	Disszertációhoz kötődő publikációk:	111
10.2	Disszertációhoz nem kötődő publikációk:	111
11.	Köszönetnyilvánítás	113
12.	Függelék: Kannabinoidok és catecholaminok bioszintézise és bomlása	114

Rövidítések jegyzéke

11-OH-THC	11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinol; 11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
3-MeTYR	3-metoxi-tiramin; 3-Methoxytyramine
5-HIAA	5-hidroxi-indolecetsav; 5-Hydroxyindoleacetic acid
5-MeT	5-metoxi-triptamin; 5-Methoxytryptamine
AA	amino-alkohol
AC	amino-cukor
ACN	acetonitril
Ala	alanin; alanine
AlaAla	alanil-alanin; Alanyl-alanine
AlaGyl	alanil-glicin; Alanyl-glycine
AmGl	2-amino-glükóz; 2-Aminoglucose
Arg	arginin; Arginine
AS	aminosav
Asn	aszparagin; Asparagine
Asp	aszparaginsav; Aspartic acid
BCAA	elágazó láncú aminosavak; Branched-chain amino acids
BMA	biogén monoamin; Biogenic monomamine
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilszilil)-trifluoracetamid; <i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide
BuAm	4-amino-bután-2-ol; 4-Aminobutan-2-ol
CBD	kannabidiol; Cannabidiol
CBDA	kannabidiolsav; Cannabidiolic acid
CBL	kannabiciklol; Cannabicyclol
CV	kannabivarin; Cannabidivarin
Cys	cisztein; Cysteine
DA	dopamin; Dopamine
DiAHA	2,6-diamino-heptadekánsav; 2,6-Diaminoheptanedioic acid
EP	epinefrin; Epinephrine
ETAC	etil-acetát
EtAm	etanol-amin; Ethanolamine

FID	lángionizációs detektor; flame ionization detector
FS	teljes pásztázás üzemmód; full scan
GABA	γ -amino-vajsav; gamma-amino-butyric acid
GC	gázkromatográfia; gas-chromatography
Gln	glutamin; Glutamine
Glu	glutaminsav; Glutamic acid
Gly	glicin; Glycine
GlyGly	glicil-glicin; Glycyl-glycine
GlyGlyGly	glicil-glicil-glicin; Glycyl-glycyl-glycine
HFBA	heptafluor-vajsav; Heptafluorobutyric acid
HFBA	heptafluor-vajsavanhidrid; Heptafluorobutyric anhydride
His	hisztidin; Histidine
HMDS	hexametil-diszilazán; Hexamethyldisilazane
HS-SPME	gőztéranalízis szilárd fázisú mikro-extrakcióval; Headspace-solid phase microextraction
HVA	homovanillinsav; Homovanillic acid
HYP	hidroxi-prolin; Hydroxyproline
IE	integrátor egység; integrator unit
Ile	izoleucin; Isoleucine
IPA	izopropanol
KNBD	kannabinoid; Cannabinoids
l-DOPA	3,4-dihidroxi-fenilalanin (levodopa); 3,4-dihydroxyphenylalanine
Leu	leucin; Leucine
LLE	folyadék-folyadék extrakció; liquid – liquid extraction
LOD	kimutatási határ; limit of detection
LOQ	meghatározhatósági határ; limit of quantification
Lys	lizin; Lysine
MBHFBA	<i>N</i> -metil-bisz(perfluor)-butiramid; <i>N</i> -Methyl-bis-perfluorobutyramide
Met	metionin; Methionine
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilszilil)-trifluoracetamid; <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

MTBSTFA	<i>N-terc</i> -butil-dimetil-szilil- <i>N</i> -metil-trifluoracetamid; <i>N-tert</i> -butyl-dimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoroacetamide
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOREP	norepinefrin; Norepinephrine
NORMNE	normetanefrin; Normetanephine
Orn	ornitin; Ornithine
PFKS	perfluor-karbonsav
PFPA	pentafluor-propionsav; Pentafluoropropionic acid
PFPA	pentafluor-propionsavanhidrid; Pentafluoropropionic anhydride
Phe	fenilalanin; Phenylalanine
PrAm	3-amino-propán-1-ol; 3-Aminopropanol
Pro	prolin; Proline
PYR	piridin; Pyridine
RSD%	relatív standard deviáció %; relative standard deviation %
Ser	szerin; serine
SFI	szelektív fragmentumion; selective fragment ion
SPE	szilárd fázisú extrakció; solid-phase extraction
ST	szerotonin; Serotonine
T	triptamin; Tryptamine
TBDMCS	<i>terc</i> -butil-dimetil-klór-szilán; <i>tert</i> -Butyldimethylchlorosilane
tBuOH	tetrabutil-ammónium-hidroxid; Tetrabutylammonium hydroxide
TFA	trifluor-ecetsav; Trifluoroacetic acid
TFAA	trifluor-ecetsavanhidrid; Trifluoroacetic anhydride
THC	tetrahidrokannabinol; Tetrahydrocannabinol
THCA	tetrahidrokannabinolsav; Tetrahydrocannabinolic acid
THC-COOH	11-nor-9-karboxi-tetrahidrokannabinol; 11-Nor-9-carboxy-Tetrahydrocannabinol
Thr	treonin; Threonine
TIC	teljes ionszám; total ion count
TMCS	trimetil-klór-szilán; Trimethylchlorosilane
TMSI	trimetilszilil-jodid; Trimethylsilyl iodide
TMS	trimetilszilil

TMSIm	<i>N</i> -trimetilszilil-imidazol; <i>N</i> -trimethylsilylimidazole
Trp	triptofán; Tryptophan
TYR	tiramin; Tyramine
Tyr	tirozin; Tyrosine
Val	valin; Valine
VMA	vanillil-mandulasav; Vanillylmandelic acid
VUV	vákuum ultraibolya spektroszkópia; Vacuum Ultraviolet spectroscopy

1. Bevezetés: irodalmi áttekintés

A.T. James és A.J.P. Martin 1950. október 20-án mutatták be az első gázkromatográfot a Biokémiai Társaság találkozóján. A műszerhez köthető technika, a gázkromatográfia (GC), azóta is a modern elválasztástechnika területének egyik leggyakrabban alkalmazott módszere. Legelőször illékony zsírsavak elválasztására alkalmazták. A későbbiekben sikerült megoldani az '50-es évek legnagyobb analitikai kémiai kihívását jelentő kőolajösszetétel meghatározást. Ezt követően a kőolajipar elképesztő mértékű fejlesztéseket eszközölt a módszerben, aminek köszönhetően egyéb tudományterületek is (pl. biokémia, bioanalitika és élelmiszeranalitika) egyre gyakrabban alkalmazták ezt a technikát. Az igazi áttörés és a mai napig tartó népszerűség az 1980-as éveket követően a kapilláris oszlopok megjelenésének köszönhető [1].

A GC műszerét alkalmazó azonosítási és mennyiségi meghatározások széleskörű elterjedése szükségessé tette a mérések érzékenységének és szelektivitásának folyamatos fejlesztését. A probléma megoldására különféle származékkészítési eljárásokat dolgoztak ki. Az elválasztást megelőző, jellemzően „offline” módszerek növelik az egy mérésel elválasztható összetevők számát, az elválasztás hatékonyságát, módosítják a vegyület kötődését az oszlophoz, növelik a vegyületek termikus stabilitását, továbbá a molekula illékonyosságát és apoláris jellegét az aktív hidrogén lecserélésével [2]. Ilyen módon a korábban GC-vel nem mérhető, poláris és csekély illékonyosságú vegyületek is mérhetővé váltak. A származékkészítési technikák közül a trialkilszilililezés, acilezés halogén-karbonsav-származékokkal, észterezés, alkilezés, oximálás és a bifunkciós vegyületek gyűrűs származékká alakítása terjedt el [3].

A trialkilszilililezésre gyakran használt szintelen, vízzel nem elegyedő folyadékot, a hexametil-diszilazánt (HMDS) vagy más néven bisz(trimetil-szilil)-amint Sauer és Hasek állították elő trimetil-klór-szilán (TMCS) és ammónia reagáltatásával [4]. Brochmann és mtsai az 1960-as évek elején először alkalmazták a HMDS-t szimpatomimetikus aminok trimetilszilil (TMS) származékká alakítására gáz-folyadék kromatográfias elválasztásukat megelőzően [5]. Napjainkban széles körben használják, önmagában vagy trifluor-ecetsav (TFA) katalizátor jelenlétében, főként szilil származékok előállítására. Speciális szimmetrikus szerkezete miatt, a megfelelő HMDS:TFA arány megválasztása

mellett, primer aminok acilezésére is alkalmas származékképző elegyként 2015-ben alkalmazták először kutatólaborunk munkatársai [6-7].

Kutatómunkám célja a HMDS származékképző szer hagyományos és új felhasználási módjainak vizsgálata, melyben először egy átfogó tanulmányban a hatékonyságát trimetilszililező reagensként hasonlítom össze más származékképző szerekkel. A kutatás részeként az orvosi célokra és kábítószerként egyaránt gyakran fogyasztott kannabisz hatóanyagainak korábban még nem alkalmazott gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) meghatározási lehetőségét tanulmányozom. Új felhasználási területként a HMDS szimmetrikus szerkezetének köszönhető acilező tulajdonságát elemzem és bővítem egyidejű trimetilszililezéssel, aminosav (AS), amino-alkohol (AA), amino-cukor (AC), oligopeptid (két- és háromtagú), valamint biogén monoamin (BMA) modellvegyületek GC-MS azonosításával és mennyiségi meghatározásával.

1.1 A származékképzési tanulmány modellvegyületeinek jellemzése

1.1.1 A leggyakoribb növényi kannabinoidok és bomlástermékeik

A marihuána régóta ismert és egyben a leggyakrabban fogyasztott kábítószer. Az elmúlt években készített felmérések szerint a kannabisz fogyasztók száma a 250 milliót is meghaladhatja a világon. Számuk továbbra is növekvő irányt mutat, legtöbben Ázsiában és Amerikában élnek vele [8-9]. A magyar 18-64 éves korosztályban a marihuána életprevalencia értéke 7,4% [10]. A kannabisz használat szabályozása az 1961. március 30-án New Yorkban 160 ország által aláírt Nemzetközi Kábítószer-ellenőrzési Egyezményvel vált globálissá. Hazánkban a 162/2003 Kormányrendelet rendelkezik a kábítószer előállítására alkalmas növények, így a kannabisz termesztésének, forgalmazásának és felhasználásának szabályairól is.

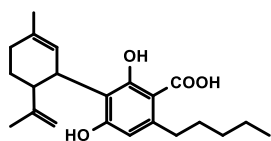
Jellemző alkaloidjai az 1. ábrán látható növényi kannabinoidok (KNBD). Ezen kívül terpéneket, fenoloidokat, lignánokat is tartalmaz, összesen több, mint négyszáz vegyületet, melyek közül a KNBD-ok száma hetven körüli. A hatóanyag-tartalmuk szerint három fő típust különböztetünk meg: *Cannabis sativa*, *C. indica* és *C. ruderalis* [11]. A két fő hatóanyag a Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC) és a kannabidiol (CBD) a tetrahidrokannabinolsav (THCA) és kannabidiolsav (CBDA) dekarboxileződésével

keletkezik UV-fény és hő hatására (ld. függelék 1. ábra). Az indiai kender fő pszichoaktív alkaloidja a THC. A nőnemű egyedek levele, virága átlagosan 1-3% THC-t tartalmaz és összeségében magasabb hatóanyag-tartalmúak, mint a hímneműek. A hasis, a növény szárított gyantaszerű kivonata, ennek tízszeresét is tartalmazhatja [12]. Kémiai azonosításuk a THC és az inaktív CBD vagy [THC + kannabinol (CBN)] és CBD aránya alapján történik [13]. A CBN a THC-nál gyengébb biológiai aktivitású. Az ipari kender pszichoaktív hatóanyag-tartalma 0,2% alatti, CBD-tartalma magas. A rekreációs és orvosi célra alkalmazott növényé ennél lényegesen magasabb, ami jellemzően alacsony CBD-tartalommal párosul. Az orvosi javallatra alkalmazott kender hatóanyag-tartalmát, illetve az egyes komponensek arányát a termesztés során szabályozzák, a növényeket faj szerint kémiai jellemzőik alapján csoportosítják.

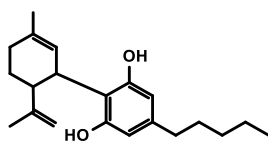
A *C. indicát* nemcsak gyógyászati célokra, hanem pszichoaktív hatása miatt élvezeti szerként is használják, míg a *C. ruderalis* vadkenderként vált ismertté, főleg ipari felhasználása jellemző. A tudatmódosító hatásért a növény THC-tartalma a felelős, ami dopamin (DA) felszabadulás révén relaxált, eufórikus állapotot idéz elő. A CBD ezzel szemben nem pszichoaktív tulajdonságú. Gyulladáscsökkentő, hányinger mérséklő, anxiolitikus hatású, emiatt az élelmiszeripar és szépségápolási ipar előszeretettel állít elő CBD olaj tartalmú étrend-kiegészítőket, kozmetikai termékeket, melyek hazánkban is egyre divatosabbak. A gyógyászatban, gyerekeknél és fiatal felnőtteknél antiepileptikus hatásáért alkalmazzák [14-15].

Az emberi szervezetben a kannabisz fogyasztást követően, a THC metabolizáció útján, szinte teljes mennyiségében, 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinollá (11-OH-THC) és 11-nor-9-karboxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinollá (THC-COOH) alakul. A metabolitok (1. ábra) glükuronidhoz kötve vizelettel ürülnek, illetve tartós fogyasztás esetén felhalmozódnak a hajban és a körömben. Ezen tulajdonságok biztosítják a fent említett két vegyület biomarker szerepét. A vérplazma THC, illetve THC-COOH/THC koncentráció aránya alapján Huesties és mtsai modellt készítettek, mellyel az utolsó kannabisz fogyasztás időpontját becsülték egyszeri és krónikus szerfogyasztás után [16-18].

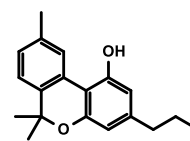
Növényi kannabinoidok



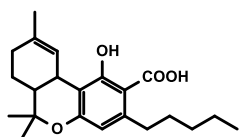
Kannabidiolsav (CBDA)
M = 358,5 g/mol



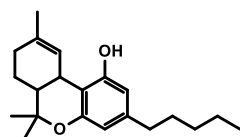
Kannabidiol (CBD)
M = 314,5 g/mol



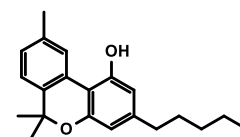
Kannibivarin (CV)
M = 282,4 g/mol



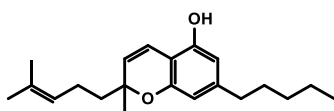
Tetrahydrokannabinolsav
(THCA)
M = 358,5 g/mol



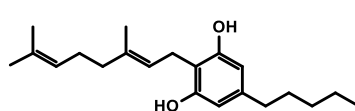
Δ⁹-Tetrahydrokannabinol
(THC)
M = 314,5 g/mol



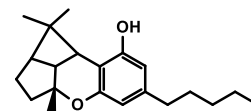
Kannabinol (CBN)
M = 310,4 g/mol



Kannabikromén (CBC)
M = 314,5 g/mol

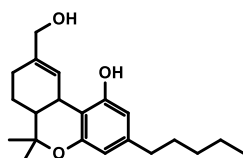


Kannabigerol (CBG)
M = 316,5 g/mol

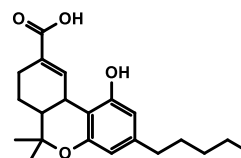


Kannabiciklol (CBL)
M = 314,5 g/mol

Kannabinoid metabolitok



11-hidroxi-Δ⁹-THC (11-OH-THC)
M = 330,5 g/mol

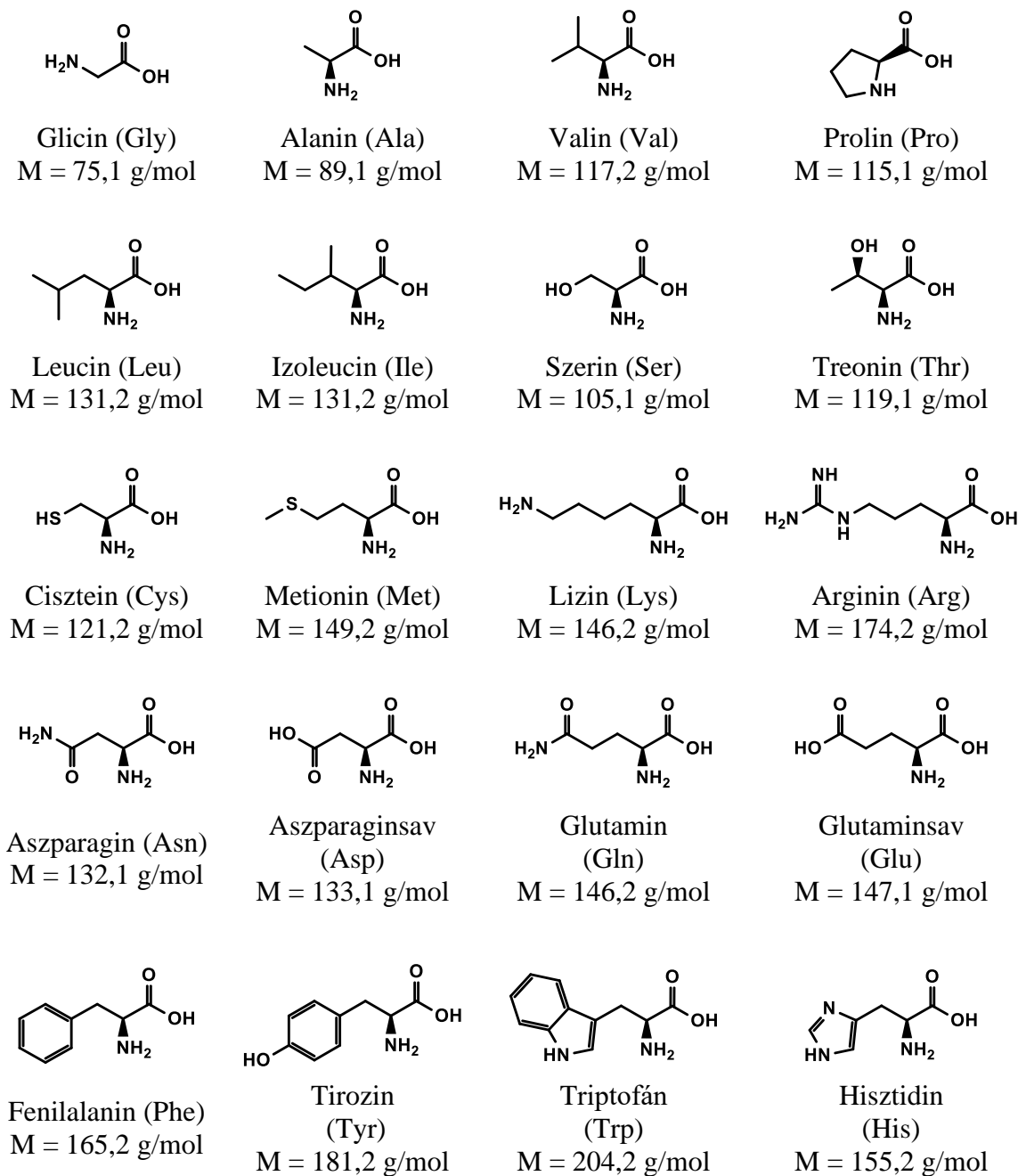


11-nor-9-karboxi-THC (THC-COOH)
M = 344,4 g/mol

1. ábra Kannabinoidok és metabolitjai szerkezeti képlete, rövidítése és molekulatömege [M]

1.1.2 Fehérjeépítő aminosavak tulajdonságai és jelentőségük

Az emberi szervezet fehérjéi L, α -aminosavakból épülnek fel (2. ábra) melyek ikerionos szerkezetűek, amfoter tulajdonságúak. Az első AS-at, az aszparagint (Asn), L.-N. Vauquelin és P.J. Robique izolálta spárgából 1806-ban [19]. Valamennyi AS szerkezetében közös építőelem az α -C-atomhoz kapcsolódó karboxil- és amino-csoport. A központi szénhez AS-anként különböző oldallánc kötődik (2. ábra), mely meghatározza a molekula polaritását és sav-bázis karakterét.



2. ábra Fehérjeépítő aminosavak szerkezeti képlete, rövidítése és molekulatömege [M]

Szervezetünk képes az AS-ak többségét (59 %-át) előállítani, azonban az úgynevezett esszenciális AS-akat (41 %): a fenilalanint (Phe), a hisztidint (His), az izoleucint (Ile), a leucint (Leu), a lizint (Lys), a metionint (Met), a treonint (Thr), a triptofánt (Trp) és a valint (Val) kizárólag táplálékkal tudjuk bevinni [20-21]. Az emberi test fehérjei esszenciális és nem esszenciális AS-akból felépülő peptidláncokból állnak, melyekben az egyes építőelemek α -karboxil-csoportja kapcsolódik a soron következő AS

α -amino-csoportjához savamid kötésekkel. Az így létrejövő molekulák számos funkciót ellátnak szervezetünkben: részt vesznek a szerkezetkialakításban (az izmok, a csontok és a bőr felépítésében), az izmok összehúzódásában, az enzimmolekulák felépítésében, a transzportfolyamatokban, a kórokozókkal szembeni védekezésben, továbbá hormonok és növekedési faktorok építőkövei [12, 20]. Biológiaiag szerteágazó és fontos szerepük miatt, az emberi szövetekben és testnedvekben mért fiziológiástól eltérő koncentrációjuk diagnosztikai jelentőségű. A központi idegrendszerben neurotranszmitterként betöltött funkciójuk alapján megkülönböztetünk gátló [alanin (Ala), glicin (Gly), γ -amino-vajsav (GABA)] és serkentő [aszparaginsav (Asp), cisztein (Cys), glutaminsav (Glu)] AS-akat. A szabályozó AS-ak koncentrációjának változása összefüggésbe hozható pszichiátriai és neurológiai betegségekkel. A serkentő AS-ak túlzott jelenléte roncsolhatja az idegsejteket, mely agyi ischémia, epilepszia és Alzheimer betegségben nyilvánulhat meg [22]. A mitokondriális betegség összetett tünetegyüttessel (izomgyengeség, látászavar, tanulási nehézség, cukorbetegség, epilepszia és memóriazavar) jelentkező kórkép, melyre a vérplazma emelkedett Ala és/vagy prolin (Pro) szintje utalhat, különösképpen, ha tejsavas acidózissal is társul [23]. A gátló ingerületátvivő molekulák megnövekedett koncentrációja szorongást és különféle motoros diszfunkciókat okozhat [22].

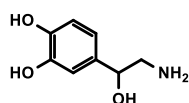
A neurotranszmitter funkcióval nem rendelkező AS-ak is részt vesznek a szervezet normál működésének fenntartásában vagy éppen betegségek kialakulásában, ezért koncentrációjuk megfelelő szinten tartása nélkülözhetetlen. Az elágazó láncú aminosavakat [(BCAA): Leu, Ile és Val)] tartalmazó étrend-kiegészítők azért is népszerűek a sportolók körében, mert a plusz Leu-bevitel révén serkentik az izmok fehérje szintézisét, ezáltal növelve az izomerőt. A bennük lévő Ile a cukoranyag homeosztázisáért felelős, segíti az izmok cukorfelvételét [24]. A sok jótékony hatása mellett a BCAA-készítmények túlzott fogyasztása módosíthatja a szerotonin (ST) és a DA szintjét, ezáltal befolyásolhatja az agyi viselkedést, mely hosszú távon neurodegeneratív kórkép kialakulásához vezethet [25]. A Phe és a káros bomlástermékeinek felhalmozódása a szervezetben általában nem a túlzott bevitel miatt alakul ki, hanem a tetrahydrobiopterin, illetve a dihydrobiopterinreduktáz hiánya vagy a fenilalanin-hidroxiláz enzim hibás működésének következtében. A fenilketonuria az egyik legismertebb örökletes anyagcserezavar, melynek jellemző tünete a szellemi leépülés. Éppen ezért a betegséget már csecsemőkorban szűrik, a vizsgálathoz beszárított

vércsepp Phe és tirozin (Tyr) koncentrációját vagy a két vegyület koncentrációarányát mérik tandem tömegspektrométerrel (MS/MS) [26]. A fenti példákból egyértelművé válik, hogy az AS-ak mennyiségi meghatározása kulcsfontosságú lehet diagnosztikai szempontból is.

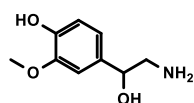
1.1.3 Biogén monoaminok és metabolitjaik

A monoamin neurotranszmitter vagy BMA elnevezés magába foglalja a catecholamin típusú vegyületek: epinefrin (EP), norepinefrin (NE), normetanefrin (NORMNE), DA, tiramin (TYR) és 3-metoxi-tiramin (3-MeTYR), valamint a triptamin típusúak: ST, triptamin (T) és 5-metoxi-triptamin (5-MeT) képviselőit (3. ábra). A catecholaminok közös szerkezeti eleme a benzol gyűrűhöz kapcsolódó két hidroxilcsoport (pirokatechin-gyűrű), melyek közül az egyikhez metilcsoport kötődhet.

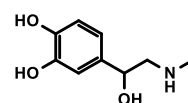
Katecholaminok



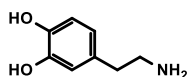
Norepinefrin (NOREP)
M = 169,2 g/mol



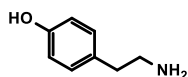
Normetanefrin (NORMNE)
M = 183,2 g/mol



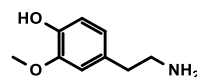
Epinefrin (EP)
M = 183,2 g/mol



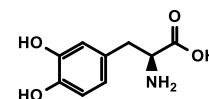
Dopamin (DA)
M = 153,2 g/mol



Tiramin (TYR)
M = 137,2 g/mol

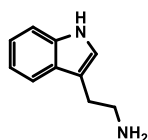


3-metoxi-tiramin
(3-MeTYR)
M = 167,2 g/mol

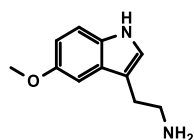


3,4-dihidroxi-
fenilalanin
(1-DOPA)
M = 197,2 g/mol

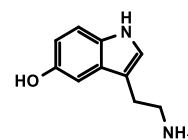
Triptaminok



Triptamin (T)
M = 160,2 g/mol



5-metoxi-triptamin (5-MeT)
M = 190,2 g/mol



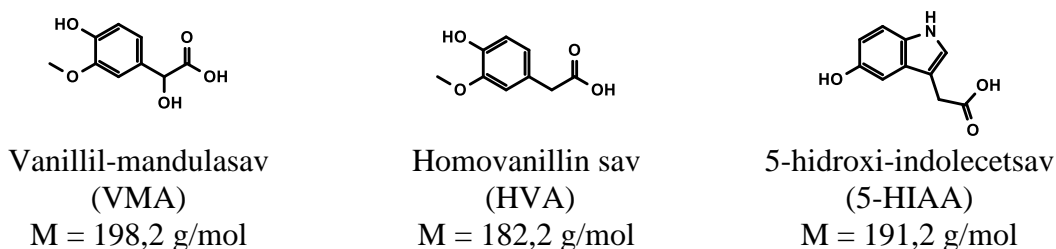
Szerotonin (ST)
M = 176,2 g/mol

3. ábra Biogén monoaminok szerkezeti képlete, rövidítése és molekulatömege [M]

Az etil-lánc, amit hidroxilcsoport szubsztituálhat, primer vagy szekunder aminocsoportban végződik. A triptamin/indolamin típusú vegyületekben az indol-gyűrű és terminális aminocsoport között szintén etil-lánc található. A gyűrű a C₅-ös helyen hidroxil- vagy metoxicsoportot tartalmazhat.

A katecholaminok szintézise (ld. függelék 2. és 4. ábra) a mellékvesevelőben Tyr-ból, 3,4-dihidroxi-fenilalaninon (l-DOPA) keresztül, az indolamin ST-é, más néven az 5-hidroxi-triptaminé Trp-ból történik. Inaktiválásukban és lebontásukban (ld. függelék 3. és 5. ábra) a monoamino-oxidáz és a katechol-O-metiltransferáz enzimek játszanak szerepet [20]. A folyamat végén, oxidatív dezaminálást követően, a DA-ból homovanillinsav (HVA), az EP-ből és a NOREP-ből a vanillil-mandulasav (VMA), míg a ST-ből az 5-hidroxi-indolecetsav (5-HIAA) keletkezik [27].

Az idegrendszerben a BMA-ok (3. ábra) ingerületátvivők, azaz neurotranszmitterek, ezért túlzott fogyasztásuk egészségügyi panaszokhoz vezethet, pl. a TYR ún. „sajtreakcióban” akut vérnyomás és vércukorszint emelkedést okozhat [28-29]. A ST a magatartási folyamatokban, az alvás-ébrenlét ciklusban és az étvágy szabályozásában játszik szerepet, továbbá részt vesz a hipofízis hormonszekréciójában is [20, 30]. Biológiai fontosságuk miatt a BMA-ok és a savas metabolitjainak (4. ábra) a vérben vagy a vizeletben mért koncentrációja indikátor szerepet játszik a neurológiai betegségek diagnosztizálásában. Parkinson-kórban a HVA koncentrációja lecsökken [20]. A T mennyisége a skizofréniával, depresszióval és figyelemzavarral [29], a vizelet emelkedett HVA és VMA szintje a neuroblasztomával [31] hozható összefüggésbe.



4. ábra Biogén monoamin metabolitok szerkezeti képlete, rövidítése és molekulatömege [M]

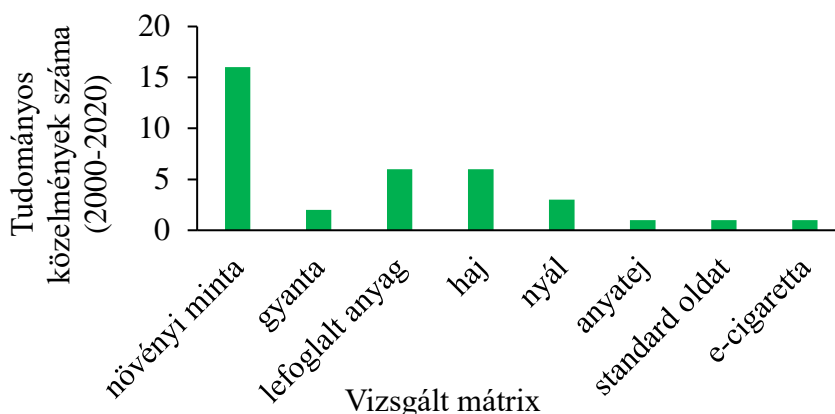
A szerkezeten kívül a természetben is számos helyen megtalálhatók, növényekben és állatokban, valamint a feldolgozásukkal készült élelmiszerekben is megjelennek [28]. Húsok, tejtermékek minőségének a tárolás alatt bekövetkező változása nyomon követhető

a termékek BMA-koncentrációjának mérésével [32]. A különféle borok származási helye, szintén megállapítható ezen vegyületek mennyiségi meghatározásával [33-34].

1.2 Modellvegyületek meghatározása származékképzés nélkül a GC módszerével

A növényi KBND-ok használata hosszú múltra tekint vissza, így a szakirodalomban számos műszeres mérési lehetőségeiket taglaló forrás található. A legújabb kutatási irányzatok megismerése céljából PhD-munkám alatt a 2000-2020 időintervallumban tanulmányoztam az irodalmat.

A feldolgozott tudományos közleményekből kiderült, hogy a növényi KBND-ok gázkromatográfiásan származékképzés nélkül (1. táblázat), valamint perfluoracil- és trialkilszilil származékká alakítást követően is mérhetők (2., 3. és 6. táblázat). Származékképzés nélkül először 1968-ban Aramaki és mtsai vizsgálták növényi minta KNBD-tartalmát lángionizációs detektort (FID) alkalmazva [35]. Az utóbbi húsz év publikációt, melyben a kromatográfiás elválasztást nem előzte meg származékképzés, mátrix szerint csoportosítva (5. ábra), azt láthatjuk, hogy a módszert azóta is főként növényi minták összetételének meghatározására használták [36-52]. A FID töretlen népszerűsége annak is köszönhető, hogy a hatóság által lefoglalt szárított növényi maradványokat [13, 53-57] vagy a gyanta származékokat [53] a módszerrel gyorsan és hatékonyan tudták azonosítani. Ezekben a kutatásokban elsődleges szempont volt a kémiai összetétel megállapítása, melyhez a FID elegendő információt biztosított [13, 37-38, 41-44, 51, 53-54], mivel a növények kemotípus szerinti besorolása a hatóanyagok egymáshoz viszonyított aránya alapján történt. Azokban a tanulmányokban, ahol biológiai minta KNBD-tartalmát mérték FID helyett tömegspektrometriás (MS) detektálást használtak. A származékképzés nélküli biológiai minták közül a leggyakoribb a haj [58-63] volt, amit a nyál [64-66] követett. Standard oldatokat [67], e-cigaretta töltő folyadékát [68] és az anyatejbe [69] bekerülő KNBD-kat egy-egy esetben vizsgálták.



5. ábra A vizsgálat mátrixok megoszlása a származékképzés nélküli tanulmányokban 2000-2020 közötti

A mátrix típusa nemcsak a detektort, hanem a mintaelőkészítés módját is meghatározta. Növényi szövet vizsgálatokor először a minta víztartalmát távolították el hagyományos szárítással (szabad levegőn vagy szárítószekrényben) és liofilizálással. A hatóanyagokat szerves oldószerrel, pl. etanollal (EtOH) [37, 51, 57], metanollal (MeOH) [46, 50, 52-53], hexánnal [36], tetrabutil-ammónium-hidroxiddal (tBuOH) [56] vagy oldószerkeverékekkel [13, 41-44, 54] vonták ki. Speciális eljárásként jelent meg a szuperkritikus folyadék extrakció [45, 47] és a kávékapszula kivonás, melyben újratölthető kávékapszulába helyezték a feldarabolt növényi mintát, majd ezt a kávéfőző gépbe illesztve engedték át rajta az extraháló-oldatot [55]. A klasszikus folyadék extrakciós eljárások mellett gőztéranalízissel társított szilárd fázisú mikroextrakciót (HS-SPME) is alkalmaztak növény, haj és anyatej KNBD-tartalmának vizsgálatára [39-40, 60-61, 69]. Haj elemzésénél, amennyiben a kábítószer-fogyasztás tényét kívánták igazolni, első lépésként a minták felületét megtisztították szerves oldószerrel az esetleges szennyeződésektől. A mosást gyakran lúgos hidrolízis követte, majd az extrakció. A biológiai minták előkészítése, ami a megfelelő érzékenységet biztosította, általában származékképzés nélkül is egy több lépéses, hosszú és munkaigényes folyamat volt.

1. táblázat KNBD-ok gázkromatográfiás vizsgálata származékképzés nélkül

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Adatgyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
			ng/ml; ng/mg			
levél/50 mg	extr. (EtOH)	FID	-	-	THC, CBD, CBC	[37]
növény/50 mg	extr. (CHCl ₃)	FID	-	-	THC, CBD, CBDV, THCV, CBC, CBGM, CBG	[38]
haj/50 mg	hidr., seml. extr. (hexán: ETAC (9:1))	GC-MS-SIM	0,024	0,080	THC, CBD, CBN	[58]
növény/60 mg	HS-SPME	FS	-	-	THCV, CBCL, CBV, CBD, CBC, THC, CBG, CBN	[39-40]
haj/50 mg	*mosás	GC-MS-SIM	0,05-0,07	0,19-0,25	THC, CBN	[59]
gyanta tömb/25 mg	extr. (hexán)	GC-MS-SIM	-	-	Δ^8 - és Δ^9 -THC, CBN, CBD, CBV, CBC, CBL	[36]
haj/10 mg	mosás, hidr., HS-SPME	GC-MS-SIM	0,07	0,12	THC, CBN, CBD	[60]
lefoglalt por/100 mg	extr. (kloroform: MeOH (1:9))	FID	-	-	THC, CBN, CBD	[13]
lefoglalt gyanta és növény/25 mg	extr. (MeOH)	2D-GC-FID	-	-	THC, CBD (<i>heroin</i>)	[53]
nyál/0,2 ml	PMME	GC-MS-SIM	0,68	2,26	THC	[64]
növény/20-100 mg	extr. (kloroform: MeOH (1:9))	FID	-	-	THC, THCV, CBD, CBC, CBG, CBN	[41-44]
haj/10 mg	hidr., HS-SPME	GC-MS-MRM	0,007- 0,031	0,012- 0,062	THC, CBN, CBD	[61]
haj/50 mg	hidr., extr. (vizes oldat + pentán)	GC-MS-SIM	0,015	0,02	THC (<i>kokain</i>)	[62]
növény/50 mg	SFE, FUSE	GC-FS, GC-MS-SIM	-	-	THC, CBD, CBN	[45]
nyál/0,1 ml	SPME	GC-MS-SIM	0,5-2	2-200	THC, CBN, CBD	[65]
növény/0,2 g	extr. (MeOH)	GC-MS-FS	-	-	THC, CBN, CBD, CBG	[46]
növény/50 mg	SFE (SC-CO ₂ , EtOH)	GCxGC- FID/MS	-	-	THC, CBN, CBC, CV, CBG (<i>terpének</i>)	[47]
növény/25 g	extr. (hexán)	GC-MS	-	-	THC, CBD, CBN	[48]
lefoglalt növény/0,1 g	extr. (kloroform: MeOH (1:9))	FID	-	-	THC, THCV, CBD, CBC, CBG, CBN	[54]

1. táblázat folytatása

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Adatgyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
			ng/ml;	ng/mg		
növény/50 mg	párolgató, SPE	GC-MS-SIM	-	1-2 µg/ml	CBD, CBC, THC, CBN	[49]
anyatej/50 µl	HS-SPME	GC-MS-SIM	10	20	CBD, CBN, THC	[69]
haj/10-100mg	extr. (MeOH)	GC-MS-SIM	0,003- 0,015	0,009- 0,049	THC, CBD, CBN (<i>egyéb LC-MS</i>)	[63]
növény (komló)/10 mg, 100 mg	extr. (MeOH)	GC-MS-MRM (QqQ)	6,0-69 pg/inj.	-	THCV, CBC, CBD, Δ ⁸ - és Δ ⁹ -THC, CBG, CBN, Δ ⁹ -THCA	[50]
standard oldat	-	GC-VUV _{240nm}	5 ppm	-	THCV, CBD, CBC, Δ ⁸ - és Δ ⁹ -THC, CBG, CBN, Δ ⁹ -THCA	[67]
lefoglalt növény/ 0,2 g	kávékapszula extr. (IPA)	GC-Q-SIM GC-IMS	50-90 200	170-300 500	THC, CBN, CBD THC + CBD	[55]
nyál/0,5-1,5 ml	SPME	GC-MS-SIM	1-5	1-10	THC, CBN, CBD (<i>9 szintetikus KNBD</i>)	[66]
növény/2 g	liofilizálás, extr. (EtOH)	GC-FID	-	-	Δ ⁸ - és Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA	[51]
lefoglalt növ./10 mg	extr. (tBuOH)	Q-MS-FS	-	-	Δ ⁹ -THC, CBN, THCV, CV, CBC, CBD,	[56]
e-cigaretta/0,2 ml	extr. (hexán + ETAC)	GC-MS-FS FTIR	-	-	CBD, CBN, Δ ⁸ - és Δ ⁹ -THC, CBCi, CBEA; CBL; CBDV; CBG; CBC	[68]
kendermag/1g olaj/0,2 ml	extr. (MeOH)	GC-MS-SIM	0,005- 0,01 5-20	0,01-0,05 10-50	THC, CBD, CBN	[52]
lefoglalt növ./100 mg	extr. (EtOH)	GC-MS-FS	-	-	CBDV, THCV, CBD, CBC, THC, CBN, CBG (<i>2 ismeretlen KNBD</i>)	[57]

Jelölések: ld. Rövidítések, valamint - = nincs adat; extr. = egyszerű vagy ultrahangos rázatás/kivonás, amit szűrés követ; CBGM = kannabigerol monometiléter, THCV = tetrahydrokannabivarin; hidr. = savas/lúgos vagy enzimatis hidrolízis; *mosás = a marihuána füstnek 60 percig kitett minta tisztítása három mosó oldattal; PMME = polimer monolit mikroextrakció; HS-SPDE = gőztér elemzés szilárd fázisú dinamikus extrakcióval; SFE = szuperkritikus folyadék extrakció; SC-CO₂ = szuperkritikus szén-dioxid; FUSE = fókuszált ultrahangos extrakció; 2D = két dimenzió; inj. = injekció; IMS = ion mozgékonyan alapuló spektroszkópia; növ. = növény; Q-MS = kvadrupol-MS; FTIR = Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia; CBCi = kannabicitrán; CBEA = kannabielzoin sav

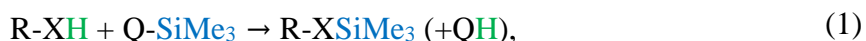
Összeségében a származékképzés nélküli GC-s elválasztás legnagyobb hátránya, a hosszú extrakciós eljárások mellett, hogy a THCA-ból és a CBDA-ból az injektorban magas hőfok hatására dekarboxileződéssel THC és CBD keletkezik, ez a módszer alkalmazhatóságát növényi minták KNBD összetételének meghatározására korlátozta. További problémát jelentett, hogy a szerves oldószeres extrakciót követően számos egyéb hatóanyag is a kivonatba jutott. A hatóanyagok szelektív mérését MS detektálási módszerekkel segítették.

A KNBD-okkal szemben az AS-ak származékká alakítása elkerülhetetlen a GC-elválasztásukat megelőzően nagy polaritásuk és kis illékonyságuk miatt. A BMA-okra szintén nem jellemző az extrakciót követő közvetlen injektálás. Az utóbbi 20 évben közzétett és általam tanulmányozott szakirodalmi adatok szerint a HPLC és GC tudományterületén gyakran alkalmaztak származékképzést. A HPLC-s mintaelőkészítésnél a klasszikusan az aminocsoportot szubsztituáló reagensek mellett a detektálás szelektivitását célzó technikák kerültek előtérbe, míg a GC-t alkalmazó meghatározásoknál a kloroformátos és kétlépcsős származékká alakítás (trialkilszililezést követő acilezés) biztosította a megfelelő érzékenységet.

1.3 Modellvegyületek GC-MS meghatározása származékképzést követően

1.3.1 Meghatározás trimetilszilil származékként

A trimetilszililezést a hidroxil-, a tiol-, az amino- és az amidcsoportok, valamint a szerves savak aktív hidrogénjének lecserélésére használják, aprotikus, aktív hidrogénnel nem rendelkező oldószer jelenlétében (pl. dimetil-formamid, piridin (PYR) és acetonitril (ACN)). Az eljárást az (1) egyenlet foglalja össze:



ahol R-HX a célvegyület és R-XSiMe₃ a trimetilszililező reagens [3].

Általánosságban a hidroxil- és karboxil- funkciós csoportok szililezése jobb eredményt ad, mint a primer és szekunder aminok vagy amidok átalakítása. A több funkciós csoportú molekulákból részlegesen vagy teljesen szililezett termékek készíthetők [2]. A származékká alakítandó minta funkciós csoportja szerint a reaktivitási sorrend a következő: alkoholok > fenolok > karbonsavak > aminok > amidok > tiolok [3,

70]. A reakcióhoz legtöbbször a számított reagens elegy sztöchiometrikus mennyiségének tízszeresét alkalmazzák.

A reagensok között a szililező képesség szerint a következő sorrend állítható fel: HMDS < TMCS < *N*-metil-*N*-(trimetilszilil)acetamid < MSTFA < bisz(trimetilszilil)-acetamid < BSTFA < *N*-trimetilszilil-imidazol (TMSIm). A származékképző szerek önmagukban vagy több reagens elegyként használatosak [2]. A keverékek közül a TMSIm:BSTFA:TMCS 1:1:1 elegye a legerősebb [3].

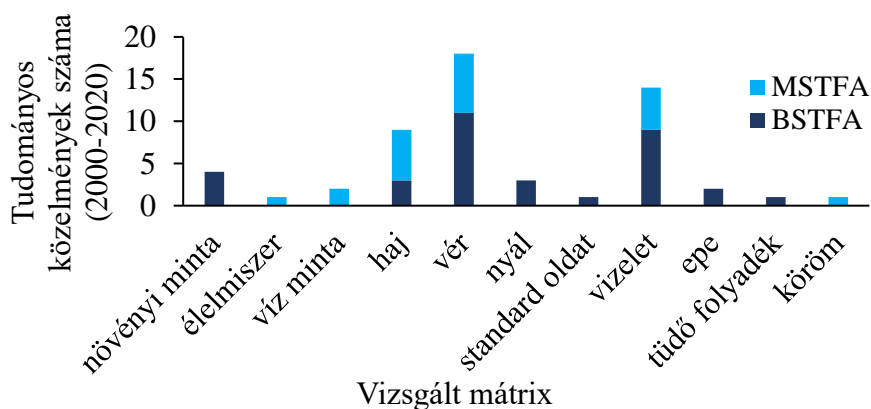
A módszer hátránya, hogy az (1) egyenlet szerint a szerves vegyületeken kívül számos aktív hidrogénnel rendelkező vegyület pl. H₂O, H₂O₂ vagy a szerves savak is reagálnak a származékképző szerekkel. A mellékreakciók elkerülésének érdekében a mintákat vagy az azokból készített extraktumokat a származékképzési lépés előtt szárazra kell párolni rotációs vákuumbepárló vagy N₂-áram segítségével. A reakcióban keletkező termékek érzékenyek a hidrolízisre, ezért az alkalmazott reagensfelesleget az injektálást megelőzően sem célszerű eltávolítani [71].

1.3.1.1 KNBD-ok trialkilszilil származékképzési lehetőségei

A KNBD-okat is vízmentes közegben alakították származékká, általában az érélyesebb reagensnek számító BSTFA-val (2. táblázat) és MSTFA-val (3. táblázat). A trimetilszililezés az előbbi két vegyülettel a legkülönbözőbb minták KNBD-tartalmának meghatározását megelőző mintaelőkészítés része volt.

A vizsgált mátrixokat összegezve (6. ábra), megállapítható a növényi [50-51, 72-73], és környezeti víz [74-75] minták, valamint a kenderből készült élelmiszerek [76] háttérbe szorulása, ugyanakkor a biológia minták széles körű tanulmányozása. A [77] publikációban teljes farmakokinetikai vizsgálatot végeztek disznó vér, epe, vese, szív, tüdő, izom, lép, zsírszövet, máj, üvegtest és agy mintákon. A kábítószer fogyasztás igazolására, illetve KNBD kimutatására élő szervezetben leggyakrabban vér [77-94], vizelet [78, 86-87, 95-105] és haj [58, 78, 106-112] mintát vizsgáltak, de körömből [113], nyálból [87, 100, 114], tüdőfolyadékából [115] és epéből [77, 116] is sikerült kimutatni ezen vegyületeket. A haj minták előkészítése megegyezett az 1.2 fejezetben ismertetett eljárással. Az extraktumokat bepárlás és szerves oldószeres visszaoldást követően alakították származékká. Ha a kábítószer fogyasztás igazolása volt a cél, a hajban a THC

metabolitjait keresték, akárcsak a többi emlős szövetben és testnedvben. Vér és vizelet minták THC-COOH- és 11-OH-THC-tartalmának meghatározásánál fontos szempont volt a vegyület sav-bázis karaktere. Ezért a kivonásnál két frakciót gyűjtöttek [58, 77, 82, 85, 87, 89-92, 109-110, 113, 116]. A KNBD-ok és a 11-OH-THC-kivonását semleges/enyhén lúgos közegből, míg a THC-COOH-ét gyakran savasból végezték. A bomlástermékeket vizsgáló tanulmányok fele csak a THC-COOH-t [58, 74-75, 78, 82, 87, 89, 95-96, 98-101, 105, 108-109, 113-114, 116], míg a másik fele mindkét vegyületet [67, 77, 79, 81, 83-86, 88, 90-93, 97, 102-103, 110, 112, 115] mérte. Ezekben a kutatásokban a 11-OH-THC és THC-COOH glükuronid konjugátumait származékká alakítás előtt hidrolízissel bontották.



6. ábra A trialkilszililezési KNBD vizsgálatok mátrix szerinti megoszlása 2000-2020 között

Lúgos hidrolízisnél [58, 77-78, 87, 95-96, 98-100, 105, 109, 113, 115] NaOH vagy KOH jelenlétében melegítették a mintát, míg az enzimátikus eljárást β -glükuronidázzal végezték [79, 81, 83, 101-104, 116]. A [97] tanulmány szerzői kétlépcsős hidrolízist alkalmaztak, ahol az enzimátikus bontást a lúgos követte. Vér és vizelet mintáknál a glükuronid hidrolízisét négy tanulmányban előzte meg fehérjekicsapás, ami után centrifugálták vagy szűrték a mintákat [82, 84, 93, 116]. A fehérjeeltávolítás és a metabolitfelszabadítás után a mintaelőkészítést a célvegyületek kivonásával folytatták.

A KNBD-ok dúsítására a kutatások felében folyadék extrakciót használtak [50-51, 58, 67, 72-73, 76-78, 86-88, 91-92, 94, 100-101, 104-105, 110, 113, 115]. Leggyakrabban különféle szerves oldószerkeverékekkel vonták ki a hatóanyagot [76-78, 87-88, 91-92, 94, 96, 99-101, 104-105, 109-110, 113, 115], általában a hexán:etil-acetát (ETAC) 9:1 (v/v)

összetételt alkalmazták. További folyadék extrakciós lehetőségként megjelent az ETAC [86], az ACN [72], a hexán [73], a MeOH [50, 73] és az EtOH [51, 72]. A semleges és savas frakció külön gyűjtésénél először a kivonószert alkalmazták önmagában, majd a szerves fázis eltávolítása után a mintát savanyították és a kivonást megismételték. Az extrakció után a szerves fázisokat egyesítették és beszárították, kivétel [110], ahol THC-COOH-tartalmú savas extraktumot külön acilezték. A célvegyületek dúsításának másik gyakori módja a szilárd fázisú extrakció (SPE) [74, 79-85, 89-90, 95, 97, 102-103, 108, 111-112, 114, 116] volt, ritkán az SPME-t [75], illetve ennek gőztéranalízissel társított változatát (HS-SPME) is alkalmazták [106-107]. Vájtüregű membrán (HF-LPME) [98] és előre töltött oszlop (MEPS) [93] felszínén történő mikroextrakciókra egy-egy példát találtam.

A dúsítást követő származékképzésnél a szililező reagenseket vizsgálva megállapítható, hogy a leggyakrabban a BSTFA-t 1% TMCS katalizátorral együtt alkalmazták, kivétel [78, 96, 99], ahol önmagában került felhasználásra, valamint [73], ahol 2% TMCS volt a származékképző elegyben. Az MSTFA-t előnybe részesítő kutatásokban általánosan mellőzték a katalizátort. Ennek ellenére néhányszor itt is használtak TMCS-t 99:1 [101], 98:2 [76] vagy extrém esetben 95:5 [93] térfogat arányban. A TMCS-nál erélyesebb katalizátort, a trimetilszilil-jodid (TMSI) alacsony, 0,2%-os koncentrációban alkalmazták [109]. Speciális összetételként jelent meg az MSTFA/NH₄I/DTE [102, 108] és az MSTFA /NH₄I/etántiol [105]. A mintaelőkészítésnél legtöbbször a bepárolt kivonatokhoz közvetlenül adták a származékképző reagenst, a minták visszaoldása nélkül. Az oldószert alkalmazók közül legtöbben az ETAC-ot [50-51, 67, 79, 81, 86, 99, 114, 116] használták, míg a PYR-t három [72-73, 80], a toluolt [82] egy kutatócsoport választotta.

Az összehasonlítás a publikációk alapos áttanulmányozása után is nehéz az eltérő mátrixok és detektálási módszerek miatt. A reagenseket és az oldószereket általában korábbi irodalmi adatok alapján alkalmazták, a választás okát nem indokolták. A reagenseknél, a katalizátoroknál és az oldószereknél tapasztaltaknál is nagyobb volt az alkalmazott reakciókörülmények változatossága. A reakcióhőfok 37-125 °C, míg a reakcióidő 1-60 perc között változott. Leggyakrabban 70 °C-on készítették a származékokat [50-51, 67, 76-78, 82-84, 86, 88, 90, 95, 97, 99-101, 108, 113, 115-116], ezt követte a 80 °C [72, 74, 79, 81, 89, 91, 104, 112] és a 60 °C [80, 94, 96, 102, 109,

114]. Három-három tanulmányban találtam 65 °C-ot [58, 85, 111] és 90 °C-ot [98, 103, 107], míg egy-egy publikációban 37 °C [73], 40 °C [75], 75 °C [110], 85 °C [93], és 125 °C [106] volt a közölt érték. A kutatások közel felében 30 percig reagáltatták a mintákat [50-51, 67, 72, 76, 83, 85-86, 89, 91, 96, 99-100, 104, 108, 110-111, 115-116]. Ennél rövidebb reakcióidőt tizenhat esetben alkalmaztak, rendre 1 [112], 8 [107], 10 [75, 95], 15 [78, 98, 113-114] és 20 percet [58, 77, 82, 90, 101-102, 106, 109]. Egy óras származékká alakítást négy [73-74, 80, 88], negyvenöt perceset öt [79, 81, 84, 97, 103], míg negyven perceset két [93-94] publikációban olvastam. A reakcióhoz szükséges körülményeket egy kutatásban mikrohullámú feltáráberendezéssel biztosították, 750W teljesítményen 1,5 percig melegítették a mintát. Legtöbb tanulmányban a reakciókörülményeket sem optimalizálták, hanem korábbi kutatómunkákra hivatkozva alkalmaztak egy-egy származékképzési módszert.

A mintaelőkészítéssel ellentétben az adatgyűjtésnél már egyértelmű volt, hogy a legtöbbek által választott SIM (selected ion monitoring) módszerrel a szelektivitást és az érzékenységet növelték a FID-hez képest, akárcsak az MS/MS adatgyűjtéssel, amit tizenhárom kutatásban alkalmaztak. Teljes pásztázás (FS) (full scan) üzemmódban csak ritkán [72-73, 77, 89, 104] gyűjtöttek adatot. Speciális detektálásként jelent meg a vákuum ultraibolya spektroszkópia (VUV) [67], mellyel standard vegyületeket azonosítottak mennyiségi meghatározás nélkül. Hat tanulmány standard oldatok mérése mellett addícióval igazolta a módszerük gyakorlati alkalmazhatóságát plazma/vér [78, 80, 86], különféle élelmiszerek [72], vizelet [86, 101] és komló [50] mátrixot vizsgálva. Sokkomponensű minta összetevőinek elválasztására a két dimenziós gázkromatográfiát (2D-GC-MS) találták megfelelőnek [82-84, 88, 97].

2. táblázat KNBD-ok gázkromatográfias tömegspektrometriás vizsgálata BSTFA-val képzett szilil származékokként

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Származékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (egyéb vegyületek)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g			
vér, vizelet/1 ml haj/50 mg	hidr., extr. (hexán:ETAC 9:1))	BSTFA	70	15	MS/MS (SRM)	-	5	THC-COOH	[78]
vizelet/1,5 ml	hidr., SPE	BSTFA, 1% TMCS	70	10	SIM	2,45	9,48	THC-COOH	[95]
plazma/1 ml	hidr., SPE	BSTFA, 1% TMCS	80	45	SIM (PCI)	0,5-1,0	0,5-1,0	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[79]
nyúl, humán plazma/0,5 ml	SPE	BSTFA, 1% TMCS	60	60	SIM (EI)	-	10	THC	[80]
haj/50 mg	hidr., savas extr. (hexán: ETAC (9:1))	BSTFA, 1% TMCS	65	20	SIM (EI)	15	51	THC-COOH	[58]
malac vér/5 ml egyéb szöv./0,2 g	hidr., extr. (hexán: ETAC (7:1))	BSTFA, 1% TMCS	70	20	FS (EI)	-	0,5-5	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[77]
plazma/1 ml	hidr., SPE	BSTFA, 1% TMCS	80	45	SIM (PCI)	-	0,5-1	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[81]
vér/1 ml	deprot., SPE	BSTFA, 1% TMCS	70	20	2D-GC-MS (EI)	-	1,0	THC, THC-COOH	[82]
vizelet/1 ml	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	BSTFA	60	30	SIM	0,8	2,6	THC-COOH	[96]
plazma/1 ml	hidr., SPE	BSTFA, 1% TMCS	70	30	2D-GC-MS (EI)	0,125-0,25		THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[83]

2. táblázat folytatása

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Származékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g			
haj/100 mg	hidr., HS-SPME	BSTFA, 1% TMCS	125	20	SIM	10-16	39-48	THC, CBD, CBN	[106]
nyál/1 ml	SPE	BSTFA, 1% TMCS	60	15	SIM (EI)	-	0,1-1	THC, CBD, CBN, THC-COOH	[114]
vér/1 ml vizelet/2 ml	deprot. hidr.	SPE BSTFA, 1% TMCS	70	45	2D-GC-MS	-	0,25- 0,50	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[84, 97]
epe/1 ml	hidr., deprot., SPE		BSTFA, 1% TMCS	70	30	SIM (EI)	0,28	0,86	THC, THC-COOH
vizelet/1 ml	hidr., HF-LPME	BSTFA, 1% TMCS	90	15	SIM (EI)	1,5	2,0	THC-COOH	[98]
vér/0,5 ml	SPE	BSTFA, 1% TMCS	65	30	MS/MS MRM	0,29- 0,33	0,87- 0,99	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[85]
növény, olaj, élelmiszer/ 0,03-3 g	extr. (ACN vagy EtOH)	BSTFA, 1% TMCS	80	30	FS	1 µg/g	-	CBD, CBDA, Δ ⁸ - és Δ ⁹ -THC, THCA, CBN, CBG, CBGA, CBDV, THCV, CBC	[72]
vér, vizelet/-	extr. (ETAC)	BSTFA, 1% TMCS	70	30	MS/MS QqQ MRM	75 ppb 25 ppm	-	THC, 11-OH-THC THC-COOH	[86]
növény (komló)/ 10 mg, 100 mg	extr. (MeOH)	BSTFA, 1% TMCS	70	30	MS/MS QqQ MRM	1,8- 101 pg/µl	-	THCV, CBC, CBD, Δ ⁸ - és Δ ⁹ -THC, CBG, CBN, Δ ⁹ -THCA	[50]
standard oldat	-	BSTFA, 1% TMCS	70	30	GC- VUV _{240nm}	3-10 ppm	-	THCV, CBD, CBC, Δ ⁸ -és Δ ⁹ -THC, CBG, CBN, Δ ⁹ -THCA 11-OH-THC, THC-COOH	[67]

2. táblázat folytatása

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Szarmazékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g			
vizelet/ 0,15 ml	hidr., extr. (ETAC:hexán (1:4))	BSTFA	90	15	SIM	1	2,5	CBN, CBD, THC-COOH	[99]
növény/2 g	liofilizálás extr. (EtOH)	BSTFA, 1% TMCS	70	30	SIM (EI) GC-FID	2,6- 6,1 6,1- 12,4	8,7- 20,4 20,4- 41,2	Δ^8 -és Δ^9 -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA	[51]
nyál, vizelet/ 1 ml	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	BSTFA, 1% TMCS	70	30	SIM	0,2-0,3	0,8-0,9	THC, CBD, THC-COOH	[100]
tüdő folyadék/ 1 ml	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	BSTFA, 1% TMCS	70	30	SIM	0,2-0,3	0,5-0,8	CBD, CBN, THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[115]
növény/ 100 mg	extr. (MeOH + hexán)	BSTFA, 2% TMCS	37	60	QTOF- FS (EI)	-	-	CBDV, Δ^9 -THCV, CBD, CBL, CBDVA, CBDA, CBGA, CBC, Δ^8 - és Δ^9 -THC, CBG, CBN, THCA, (160 egyéb)	[73]
nyál, vér, vizelet/2 ml	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	BSTFA, 1% TMCS	-	-	SIM	-	0,2-0,3	THC, CBD, THC-COOH	[87]

Jelölések: ld. Rövidítések, 1. táblázat, valamint: PCI = pozitív kémiai ionizáció (positive chemical ionization); deprot. = fehérjekicsapás; HF-LPME = vajtüregű membrán-folyadék mikroextrakció; CBGA = kannabigerolsav; CBDVA = kannabidivarin sav; QTOF = kvadrupol-repülési idő analizátor

Érdemes megjegyezni, hogy a BSTFA reagens alkalmazása főleg Huestis és mtsai [18, 79, 81, 83-84, 97, 117-131] közleményeiben fordult elő. A 2. táblázatban szereplő adatokon kívül további két dimenziós (2D) gázkromatográfiás eljárásokat dolgoztak ki a szelektivitás javítására [124-131]. Az eljárást sokféle területre kiterjesztették és alkalmazták. Mivel a kutatócsoport munkája biokémiai és toxikológiai szempontból is érdekes az analitikusok számára, röviden összegzem a legfontosabb ismérveit:

- Tudományos adatbázist biztosított a nyálban előforduló KNBD-okhoz [124].
- A rendszeres kannabisz használókat vizsgálva karakterizálta a KNBD kiürülését vérből, az eredmények pontosabb ismertetésével [125].
- Optimalizálta a lúgos és az enzimatis hidrolízist a KNBD-ok jobb kinyerésére vizeletből [126].
- Az emberi szervezetben nyomon követte a THC koncentrációját 4-5 napos kannabisz megvonást követően [127].
- Összefüggést állapított meg és írt le a dózis és az adagolások között eltelt idő, valamint a vizeletben mért KNBD koncentráció között [128].
- Nyál mintavevő készülék kidolgozásával biztosította a megbízható analitikai és technikai körülményeket a KNBD-ok meghatározásához. Vizsgálta a minta stabilitásának szerepét a THC, a 11-OH-THC, a THC-COOH, a CBN és a CBD koncentrációk mérésében rendszeres és egyszeri kannabisz fogyasztást követően [129-130].
- Vérplazma farmakokinetikai vizsgálatával különbséget tett a krónikus és eseti kannabisz fogyasztók között [131].

3. táblázat KNBD-ok gázkromatográfiás tömegspektrometriás vizsgálata MSTFA-s származékképzés után

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Származékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g			
haj/10 mg	hidr., HS-SPME	MSTFA	90	8	SIM (EI)	50-140	270- 510	CBD, CBN, THC	[107]
haj/50 mg	hidr., SPE	MSTFA/NH ₄ I/DTE	70	30	MS/MS (SIM)	-	-	THC, CBD, CBN, THC-COOH	[108]
kender élelmiszer/1 ml vagy 1 g	extr. (hexán:IPA (9:1))	MSTFA, 2% TMCS	70	30	SIM (EI)	0,3 -0,6	1-2	THC, CBD, CBN	[76]
vizelet/2 ml	hidr., extr. (CHCl ₃ :IPA (9:1))	MSTFA, 1% TMCS	70	20	SIM (EI)	3	-	THC-COOH (15 egyéb kábítószer)	[101]
köröm/30 mg	hidr., extr. (hexán:ETAC (9:1))	MSTFA	70	15	SIM (EI)	35	200	THC, THC- COOH (<i>amfetaminok</i>)	[113]
vizelet/2 ml	hidr., SPE*	MSTFA/NH ₄ I/DTE	60	20	SIM	0,1	0,2	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[102]
patkány vizelet/ 1 ml	hidr.; SPE	MSTFA	90	45	SIM (EI)	0,08-2	0,21-7	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[103]
folyóvíz/500 ml, szennyvíz/ 100-200 ml	SPE	MSTFA	80	60	MS/MS (SIM)	0,9-3	3-9,9	THC, THC-COOH (12 egyéb kábítószer)	[74]
vizelet/2,5 ml	hidr., extr. (hexán:ETAC (7:1))	MSTFA	80	30	FS (EI)	-	-	CBG	[104]
vér/1 ml	extr. (hexán:ETAC (5:1))	MSTFA	70	60	2D-GC-MS	0,25	0,25- 0,50	CBD, THC, CBN, 11-OH-THC, THC-COOH	[88]
haj/50-100 mg	hidr., extr. (hexán:ETAC (5:1))	MSTFA, 0,2% TMSI	60	20	MS/MS (NCI)	0,01	0,04	THC, THC-COOH	[109]

3. táblázat folytatása

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Származékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g	ng/l		
szennyvíz/10 ml	SPME	MSTFA (SPME szálon)	40	10	SIM (EI)	1-2,5 ng/l	3,3-8,3 ng/l	THC, THC-COOH	[75]
vizelet/1 ml	hidr., extr. (hexán:ETAC (9:1))	MSTFA /NH ₄ I/etántiol MW: 750 W, 1,5 perc			MS/MS (SRM)	0,057	0,189	THC-COOH	[105]
vér/1 ml	SPE	MSTFA	80	30	FS	5	10	THC, THC-COOH (<i>kokain + amfetamin szárm.</i>)	[89]
plazma vagy szérum/1 ml	SPE	MSTFA	70	20	SIM (EI)	0,15- 2,0	0,30- 3,30	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[90]
szérum/1 ml	automatizált extr. (hexán: ETAC (9:1))	MSTFA	80	30	SIM	0,1-0,3	0,6-1,1	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[91]
plazma/1 ml	extr. (hexán: ETAC (9:1))	MSTFA	-	-	MS/MS (QqQ SIM)	-	0,1-0,5	THC, CBD, 11-OH-THC, THC-COOH	[92]
plazma/0,25 ml	deprot., MEPS	MSTFA, 5% TMCS	85	40	MS/MS (MRM)	0,1	0,1	THC, 11-OH-THC, THC-COOH	[93]
haj/50 mg	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	MSTFA	75	30	MS/SM (MRM, NCI)	0,03- 1,4 pg/mg	0,1-4,7 pg/mg	THC, CBD, CBN, 11-OH-THC	[110]
haj/20 mg	hidr., SPE	MSTFA	60	30	MS/MS (QqQ MRM)	1 pg/mg	4 pg/mg	THC, CBD, CBN	[111]
szérum/1 ml	extr. (hexán: ETAC (9:1))	MSTFA	60	40	MS/MS (MRM)	0,05- 0,9	0,2-3,0	THC, 11-OH-THC, THCA, CBD, CBDA, CBG	[94]
haj/25 mg	automatizált hidr., SPE	MSTFA	80	1	MS/MS (MRM)	0,2-2,0 pg/mg	0,5-5,0 pg/mg	THC, CBD, CBN, 11-OH-THC, THC-COOH	[112]

Jelölések: ld. Rövidítések, 1., 2. táblázat, valamint: NCI = negatív kémiai ionizáció; DTE = ditioeritritol; MW = mikrohullámú melegítés; SPE* = kalciummal keményített β -ciklodextrines extrakcióval hasonlítva; MEPS = mikroextrakció előre töltött oszlopon; SRM = választott reakció nyomon követése (selected reaction monitoring)

Az MSTFA és a BSTFA mellett a szintén jól ismert szililező szer, az *N-terc*-butil-dimetil-szilil-*N*-metil-trifluoracetamid (MTBSTFA) alkalmazása elenyésző volt a szililezés eredményességét csökkentő térbeli gátlás miatt (nagy helyigényű terciér-butil csoport bevezetése), de ennek ellenére nem példa nélküli [104, 132-133]. Magyar kutatócsoport vizelet CBG-tartalmát mérte [104]. Balducci és mtsai egy aktuális kérdésre keresték a választ - levegő THC-, CBD- és CBN-tartalmának a mérésével – a helyi drogfogyasztási szokásokat kutatták. A mintákat ciklohexános és kloroformos extrakciót követően MeOH: NaHCO₃ (10:1) elegyével rázatták. A szerves fázist bepárlása után ETAC:MTBSTFA + 1% TMCS (1:1, v/v) eleggyel származékká alakították. A GC-MS/MS vizsgálatkor a levegőben lévő pszichoaktív anyagok mennyisége ~0,001-5,0 ng/cm³ levegő értéknek adódott. Brazil kutatók a THC-COOH jelenlétét keresték újszülöttek magzatszurkában [133]. A mintákat 24 órával a születés után gyűjtötték, majd egy lépésben NaOH-os oldattal bontották a glükuronid konjugátumokat és extrahálták a THC-COOH-t. Az SPE-s dúsítás előtt sósavval semlegesítették az extraktumot. A származékképzéshez 70 °C-on 30 percig melegítették az előzőleg bepárolt oldatot. Validált módszerrel megállapítható volt az anya kannabisz fogyasztása a gesztációs időszakban.

1.3.1.2 AS-ak trialkilszilil származékképzési lehetőségei

Az AS-ak trimetilszililezését 1961-ben Rühlmann és mtsai alkalmazták először. 1965-ben és 1966-ben Smith és mtsai a KNBD vegyületcsalád származékká alakításához korábban még nem használt HMDS reagenssel képeztek szilil származékot TMCS katalizátor jelenlétében. BSTFA-t 1968-ban használtak először AS-ak származékká alakításához [134]. Az előbbi reakciókban az amino- és karboxilcsoportok is szubsztituálódtak. A 4. táblázat az AS-szilil észterek [22, 78, 135-140] és a kétlépcsős származékképzéskor (1. szililezés, 2. acilezés) keletkező termékek [141] GC-MS meghatározási lehetőségeit ismerteti.

Az AS-ak vizsgálatánál is az elválasztást megelőző mintaelőkészítés része volt az extrakció. Vizeletből, vérből, gerincvelői folyadékból vagy agyszövetből általában folyadék-folyadék extrakcióval (LLE) vonták ki a célvegyületeket. Li és mtsai a korábbiakhoz képest egy újfajta keverőbabás extrakciót dolgoztak ki [137].

4. táblázat Aminosavak gázkromatográfiás tömegspektrometriás vizsgálata trialkilszilil származékokként

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Származékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált AS (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g	ng/ml, ng/g		
gerincvelői folyadék/ 0,25 ml	extr. (MeOH)	MSTFA, 1% TMCS	40	30	TOF-MS (APCI)	19,1- 72,5 nM	63,7- 241,7 nM	Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val, szarkozin (13 egyéb)	[78, 135]
aeroszol/ 20*25cm űvegszűrőn	extr. (H ₂ O+IPA)	MTBSTFA, 1% TBDMCS	70	20	SIM (EI)	0,3-46 pg	1,2-154 pg	Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val, Nva, GABA, Met, Asn, HYP (2-amino pimelinsav)	[136]
agyi szövet, szérum/ 0,1 ml	lizáló puffer, deprot.	BSTFA, 1% TMCS	MW 700W 3 perc		SIM (EI)	0,01- 4,23	0,02- 7,07	Ala, Cys, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Val, Met, Asn, szarkozin	[22]
agyi szövet, szérum/2 ml	HF-SBSE	BSTFA	MW 700W 2 perc		SIM (EI)	0,3-17	1-50	Gly, Met, Tyr, Trp	[137]
plazma/50 µl	SPE vagy extr. (MeOH /H ₂ O/CHCl ₃)	MSTFA	- 37	10 30	FS (EI)	-	-	Gly, Thr, β-Ala, Met, Asn, Lys, Gln, Glu, Phe, Ile, Leu, Tyr, Ser, Trp, Ala, Orn, Cys (15 egyéb)	[138]
bor/0,1 ml	- (liofili- zálás)	MSTFA	37	30	SIM (EI)	0,04- 254,6	0,12- 555,5	Ala, Arg, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, GABA (10 egyéb)	[139]
plazma/50 µl	extr. (MeOH)	MSTFA MBTFA	60 80	10 20	SIM (EI)	0,01	0,06	Orn, Lys, Arg	[141]
vizelet/20 µl	-	HMDS+TFA BSTFA	50 80	30 30	MS/MS SRM (PCI)	3,77	11,3	Met (8 egyéb)	[140]

Jelölések: ld. Rövidítések, 1., 2., 3. táblázat, valamint: SBSE = keverőbabás extrakció (stir bar sorptive extraction); MBTFA = *N*-metil-bisz(trifluoracetamid); APCI = atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (atmospheric pressure chemical ionization)

A módszerük érdekessége, hogy a kivonást követő származékképzés BSTFA-val a keverőbaba felületén történt, a reakcióhoz szükséges aktiválási energiát mikrohullámú feltárolóberendezés biztosította. Az eljárás hátránya volt, hogy a többi kutatással ellentétben, csak négy AS egyidejű mérését valósították meg. Ezzel szemben egy brazil kutatócsoport szintén mikrohullámú készüléket alkalmazott a mintaelőkészítésnél, melyben 16 AS-at 1% TMCS-t tartalmazó BSTFA-val alakítottak trimetilszililezett származékokká [22].

A BSTFA mellett az MSTFA reagenst is gyakran alkalmazták katalizátorral [78, 135] vagy anélkül [138-139]. Gerincvelői folyadék vizsgálatának optimalizálásánál végeztek BSTFA és MSTFA reagens összehasonlítást, mindkét reagenshez 1% TMCS katalizátort adtak. A tanulmányban az MSTFA + 1% TMCS párost találták jobbnak [78, 135]. Katalizátor nélküli MSTFA-val szilárd fázisú származékképzési eljárást dolgoztak ki vérplazma AS-tartalmának meghatározására [138]. A származékképző szert közvetlenül az SPE oszlopra vitték fel, majd 10 perc várakozást követően hexánnal eluálták a származékokat. Eljárásuk hatékonyságát a klasszikus LLE módszerhez hasonlították, mennyiségi meghatározást nem végeztek. Szintén katalizátor mentes MSTFA-t alkalmaztak a borban található AS-ak liofilizálást követő közvetlen származékká alakítására is szerves savak jelenlétében [139]. A módszer hátránya volt, hogy a vizsgált huszonegy AS-ból ötnél (Ala, GABA, Met, Orn, Lys) nem keletkeztek egységes termékek, továbbá a Gly-t kis érzékenysége, a Gln-t túlzottan kiszélesedett csúcsalakja miatt kizárták a vizsgálatból. Az egységes termékek létrehozásához kétlépcsős szililezési eljárást dolgoztak ki [140]. A módszert vizelet közvetlen Met-, szénhidrát-, polioli- és amin-tartalmának meghatározására alkalmazták. A korábban ismertetett származékképzésekhez képest nem igényelt bonyolult mintaelőkészítést, mivel sem extrakcióra, sem a vizelet beszárítására nem volt szükség. Első lépésként TFA-tartalmú HMDS:ETAC 1:1 arányú elegyet adtak a vizelethez és 50 °C-on 30 percig melegítették. A reakciót nyitott edényben végezték, hogy a keletkező ammónia szabadon távozhasson. Második lépésként BSTFA hozzáadása után az oldatot 80 °C-on fűtötték 30 percig. A HMDS-t önmagában nem találták elégségesnek az aminocsoportok szilil-származékká alakításához, ezért a reakciót BSTFA-val tették teljessé. Az AS aminocsoportok szubsztituálásának másik lehetőségeként, az MSTFA-ás szililezést követően, második lépésben MBTFA-val acileztek [141]. Az eljárást vérplazma dibázisos AS-tartalmának

(Orn, Lys, Arg) meghatározására dolgozták ki. A szilil származékká alakítást nemcsak folyékony minták (vér, bor és vizelet), hanem aeroszol AS-tartalmának mérésére is használták. A szűrőre gyűjtött minták extrahálásához H₂O:izopropanol (IPA) elegyet alkalmaztak, származékképző szerként 1% *terc*-butil-dimetil-klór-szilán (TBDMCS) katalizátort tartalmazó MTBSTFA-t. Az oldatot 70 °C-on 20 percig melegítették [136].

Az ismertetett irodalmi tanulmányok közül többenél gondot okozott az arginin (Arg), a His [22, 135, 139], a Cys [135], az Asn és a Trp [139] szilil-származékainak elégtelen termikus stabilitása, ami miatt GC-MS meghatározásuk kivitelezhetetlen volt.

1.3.1.3 BMA-ok trialkilszilil származékképzési lehetőségei

A BMA-ok mennyiségi meghatározása biológiai mátrixból (vér és vizelet) mind a mai napig kihívást jelentő feladat az analitikusok számára. Ezekben a mintákban a BMA-ok nagyságrendekkel kisebb mennyiségben fordulnak elő, mint metabolitjaik, ezáltal egyidejű mérésük új mintaelőkészítési módszerek kidolgozását igényli.

A szakirodalomban talált egylépcsős trimetilszililezés a korábban alkalmazott kolorimetriás VMA mennyiségi meghatározását hivatott kiváltani egy modernebb, pontosabb módszer segítségével. Ennek érdekében egy vietnámi kutatócsoport neuroblasztoma diagnosztizálására és monitorozására vizeletből ETAC-os kivonást követően a szerves fázist BSTFA-val reagáltatta 80 °C-on 75 percig, majd a mintát közvetlenül injektálták a GC-készülékbe [31].

A későbbi kutatások alkalmával az egylépcsős módszert kiegészítették egy második lépéssel, perfluoracilezéssel (5. táblázat). A dúsítást követően először HMDS-sel reagáltatták a kivonatot enyhe körülményeket mellett (40 °C 10 perc), ezzel védték ki a „túlszilileződést”, vagyis az aminocsoportok TMS származékká alakulását. Ezt követően *N*-metil-bisz(perfluor)-butiramidot (MBHFBA) használtak az acil-származékok létrehozásához szintén enyhe reakciókörülmények (80 °C 5 perc) között. HMDS helyett MSTFA-t alkalmazva melléktermékek keletkezését figyelték meg, melyekben az aminocsoportok is TMS származékok formájában jelentek meg, ezért ennek használatát elvetették [142-144]. A kétlépcsős szililezés-acilezés hátránya volt, hogy külön frakcióból határozták meg a BMA-okat és a savas metabolitjaikat.

5. táblázat Biogén monoaminok kétlépcsős származékképzése

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Számazékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált biogén monoaminok (BMA) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g			
zebrahal lárva/-	MeOH-os deprot.	HMDS (ETAC)	40	20	SIM	0,4-0,8	1,2-4,7	DA, EP, NORMNE, NOREP, EP, 3-MeTYR, ST	[145]
		MBHFBA	80	10					
vizelet/200 µl	SPE MCX 3 frakció	HMDS (ETAC)	40	10	MRM	savas 0,8- 8,13 bázi- kus 0,02- 0,11	-	DA, TYR, DOPAC, NORMNE, 3- MeTYR, MN, MHPG, EP, ST, NOREP, VMA, HVA, 5-HIAA (6 AS)	[142]
		MBHFBA	80	5					
vizelet/200 µl	SPE MCX 2 frakció	HMDS (ETAC)	40	10	MRM	0,14- 0,77	0,74- 3,69	HVA, MHPG, DOPAC, VMA, 5- HIAA, DA, NORMNE, NOREP, EP, 1-DOPA, ST	[143]
		MBHFBA	80	5					
vizelet/200 µl	SPE MCX 2 frakció	HMDS (ETAC)	40	10	SIM	0,05- 6,24	0,17- 17,8	HVA, DOPAC, VMA, 5-HIAA, DA, NORMNE, NOREP, EP, 1- DOPA, ST	[144]
		MBHFBA	80	5					

Jelölések: ld. Rövidítések, 1., 2., 3., 4. táblázat, valamint: MXC: vegyes kation cserélő oszlop (mixed cation exchange), MHPG = 3-metoxi-4-hidroxifenil glikol; DOPAC = 3,4-dihidroxifenil-ecetsav; MN = metanefrin

A BMA-ok vizsgálatánál használt adatgyűjtési technikák között nem találtam számottevő eltérést a kimutatási határ (LOD) és meghatározhatósági határ (LOQ) értékekben, akár MS/MS (MRM) [142-143], akár SIM [144] technikát alkalmaztak.

Humán betegségek tanulmányozása nemcsak vizeletből hanem a pontyfélék családjába tartozó zebrahal (*Danio rerio*) lárváinak vizsgálatával is lehetséges [145]. A lárva BMA szintjében bekövetkező változást különböző koncentrációjú növényvédő és szerves higany vegyületek jelenlétében vizsgálták. Fehérjekicsapás után, a korábbiakhoz hasonló származékképzési eljárást alkalmaztak, az oldószer (ETAC) mennyiségét és a reakcióidőket növelték, a nagyobb válaszjelek érdekében. A szililezés optimalizálásakor a HMDS-t és az MSTFA-t hasonlították össze. A vizsgálatban a BMA-ok kicsivel nagyobb válaszjelet adtak HMDS-sel, mint MSTFA-val.

1.3.2 Meghatározás perfluoracilezett származékokként

A vegyületek perfluoracilezett származékokká alakítása nem növeli az illékonyágukat olyan mértékben, mint a metilezés vagy a szililezés, mégis sokrétűen alkalmazható. A perfluoracilezés alapegyenletét (2) mutatja.



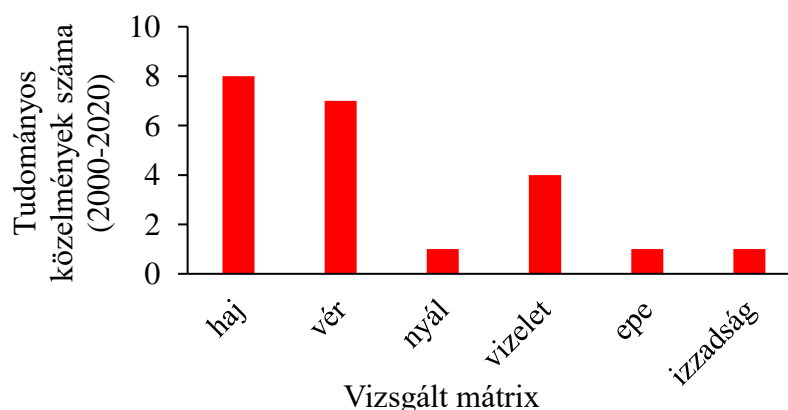
ahol Y:H a célvegyület és R-CO-X az acilezőszer [2, 146].

Reagensként a heptafluor-butilcsoportnál könnyebb (fluorozott) acilcsoportok vagy sav-kloridok használatosak. E reakció során melléktermékként erős szervesetlen sav (HCl) keletkezik, melyet elkerülni a sav-kloridok anhidridekre cserélésével lehet. Leggyakoribb származékképző szerek: a trifluor-ecetsavanhidrid (TFAA), a pentafluor-propionsavanhidrid (PFPA) és a heptafluor-vajsavanhidrid (HFBA). Ezen reagensekkel keletkezett származékok illékonyága között nincs jelentős különbség. Reakcióközegként inert oldószereket alkalmaznak pl. étert, ETAC-ot és tetrahydrofuránt. Az alkoholok savas észteresítésénél víz keletkezik, melyet vízmentes MgSO₄-tal, molekula szitával vagy egyéb vízzel reagáló anyaggal lehet megkötni. A reakciókban keletkező HCl-nál gyengébb szerves savakat bázikus anyagokkal pl. PYR, trietilamin és szilárd NaHCO₃ vagy forralással eliminálják [146]. A BMA-ok kétlépcsős származékképzésénél [2, 146] alkalmazott MBHFBA-BMA reakcióban melléktermékként víz vagy erős sav helyett semleges savamid képződik. Az acilezést

általánosan az aminocsoportok módosítására alkalmazzák, de többek között hidroxil-, tiolcsoport és amidok is reagálnak, bár az amidok az aminoknál kevésbé reaktívak. Az aminocsoportoknál a térbeli gátlás nehezítheti a reakciót, második hidrogén-atomjuk kevésbé reakcióképes.

Speciális acilezés lehetséges, ha a perfluorsavanhidridek helyett kloroformátokat használunk. A reakciót tanácsos ugyanolyan alkil/aril gyökű alkohol jelenlétében végezni, mint a származékképző reagens. A módszer egyaránt alkalmazható AS-ak, aminok, alkoholok és tiolok származékká alakítására. Előnye, hogy magas víztartalmú minták származékokká alakítására is használható, mivel víz jelenlétére kevésbé érzékenyek, mint a korábban ismertetett reagensok. A reakció gyors és már szobahőfokon is lejátszódik [2, 146].

KNBD-ok acilezésekor (6. táblázat) reagensként a klasszikus savanhidrideket, a TFAA-t [16, 80, 147-150] vagy a PFPAA-t [109-110, 151-158] használták. Ezekben a vizsgálatokban a cél a THC és THC-COOH mennyiségének megállapítása volt, sok KNBD együttes mérése nem volt jellemző, kivétel [159]. Annak ellenére, hogy legtöbbször egyszerre egy-három célvegyületet vizsgáltak, az adatokat a nagy szelektivitású SIM és MS/MS technikákkal egyforma gyakorisággal gyűjtötték, kivétel [159], ahol FS-t alkalmaztak. Az acilezést a karboxil- és hidroxilcsoportok eltérő reakciókészségét kihasználva főként biológiai minták: vér [16, 80, 147, 149, 152, 159-160], haj [109-110, 151, 153-157], vizelet [150, 158-160], epe [159], nyál [161] és izzadság folt [148] meghatározására javasolták (7. ábra).



7. ábra A perfluoracilezési KNBD vizsgálatok mátrix szerinti megoszlása 2000-2020 között

6. táblázat KNBD gázkromatográfiás tömegspektrometriás vizsgálata perfluoracil- vagy egyéb észter származékokként

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Szarmazékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g	ng/ml, ng/g		
vér/1 ml	SPE	TFAA/CHCl ₃	70	10	SIM (NCI)	-	0,2-0,5	THC, 11-OH-THC	[147]
haj/50 mg	hidr., extr. CHCl ₃ :IPA (97:3) hexán:ETAC (9:1)	PFPAА/PFPOH	65	30	SIM (EI)	0,5-50 pg/mg	0,1-1 ng/mg	CBD, CBN, THC	[151]
					SIM (NCI)	5 pg/mg	10 pg/mg	THC-COOH	
vér/1 ml	extr. (hexán)	PFPAА/PFPOH	70	25	SIM (EI)	0,5	1	THC	[152]
nyúl plazma/ 0,5 ml	SPE	TFAA	szoba hőfok	-	SIM (NCI)	-	0,3	THC	[80]
izzadság folt	extr. (MeOH+puffer) + SPE	TFAA (TEA)*	80	20	SIM (NCI)	0,2 ng/folt	0,4 ng/folt	THC	[148]
vér/-	deprot. SPE	CHCl ₃ /TFAA/ HFiPOH	70	25	SIM (NCI)	-	2,5	THC, THC-COOH	[16]
haj/50 mg	hidr., extr. (heptán:ETAC (9:1))	PFPAА/PFPOH	70	30	MS/MS (NCI)	50 pg/mg	100 pg/mg	THC-COOH	[153]
haj/25 mg	hidr., extr. (hexán:ETAC (9:1))	PFPAА/PFPOH	70	30	MS/MS MRM (NCI)	0,02 pg/mg	0,05 pg/mg	THC-COOH	[154]
vér/0,5 ml	extr. (hexán: ETAC (9:1))	TFAA/HFiPOH	70	25	MS/MS SIM (NCI)	0,1- 0,02	0,5-2,5	THC, THC-OH, THC-COOH	[149]
haj/20 mg	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	PFPAА/PFPOH	70	30	MS/MS (NCI)	2,5 ng/mg	7,5 ng/mg	THC	[155]
						0,025 pg/mg	0,05 pg/mg	THC-COOH	
haj/25 mg	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	PFPAА/PFPOH	70	30	MS-MS MRM (NCI)	0,015 pg/mg	0,05 pg/mg	THC-COOH	[156]

6. táblázat folytatása

Mátrix/ mennyiség	Dúsítás	Származékképzés			Adat- gyűjtés/ detektálás	LOD	LOQ	Vizsgált kannabinoidok (KNBD) (<i>egyéb vegyületek</i>)	Hiv.
		reagens	°C	perc		ng/ml, ng/g			
haj/50-100 mg	hidr., extr. (hexán:ETAC (5:1))	PFPAА/HFiPOH	70	-	MS/MS (NCI)	0,01	0,04	THC, THC-COOH	[109]
haj/50-100 mg	hidr., extr. (hexán:ETAC (5:1)), SPE	PFPAА/HFiPOH	-	-	MS/MS (NCI)	-	-	THC-COOH	[157]
vizelet/0,5 ml	hidr., extr. (hexán:ETAC (5:1)), SPE	1.TFAA+kloroform 2. PFPOH	50 50	45 30	SIM	0,86	2,88	THC-COOH (<i>amfetaminok</i>)	[150]
nyál/0,25 ml	SPE	TFAA/HFiPOH	65	40	MS/MS	7,5 ng/l	10 ng/l	THC-COOH	[161]
vizelet/1 ml	hidr., extr. (hexán:ETAC (5:1))	PFPAА/PFPOH	75	30	SIM	1	2	THC-COOH	[158]
vér/1 ml vizelet/3 ml epe/3 ml	hidr., extr. (CH ₂ Cl ₂ : dietiléter (7:3))	savas: TMSH bázikus: 4-DMAP/AA	-	-	FS (EI)	-	-	CBD, CBN, THC, 11-OH-THC, TCH-COOH (<i>19 egyéb kábítószer</i>)	[159]
haj/50 mg	hidr., extr. (hexán: ETAC (9:1))	PFPAА/HFiP	70	-	MS/MS MRM (NCI)	-	-	THC-COOH	[110]
vér/1 ml vizelet/1 ml	deprot., hidr., extr.	közvetlen: propil kloroformát + szoba TEA, hexán hőfok	-	-	SIM	0,2-0,9 0,5-1,2	0,5-2,4 1,3-2,6	THC, 11-OH-THC, THC-COOH THC, TCH-COOH	[160]

Jelölések: ld. Rövidítések, 1., 2., 3., 4., 5. táblázat, valamint: PFPOH = pentafluor-propanol; HFiPOH = hexafluor-izopropanol; TFAA (TEA)* = 100 µl 0,01 mol/l-es trietil-amin heptánban és 20 µL TFAA; TMSH = tetrametilszulfonium hidroxid; DMAP/AA = 4-dimetil-amino-piridin/ ecetsavanhidrid

A humán minták előkészítése és a dúsítás irányvonala megegyezett a trialkilszililezésnél ismertetett módszerekkel. Haj minták hidrolíziséhez itt is NaOH-t [109-110, 153-157] vagy β -glükuronidáz/arilszulfatáz enzimet [151] használtak. A kétfrakciós extrakció savas és semleges részét külön gyűjtötték [16, 150-151, 155, 159], előbbit használva a THC-COOH meghatározáshoz. Kétlépcsős származékká alakítást egy esetben alkalmaztak, amfetamin típusú vegyületek és THC-COOH együttes mérésénél [150]. Először a THC-COOH fenolos hidroxilcsoportját és az amfetaminokat acilezték, majd a karbonsav karboxilcsoportját észteresítették. A kivonást mindenhol szárazra párlás és származékképzés követte. A származékokat újra bepárolták, majd ETAC-ba [109, 151-157], heptánba [16, 147-148], hexánba [149, 158, 160], toluolba [161] vagy ETAC:MeOH (7:3, v/v) elegybe [159] oldották injektálás előtt. Egyedinek számított a propilkloroformátos mintaelőkészítés, melynél a származékképző reagenst közvetlenül adták a kivonathoz előzetes szárazra párlás nélkül [160].

Az AS-ak közvetlen származékképzésére vizelet- és vérmintákban szintén propilkloroformátos eljárást dolgoztak ki [162]. A módszer előnye a gyors és teljesen automatizált mintaelőkészítés volt. Hátránya, hogy a Ser és Thr mátrixtól függően nem megbízhatóan, míg az Arg és Cys egyáltalán nem volt mérhető. Az előbbihez hasonlóan etil-kloroformáttal vizelet, haj és szőjabab AS-tartalmát mérték sósavas hidrolízist követően, közvetlenül, ETAC-os közegben triklóretilén jelenlétében [163]. A kivonáshoz ultrahanggal segített folyadék-folyadék mikroextrakciót alkalmaztak. A származékképzés reagensét optimalizálták, etil-, benzil-, izobutil- és fenil-kloroformátokkal is elvégezték a reakciót [164].

A BMA-kat biológia mintákban és élelmiszerekben is, úgy mint hús [32], gyümölcs [33-34] vagy hal [165], mérték karbamátokként, együttesen a mono- és diaminokkal. Az aminocsoportjaikat izobutil-kloroformáttal reagáltatták. Egy olasz kutatócsoport vizeletből határozta meg külön a BMA-okat propil-kloroformátos [30] és külön a bomlástermékeiket [166] etil-kloroformátos reakcióval. A célvegyületek heptafluor-butil-kloroformátos származékká alakítás után is mérhetőek voltak vizeletből [167]. A meghatározás célja a vizelet metabolikus profiljának feltérképezése volt, melyben a kilenc BMA mellett ötvenhat AS-at és AS-konjugátumot, nyolcvannégy szerves savat és további négy poláris tulajdonságú vegyületet mértek. A vizelethez a LLE-t megelőzően tris(3-hidroxi-propil)-foszfint adtak a diszulfid hidak felbontása miatt. A

származékképzéshez izooktán:heptafluor-butanol:heptafluor-butyl-kloroformát 15:1:4 térfogatarányú reagens elegyet választottak. Katalitikus közegként piridines NaOH-oldatot, majd izooktánt adtak a mintához, melynek 1 µl-ét injektálták. Az adatokat SIM módban gyűjtötték.

Az elmúlt 20 év irodalmának áttanulmányozása után kijelenthető, hogy a gázkromatográfiás mérések továbbra is nagy jelentőségűek a biológiai hatású vegyületek meghatározásában. Származékképzés nélkül, növényi minták KNBD-tartalmát FID-del detektálták, alacsony fenntartási költsége, megbízhatósága és gyorsasága miatt, főleg ha a pontos mennyiségi meghatározás helyett elégséges volt a THC:CBD arányának megadása. A származékképzési módszerek közül a trialkilszililezés sokoldalúan, sokféle vegyület származékká és illékonyá tételére alkalmas. A KNBD-okkal egyidejűleg számos más vegyület típus származékká alakítása is megtörtént, ami biológia minták teljeskörű vizsgálatakor vált fontossá. A KNBD vegyületcsaládnál is ezt a mintaelőkészítést alkalmazták a legtöbben, azonban módszerüket általában nem optimalizálták (kivétel: [50, 67, 74-75, 80, 82, 106, 112-113, 116, 150, 152, 155]), ezért az alkalmazott mintaelőkészítési eljárások összehasonlítása meglehetősen nehéz. Az szakirodalmi módszereket összefoglaló tanulmány elkészítése után arra a következtetésre jutottam, hogy a 1.3.1.1 fejezetben ismertetett szililezési technikák csak azonos mátrixot vizsgálva egyazon készüléken és adatgyűjtési technikát alkalmazva hasonlíthatók össze.

Az AS-ak trimetilszililezésénél gyakori probléma a származékok nem megfelelő termikus stabilitása és a nem egységes termékek keletkezése, melyet kétlépcsős származékképzési eljárással próbáltak kiküszöbölni. A BMA-ok GC-MS meghatározásánál is törekedtek a molekulák aktív hidrogén-atomjainak lecserélésére összetett eljárást alkalmazva. A módszer lényege a szililezést követő acilezés volt, ahol első lépésben a hidroxilcsoport(ka)t szubsztituálták TMS-észtert létrehozva, majd az aminocsoport egyik hidrogén-atomját perfluoracil-védőcsoporttal helyettesítették. A szerkezetben, a BMA-okhoz képest két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban keletkező savas karakterű metabolitokat külön frakcióból határozták meg.

A bemutatott eljárások idő- és vegyszerigényesek és az összetett mintaelőkészítés végére a célvegyületek mennyisége az eredeti koncentrációjuk töredékére csökkenhet, ezért megfontolandó a módszerek egyszerűsítése.

2. Célkitűzések

Az irodalmi előzmények áttanulmányozása után a doktori munkám célja:

- 1) A kiválasztott KNBD vegyületek és metabolitjaik (1. ábra) átfogó származékképzési tanulmánya, melyben TMS származékká alakításuk optimális reagensét és reakciókörülményeit vizsgálom egy készüléken, azonos kromatográfias rendszerben.
 - a. A tanulmányban a KNBD-ok származékká alakításához eddig még nem alkalmazott HMDS/TFA reagenspár hatékonyságának összevetése a legnépszerűbb szililező szerekekkel (BSTFA, MSTFA és MTBSTFA) azonos módon készített modelloldatok vizsgálatával. A katalizátorok hatásának feltárása a reakcióban.
 - b. Növényi minták KNBD-tartalmának GC-MS meghatározása az optimalizált módszerrel szelektív fragmentumionok (SFI) alapján, közvetlen, extrakciómentes származékképzést követően.
- 2) A HMDS, a kutatócsoport korábbi munkájában bemutatott, acilező tulajdonságának [6-7] vizsgálata, kémiaiilag többfunkciós AS-ak (2. ábra) és BMA-ok (3. ábra) származékká alakítása.
 - a. A termékek tömegspektrometriás viselkedésének feltárása, a SFI-ok azonosítása fragmentumanalitikai tanulmány készítésével.
 - b. A módszer optimalizálása és teljesítményjellemzőinek meghatározása.
 - c. BMA-ok és metabolitjai (4. ábra) elválasztása és együttes meghatározása egyetlen GC-MS méréssel.
 - d. Az eljárás alkalmazása AS-ak és BMA-ok mennyiségi meghatározására anyagcsere és neurológiai rendellenességgel diagnosztizált betegek vizeletmintáiban. A vizeletmérés főbb teljesítményjellemzőinek meghatározása.

3. Módszerek és eljárások leírása

3.1 Felhasznált vegyszerek

Az összes vegyszer analitikai tisztaságú volt. A PYR, ACN és ETAC a Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft. (Budapest, Magyarország) termékei voltak. A MeOH-t és a származékképző szereket: a HMDS, a TFA, az MSTFA, az 1% TMCS tartalmú BSTFA, a 0,2 % TMSI tartalmú MSTFA és az 1% TBDMCS tartalmú MTBSTFA, a PFPA, HFBA és az MBHFBA reagenseket a Sigma-Aldrich cégtől (St. Louis, USA) vásároltuk. Az Ala, a Gly, a Val, a Cys, a Leu, az Ile, a GABA, a Ser, a Thr, a Pro, az Asp, az Asn, a Met, a hidroxi-prolin (HYP), a Phe, a Glu, a Gln, az Orn, a Lys HCl sója, az Arg HCl sója, a Tyr, a His, a Trp, az AA-ok: az etanol-amin (EtAm), a 3-amino-propán-1-ol (PrAm), a 4-amino-bután-2-ol (BuAm), a 2,6-diamino-heptadekánsav (DiAHA), a 2-amino-glükóz (AmGl) HCl sója, az oligopeptidek (DL-alanil-alanin (AlaAla), az alanil-glicin (AlaGly), a glicil-glicin (GlyGly), a glicil-glicil-glicin (GlyGlyGly), a TYR HCl sója, a 3-MeTYR, a DA HCl sója, az EP, a NORMNE HCl sója, a NOREP HCl sója, a T HCl sója, az l-DOPA, az 5-MeT, a ST HCl sója, a HVA, a VMA és az 5-HIAA szintén a Sigma-Aldrichtól kerültek beszerzésre. A növényi KNBD standardokat: a CBD-t, a CBC-t, a THC-t, a CBG-t, a CBN-t, a 11-OH-THC-t és a THC-COOH-t a Nemzeti Szakértői és Kutatói Központ (Budapest, Magyarország) hivatalosan dokumentálva bocsátotta rendelkezésemre.

3.2 A vizsgált minták

A vizsgált növényi minták, a *C. ruderalis* (C-*rd*) fajba tartozó nőnemű egyedek, Somogy megyében vadon nőttek. Gyűjtésük 2016-ban (C-*rd1*) és 2017-ben (C-*rd2*) virágzáskor történt és felhasználásig az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Növényismereti Tanszéke biztosította a tárolásukat (engedélyszám: 15323/2015/KAB). Az elágazó láncú aminosavakat szabad formában és nagy mennyiségben tartalmazó BCAA étrend-kiegészítőt az internetről rendeltem. Az „üres” vizeletminta (vizelet1) egészséges női önkéntestől származott, a magas BMA- és metabolit-tartalom alapján anyagcserezavarral és neurológiai rendellenességgel diagnosztizált betegek vizeletét (vizelet2-4) a Semmelweis Egyetem Igazságügyi

Orvostani Intézetének Toxikológiai Laboratóriuma (Budapest, Magyarország) biztosította. A tanulmányozásra továbbadott vizeletminták BMA-tartalmát a Toxikológiai Laboratórium orvosi kérésre vizsgálta, előzetes méréseik kóros elváltozásokat állapították meg a pácienseknél. A megsemmisítésre váró mintákat betegadatok nélkül kaptuk és a mért értékeket kizárólag az analitikai módszer számszerű jellemzőinek bemutatására használtuk. Az ATE és ETA peptideket kutatási céllal az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport szintetizálta.

3.3 Alkalmazott eszközök

3.3.1 A mintaelőkészítés eszközei

A pontos tömegeket $\pm 0,01$ mg pontosságú analitikai mérlegen (Sartorius, Goettingen, Németország) mértem. A standard és a minta törzsoldatok elkészítéshez megfelelő térfogatú mérőlombikokat, a reagensek pontos térfogat méréséhez $\pm 1\%$ pontosságú Hamilton (Bonaduz, Svájc) és Trajan (Viktor, Ausztrália) mikrofecskendőket használtam. A vegyületek oldódását szabályozható hőfokú ultrahangos Sonorex (Bandelin electronic, Berlin, Németország) vízfürdővel segítettem. A fagyasztva szárítást Modulyo liofilizátorral (Jencons, Egyesült Királyság), a centrifugálást Hettich EBA 21 (Tuttlingen, Németország) centrifuga készüléken, a szárazra párolást Büchi Rotavapor R-200 (Flawil, Svájc) rotációs vákuumleparlón, a származékképzést fűthető, a reakciócsövekkel azonos méretű fémbetéttel rendelkező, elektronikus melegítőn (Kutesz, Magyarország) végeztem. A vizelet minták pontos térfogatát Biohit Proline (Helsinki, Finnország) 100-1000 μ l eldobható hegyű automata pipettával mértem.

3.3.2 A gázkromatográfiás elválasztás és tömegspektrometriás detektálás eszközei és körülményei

A méréseket Varian CP-8400 (Varian, Walnut Creek, USA) automata mintaadagolóval és programozható injektorral felszerelt Varian 450 típusú készüléken végeztem, melyhez Varian 240 MS/MS ioncsapda detektorral ellátott tömegspektrométer csatlakozott. Az KNBD-ok és az AS-ak elválasztását 30 m hosszúságú, míg a BMA-ok elválasztását 15 m hosszúságú, 0,25 mm átmérőjű és 0,25 μ m filmvastagságú Agilent

(Victoria, Ausztrália) HP-5MS (5%-fenil-metil-polisziloxán álló fázisú) kapilláris oszlopon végeztem. A vivőgáz 6,0 tisztaságú (99,9999%), 1 ml/perc sebességgel áramoltatott He gáz volt.

A tömegspektrométer működtetésekor az átvezető kapilláris (transfer line) hőfokát 300, az ionsapdát 210 és a manifoldt 80 °C-ra állítottam. Az ionizációs feszültség 70 eV, a filament áramerőssége 25 µA, a teljes ionszám (TIC) 20000 beütés, az előpásztázási idő 1500 µs volt. Az adatokat gyors üzemmódban (0,59 s/scan) gyűjtöttem. Az elektronsokszorozó feszültségének beállításánál az automatikus kalibráció (auto tune) által beállított értéket +100 V-tal növeltem. A detektort a mérések során FS-üzemmódban, *m/z* 50-1000 tartományban üzemeltettem. A készülék optimális paramétereit a Varian MS Workstation 6.9. szoftverrel ellenőriztem és vezéltem, az injektor és kolonnater hőfokszabályozásának adatait a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat A GC-MS készülék injektorának és kolonnaterének felfűtése, az adatgyűjtés késleltetése az elúciós program alatt

Célvegyület	Injektor		Kolonnater			Adatgyűjtés késleltetése, <i>perc</i>
	Hőfok, °C	Idő, <i>perc</i>	Hőfok, °C	Felfűtés sebessége, °C/ <i>perc</i>	Hőfok tartása, <i>perc</i>	
Kannabi-nodok	A program hossza: 13 perc (TBDMS esetén 20 perc)					
	300	4,00	100	-	-	3,00
			300	20	- (7)	
Kémiailag multifunkciós vegyületek *	A program hossza: 20,20 perc					
	280	3,00	100	-	1,00	2,00
			145	10	-	
			195	5	1,00	
			280	50	2,00	
Biogén monoaminok és metabolitjaik	A program hossza: 19,35 perc					
	280	3,00	100	-	1,00	5,00
			145	10	-	
			195	5	1,00	
			280	100	2,00	

Jelölések: * magában foglalja az aminosavakat, -alkoholokat és -cukrot, a 2,6-diaminoheptadekánsavat és az oligopeptideket (di- és tripeptidek)

3.4 Mintaelőkészítés

3.4.1 Modelloldatok

Az analitikai tisztaságú standard modellvegyületekből 0,1-10 mg/ml-es törzsoldatokat készítettem MeOH-lal (KNBD), 2 M-os sósavval (AS, AA, AC, DiAHA és oligopeptidek: AlaAla, AlaGly, GlyGly és GlyGlyGly) illetve 0,25 mM-os sósavval (BMA és metabolitjaik) 5-10 ml-es mérőlombikban. A törzsoldatokhoz a bemérést $\pm 0,01$ mg pontossággal végeztem. A vizsgálatok előtt 10-500-szoros koncentrációra hígítottam az oldatokat a megfelelő oldószerrel. A hígított törzsoldatok 3-100 μ l térfogatát mikrofecskendővel 2 ml térfogatú, a rotációs vákuumbepárlóhoz illeszkedő, reakciócsövekbe mértem és 30-40 °C-os vízfürdőn, vákuum segítségével tömegállandóságig szárítottam. A szárazra párolt mintákat aprotikus szerves oldószerbe (PYR, ETAC és ACN) oldottam, majd származékká alakítottam (3.4.4 fejezet). A törzsoldatok fel nem használt részét a következő mérésig hűtőben (2-8 °C-on) tároltam.

3.4.2 Biológiai minták előkészítése

A 2016-ban és 2017-ben gyűjtött *C. ruderalis* virágos hajtását és leveleit (C-rd1, C-rd2) liofilizátorban fagyasztva szárítottam, majd néhány grammját achátmozsárban finomra porítottam. A minta 0,5-2,0 mg-os részleteit $\pm 0,001$ mg pontossággal 2 ml-es reakciócsövekbe mértem és extrakció nélkül, közvetlenül, TMS-származékokká alakítottam (3.4.4 fejezet).

A vizeletmintákat a kísérletek elvégzéséig 10 ml-es műanyag centrifugacsövekben fagyasztóban (-20)-(-25) °C-on tároltam. Felengedés után centrifugáltam (6000 rpm, 10 perc) és a tiszta felúszó 100-300 μ l-ét automata pipettával a korábban említett reakciócsövekbe pipettáztam majd vízfürdőn szárazra pároltam.

A minták célvegyület-tartalmát, a visszanyerést és az LOQ értékeket standard addícióval határoztam meg (3.5 fejezet). A vizelet automata pipettával kimért részletéhez a csavarmentes reakciócsövekbe mikrofecskendővel adtam a hígított modelloldatok számított részletét, majd az elegyet vákuumbepárlással szárítottam 30-40 °C hőfokú vízfürdőt alkalmazva. Az elporított kendermintákat a beszárított modelloldathoz mértem

analitikai pontossággal és ezt követően a mátrix jelenlétében a 3.4.4 fejezetben ismertetett 8. táblázat szerint származékká alakítottam.

3.4.3 BCAA előkészítése és az ATE&ETA peptidek bontása savas hidrolízissel

A BCAA étrend-kiegészítő analitikai pontossággal mért részletét 2 M-os sósavban oldottam. Az ATE és az ETA szintetikus peptidek 910 és 900 µg-ját 0,5 ml 6 M-os sósavban 105 °C-on lezárt ampullában 24 órán keresztül hidrolizáltam. A hidrolizátumokat 2 M-os sósavval maradék nélkül 5 ml-es mérőlombikba mostam és törzsoldatot készítettem. A törzsoldat 150 µl-ét tömegállandóságig szárítását követően származékká alakítottam és az oldatból HMDS-sel 10-szerest hígítást készítettem, melynek 1 µl-ét injektáltam. A folyadék mintákból mikrofecskendővel vettem ki a szükséges térfogatot, amit szárazra párlást követően származékká alakítottam (3.4.4 fejezet). Az étrend-kiegészítő pontos AS-tartalmát standard addíciót követően határoztam meg a 3.5 fejezet szerint. Ez esetben a BCAA-törzsoldat pontosan mért részletéhez adtam az AS standard oldatok megfelelő részleteit, majd az egyesített folyadék részleteket együtt szárítottam tömegállandóságig és reagáltattam a 8. táblázatnak megfelelően.

3.4.4 A származékká alakítás

A vákuumbepárló segítségével vízmentesített mintákat a 8. táblázat 2. oszlopában megadott oldószerrel oldottam, majd hozzáadtam a 8. táblázat 3. oszlopában feltüntetett származékképző reagenseket. Az oldószer és a reagensek arányát kutatócsoportunk korábbi tapasztalataira alapozva választottam. A trimetilszililezést 375 µl, az egylépes acilezést és szililezést 200 µl össztérfogatban készítettem. Az optimalizáláskor alkalmazott reakcióidőt és -hőfokot a 8. táblázat utolsó két oszlopa tartalmazza, vastagon szedve az optimálisnak választott körülményeket. A származékképzést követően az oldatokat szobahőfokra hűtöttem. A KNBD-TMS-származékokat hígítatlanul injektáltam, az AS, az AA, az AmGl, a DiAHA, az oligopeptidek és a BMA-TMS-acil származékokból a származékképző reagenssel 10-20-szoros hígítást készítettem. A hígított mintákat szűkítővel ellátott mintatartó edénybe pipetáztam és 1 µl-t injektáltam.

A származékká alakítást párhuzamos bemérésekkel végeztem és minden mintát háromszor injektáltam.

8. táblázat A származékképzési tanulmányban vizsgált reagensösszetétel és reakciókörülmények

A minta	Oldószer, μ l	Származékképző reagens, μ l	Idő, perc	Hőfok, °C	
Kannabinoidok	PYR[#], 125 ETAC, 125 ACN, 125	HMDS, 225 TFA, 25	60	70	
		BSTFA, 250			
		BSTFA + 1% TMCS*, 250			
		MSTFA, 250	60, 90 , 120	100	
		MSTFA + 1% TMCS*, 250			
		MSTFA + NH ₄ I + etántiol*, 250			
MTBSTFA + 1% TDBMCS*, 250					
Aminosavak	PYR[#], 100 ETAC, 100 ACN, 100	HMDS, 70	TFA, 30	10, 20, 30 , 50	60, 70, 80 , 100
			PFPA, 30		
			HFBA, 30		
Biogén monoaminok és metabolitjaik	PYR[#], 100	HMDS, 70	TFA, 30	30	60, 80 , 100 80
			PFPA, 30	10, 30 , 60,	
			HFBA, 30	90	

Jelölések: PYR = piridin; ETAC = etil-acetát; ACN = acetonitril; HMDS = hexametildiszilazán; TFA = trifluor-ecetsav; BSTFA = *N,O*-bisz(trimetilszilil)-trifluoracetamid; TMCS = trimetil-klór-szilán; MSTFA = *N*-metil-*N*-(trimetilszilil)-trifluoracetamid; TDBMCS = *tert*-butil-dimetil-klór-szilán; PFPA = pentafluor-propionsav; HFBA = heptafluor-vajsav; #: vízmentes Na₂SO₄ felett tárolt; * a származékképző reagens tartalmazta a katalizátort; félkövér betűtípussal jelölve az optimális reakciókörülmények

3.5 A módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása, a kiértékelés módja

A specifikusságot és szelektivitást „vak” oldat (a reagenseket tartalmazó oldat a mintaelőkészítési eljárásnak megfelelően kezelve) injektálásával igazoltam, továbbá

vizelet mérésekor egészséges önkéntestől származó „üres” mintát is mértem referenciaként. A célvegyületek retenciójánál más zavaró csúcs egyik esetben sem jelent meg a kromatogramon és a tömegspektrumban.

A kidolgozott módszerek linearitását standard oldatokkal vizsgáltam. A kalibráló oldatok készítését a 9. táblázat ismerteti részletesen. A táblázat utolsó oszlopa a becsült injektált értékeket tartalmazza, a pontos mennyiségeket az egyenes felvételekor az analitikai pontosságú bemérésekre, továbbá HCl-sóknál a bázisra vonatkoztatva számítottam.

9. táblázat A kidolgozott módszerek linearitásának vizsgálata standard oldatokkal

Vizsgált vegyületcsoport	Kiindulási törzsoldat koncentrációja, mg/ml	Törzsoldat hígítása	Hígított törzsoldat bepárolt mennyisége, μ l	Injektált származék, ~ pg/ μ l
Kannabinoidok	0,01	20-szoros	15, 30, 60	20, 40, 80
		0-szoros	10, 20, 40, 60, 80	250, 500, 1000, 1500, 2000
Aminosavak	1	20-szoros	5, 10, 25	50, 100, 250
		10-szeres	15, 30	500, 1000
		0-szoros	6, 9, 18	1500, 2000, 3000
Amino-alkoholok	6	500-szoros	3, 30	10, 100
		100-szoros	30, 100	500, 1500
		10-szeres	20, 35	3000, 5000
Oligopeptidek	2	100-szoros	20, 45, 90	100, 250, 500
		10-szeres	20, 45, 90	1500, 3000, 5000
Biogén monoaminok és metabolitjaik	0,1	50-szeres	10, 50, 100	10, 50, 100
		0-szoros	10, 20	500, 1000

A bepárolt oldatrészleteket a 3.4.4 fejezet szerinti optimális körülményeken alakítottam származékká. A származékképzést követően a KNBD mintákat hígítás nélkül, az AS, az AC, az AA és a DiAHA származékokat 20-szoros, a BMA-akat és metabolitjaikat 10-

szeres hígítást követően injektáltam. A hígítást minden esetben a származékképző reagenssel készítettem.

Az LOQ értékeket empirikus úton határoztam meg. A kalibráció azon pontját választottam LOQ-nak, amelynél teljesült, hogy a jel/zaj (S/N) > 10, ez megegyezett a legalsó kalibráló ponttal. A módszer ismételhetőségét a párhuzamos mintaelőkészítésekkel és injektálásokkal vizsgáltam.

Az egylépéses szililezés és acilezés arányosságát mátrix jelenlétében különböző kiindulási térfogatú BCAA és vizelet minta származékká alakításával vizsgáltam. A BCAA méréshez a por alapú minta analitikai pontossággal mért 0,05 g-os részletéből 10,0 ml sósavas törzsoldatot készítettem. A törzsoldat 10, 20, 30 és 40 µl-ét mikrofecskendővel reakciócsövekbe mértem és szárazra párolást követően a 3.4.4 fejezet szerint származékká alakítottam. Az oldatot szobahőfokra hűtöttem és HMDS-sel 20-szoros hígítást készítettem. A vizeletekből 100, 200 és 300 µl térfogatokat reakciócsövekbe pipettáztam és vákuum bepárló segítségével szárítottam, majd a 3.4.4 szerint közvetlenül származékká alakítottam és HMDS-sel 10-szeresére hígítottam.

Több komponensű, összetett mátrix jelenlétében a linearitást standard addícióval tanulmányoztam az esetleges mátrix hatás kiküszöbölése miatt. A vizsgált koncentráció tartományt a minta célvegyület tartalmához igazítottam. A BCAA étrend-kiegészítőnél 10 µl 5 mg/ml-es BCAA törzsoldathoz a kalibráló-oldatot 10, 20 és 30 µl mennyiségben adtam. A standard elegyben a Leu 0,9 mg/ml, az Ile, a Val és a Tyr 0,4 mg/ml, valamint a Asp és Orn 0,2 mg/ml koncentrációjú volt. A mintát vákuumbepárló segítségével tömegállandóságig szárítottam és 3.4.4 szerint származékká alakítottam. A szobahőfokra hűtött mintát HMDS-sel 20-szorosára hígítottam. Vizelet mátrixban (vizelet1) szintén meghatároztam a teljesítményjellemzőket (16. táblázat) standard addícióval, hat koncentrációsinten (25, 50, 100, 200, 400 és 800 pg/injektálás) 42-1802 ng/ml koncentráció tartományban 100 µl vizelet jelenlétében. Az eljáráshoz az 5 µg/ml-es törzsoldatot 10, 20, 40 és 80 µl, a 20 µg/ml-eset 40 és 80 µl mennyiségben adtam a vizelethez. A mintaelőkészítésnél a közvetlen származékképzés módszerét alkalmaztam. A vizeletet és a hozzájuk adott standard oldatokat együtt vákuumbepárlón tömegállandóságig szárítottam, majd a 3.4.4 pont szerint reagáltattam PYR/HMDS/PFPA 10:7:3 (v/v/v) reagenssekkel. A mintákat ezt követően szobahőfokra hűtöttem és HMDS-sel tízszeresére hígítottam.

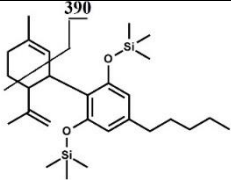
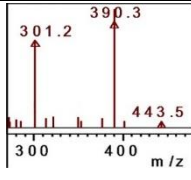
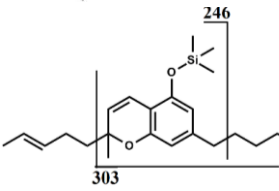
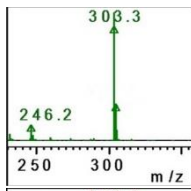
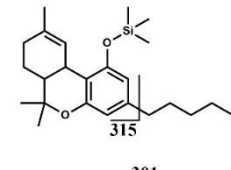
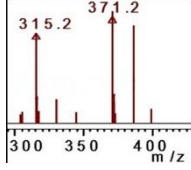
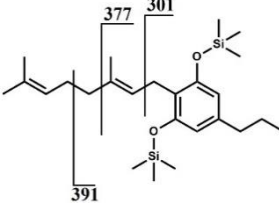
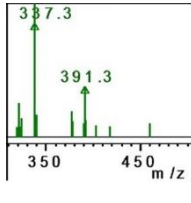
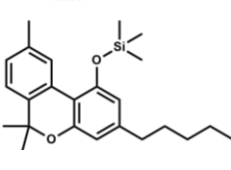
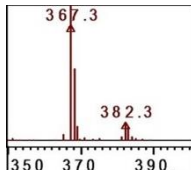
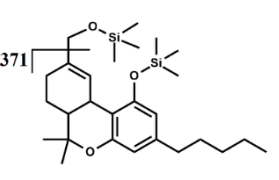
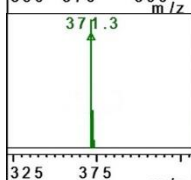
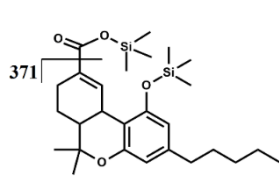
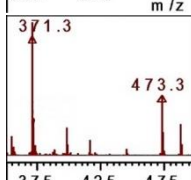
A mérések adatait FS-üzemmódban rögzítettem, a kiértékeléshez az SFI-ok alapján extrahált kromatogramokat használtam. A csúcs alatti területek szoftveres integrálásával határoztam meg a válaszjeleket és ezeket az eredményeket ismertető táblázatokban integrátor egységben (IE) jelöltem.

4. Eredmények

4.1 KNBD típusú vegyületek trialkilszilil-származékképzési tanulmánya

A növényi KNBD-ok kromatográfias szakirodalmi előzményeit áttekintve megállapítható, hogy a származékképzési eljárások nagy része a trimetilszililezést javasolja MSTFA-val és BSTFA-val. A véletlenszerűen alkalmazott TMCS, TMSI vagy TBDMCS katalizátor szükségességét nem indokolják. A származékképzés körülményei széles tartományban változnak: a reakcióhőfok 37-125 °C, a reakcióidő: 1-60 perc között. A mintaelőkészítést jellemzően nem optimalizálják, a módszert korábbi irodalmakra hivatkozva alkalmazzák. További érdekesség, hogy egyetlen tanulmány sem alkalmaz HMDS reagenst. Átfogó trialkilszilil-származékképzési tanulmány a PhD-munkám megkezdése előtt nem készült. A felmerülő kérdések tisztázására egyazon készüléken, azonos feltételek mellett vizsgáltam az oldószer, a származékképző reagens, a katalizátor és a reakciókörülmények válaszjelekre gyakorolt hatását öt növényi KNBD és két fő bomlástermékük bevonásával. A kísérletsorozat elején fragmentumanalitikai tanulmányt készítettem, amellyel a célvegyületek kromatográfias viselkedését vizsgáltam. A mérések alatt megfigyelt fragmentáció összhangban volt a szakirodalomban leírtakkal. A molekulaion ($[M]^+$) és/vagy a molekulaionból metil veszteséssel keletkező fragmentum ($[M-15]$) a CBC és 11-OH-THC kivételével minden célvegyület tömegspektrumában megtalálható volt (8. ábra). A detektált ionokat az ábrán félkövér betűtípussal jelöltem. Az ionizációkor a CBC két jellemző fragmentumra, m/z 246-ra és 303-ra, hasadt. Az oldalláncok töredezése a THC-ra és CBG-ra is jellemző. A 11-OH-THC-nál a tizenegyes pozícióban lévő hidroxilcsoport és a hozzá kapcsoló szénatom lehasadása volt megfigyelhető. A keletkező molekulatöredék, melynek tömege m/z 371, a THC és a THC-COOH tömegspektrumában is abundáns volt. A CBD m/z 390-es fragmentuma gyűrűfelnyílás következtében jött létre a National Institute of Standards and Technology (NIST) adatbázisa szerint. A továbbiakban a vegyületek azonosítására és mennyiségi meghatározásához a fragmentumanalitikai tanulmányban mért retenciós időket és a SFI-okat (8. ábra) használtam. Az elválasztás időigénye tizenhárom perc volt, a vegyületek csúcsát nyolc és tizenkét perc között detektáltam. Az MTBSTFA-val képzett TBDMS-származékok méréséhez a kolonnater hőfokát 300 °C-on hét percig tartottam. A vegyületek retenciós ideje tíz és tizenöt perc közé esett. Az eredmények értékeléséhez a

kromatogramok SFI-okra szűrésekor figyelembe vettem a TBDMS-csoportok által okozott tömegnövekedést a TMS-származékokhoz képest.

Célvegyület kannabinoidok	t_R , perc	m/z [M] ⁺ [M-15] ⁺	Fragmentációs mintázat SFI-k, m/z	Tömegspektrum
CBD kannabidiol	8,94	458 443		
CBC kannabikromén	9,26	388 373		
THC tetrahydro- kannabinol	9,47	386 371		
CBG kannabigerol	9,59	460 445		
CBN kannabinol	9,84	382 367		
11-OH-THC 11-hidroxi- Δ^9 - tetrahydro- kannabinol	10,52	474 459		
THC-COOH 11-nor-9-karboxi- tetrahydro- kannabinol	11,18	488 473		

8. ábra A KNBD típusú vegyületek trimetilszilil származékainak retenciós ideje, jellemző fragmentációja és tömegspektruma

4.1.1 A reagensösszetétel optimalizálása

Az irodalmi adatok áttekintése után először az oldószereket a PYR-t, az ETAC-ot és az ACN-t hasonlítottam össze MSTFA-t alkalmazva a 8. táblázatban megadott térfogatarányban. A szilileléshez a leggyakrabban alkalmazott 70 °C 60 perc reakcióhőfokot és időt választottam. Vizsgálataim alapján az oldószereket azonos körülményeket alkalmazva nem tapasztalható jelentős eltérés, ezért a korábban már többször jónak bizonyuló PYR-t választottam a további kísérletekhez. Ezzel ellentétben a szililező reagens típusa, az idő és a hőmérsékleti viszonyok jelentősebb hatásúak, ezeknek a tényezőknek az átfogó optimalizálása elsődleges fontosságúnak látszott.

A szililező reagens (8. táblázat KNBD-okra vonatkozó sor) összehasonlításakor oldószerként PYR-t használtam, az optimalizálás eredményeit a 10. táblázatban ismertetem. A származékká alakítást 70 °C-on 60 percig végeztem. A kevésbé elterjedt, NH₄I + etántiol-tartalmú MSTFA nem látszott jobbnak, mint TMCS-os változata, ezért azt a további kísérletekbe már nem vontam be. Erélyesebb körülmények között is megvizsgáltam a reagens válaszjelekre gyakorolt hatását. A hőfokot 100 °C-ra emeltem. A TMS-donorú reagenset tartalmazó összetételekben a hőfok emelése kedvezően hatott a válaszjelekre. A *terc*-butil-dimetil-szilil donorú MTBSTFA-ról elmondható, hogy amennyiben nem állt fenn térbeli gátlás, mint a CBC, THC, CBN és 11-OH-THC vegyületeknél, enyhe körülmények mellett is maximális válaszjelet adott. A CBD, CBG és THC-COOH származékká alakítására azonban nem volt megfelelő (10. táblázat utolsó oszlopa). Újdonság volt, hogy a korábban még KNBD-ok származékká alakítására nem alkalmazott szililezőszer, a HMDS, az előbbieknél hatékonyabbnak tűnt. A szakirodalomban ajánlott MSTFA és BSTFA reagensek között nem mértem számottevő különbséget, továbbá úgy találtam, hogy a TMCS katalizátor sem növeli jelentősen a válaszjelet. Ezen tapasztalatok alapján a tanulmányt a megfelelő reakcióidő kísérleti meghatározásával folytattam HMDS + TFA és BSTFA reagensekkel 100 °C hőfokon. Optimális reakciókörülménynek a 100 °C 90 perc bizonyult, legkedvezőbb szililezőszernek a HMDS + TFA párost találtam (10. táblázat késsel jelölt értékek). A módszer teljesítményjellemzőit a kísérletek alapján ideálisnak választott reagensösszetétellel és körülmények közt mértem.

10. táblázat KNBD-ok származékképzési tanulmánya, a reagensek és a reakciókörülmények összehasonlítása

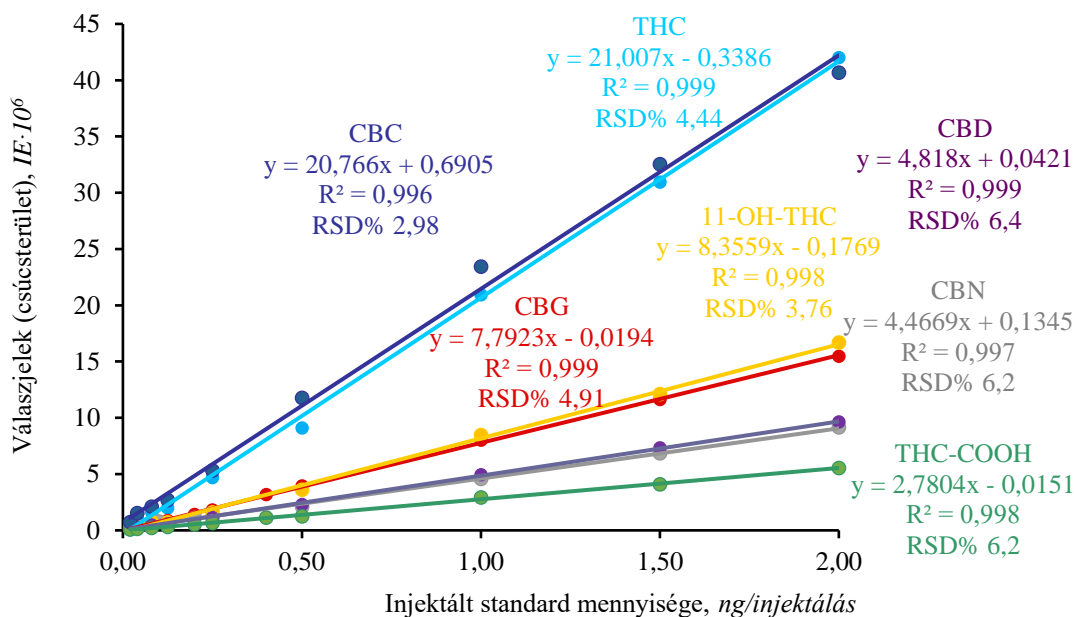
Célvegyületek	Reakció- körülmények↓		Integrátor egység x 10 ³ /pg standard (RSD%)						
	Reagensek→		HMDS + TFA	BSTFA	BSTFA + 1% TMCS	MSTFA	MSTFA + 1% TMCS	MSTFA NH ₄ I + etántiol	MTBSTFA+ 1% TBDMCS
	°C	perc							
CBD kannabidiol	70	60	4,18 (0,94)	4,17 (4,31)	3,65 (0,51)	3,64 (3,79)	3,63 (0,80)	3,47 (1,57)	0,44 (1,17)
	100	60	4,66 (1,24)	4,07 (0,58)	4,01 (1,16)	3,96 (1,31)	3,80 (0,04)	-	0,14 (1,84)
	100	90	4,99 (0,51)	4,81 (1,98)					
	100	120	4,97 (3,95)	4,46 (1,48)					
CBC kannabikromén	70	60	17,5 (2,60)	16,9 (1,65)	16,4 (0,43)	15,6 (4,30)	15,6 (1,87)	15,0 (1,89)	17,6 (0,28)
	100	60	19,6 (0,56)	17,7 (6,0)	17,1 (2,09)	17,8 (1,00)	16,9 (2,13)	-	20,6 (2,50)
	100	90	19,7 (3,90)	17,9 (1,03)					
	100	120	19,6 (0,56)	16,9 (2,32)					
THC tetrahydro- kannabinol	70	60	14,0 (3,58)	17,4 (0,02)	13,6 (0,79)	15,6 (2,87)	12,6 (1,02)	11,5 (1,08)	17,7 (3,82)
	100	60	22,1 (1,55)	19,2 (3,71)	18,4 (3,41)	18,6 (1,77)	18,6 (1,56)	-	16,4 (2,32)
	100	90	21,6 (6,7)	21,0 (2,38)					
	100	120	21,4 (1,77)	21,0 (1,59)					
CBG kannabigerol	70	60	6,0 (3,58)	6,0 (2,21)	5,5 (1,88)	5,4 (0,29)	5,4 (1,57)	5,0 (4,33)	1,67 (11)
	100	60	7,2 (2,15)	5,9 (3,96)	6,1 (0,89)	6,4 (4,48)	6,1 (2,64)	-	0,66 (2,79)
	100	90	7,7 (4,82)	5,9 (3,02)					
	100	120	6,7 (2,84)	6,0 (1,69)					

10. táblázat folytatása

Célvegyületek	Reakció- körülmények↓		Integrátor egység x 10 ³ /pg standard (RSD%)						
	Reagensek→		HMDS + TFA	BSTFA	BSTFA + 1% TMCS	MSTFA	MSTFA + 1% TMCS	MSTFA NH ₄ I + etántiol	MTBSTFA+ 1% TBDMCS
	°C	perc							
CBN kannabinol	70	60	5,9 (0,14)	4,29 (1,53)	5,2 (0,37)	3,52 (1,42)	4,79 (0,07)	5,5 (0,53)	4,24 (1,11)
	100	60	4,75 (0,01)	4,44 (0,29)	4,03 (1,62)	4,26 (2,64)	3,95 (0,72)	-	5,22 (0,53)
	100	90	4,52 (1,10)	4,46 (1,23)					
	100	120	4,30 (2,19)	3,81 (2,41)					
11-OH-THC 11-hidroxi- tetrahydro- kannabinol	70	60	6,0 (1,18)	6,4 (1,63)	5,6 (0,52)	5,9 (6,6)	5,9 (0,69)	5,0 (0,91)	6,4 (5,7)
	100	60	7,9 (1,97)	7,0 (4,42)	6,5 (3,90)	6,7 (1,33)	6,5 (2,40)	-	6,3 (2,44)
	100	90	7,9 (6,7)	6,9 (0,78)					
	100	120	7,9 (2,97)	7,0 (2,58)					
THC-COOH 11-nor-9-karboxi- tetrahydro- kannabinol	70	60	1,59 (5,14)	2,44 (0,71)	2,29 (0,47)	2,40 (6,8)	2,62 (3,41)	2,56 (10)	0,70 (10)
	100	60	2,68 (0,77)	2,90 (0,30)	2,63 (4,32)	2,85 (0,21)	2,95 (1,39)	-	0,42 (3,09)
	100	90	3,02 (3,86)	2,82 (4,10)					
	100	120	3,20 (2,20)	3,09 (3,31)					

Jelölések: HMDS = hexametil-diszilazán; TFA = trifluor-ecetsav; BSTFA = *N,O*-bisz(trimetilszilil)-trifluoracetamid; TMCS = trimetil-klór-szilán; MSTFA = *N*-metil-*N*-(trimetilszilil)-trifluoracetamid; MTBSTFA = *N-terc*-butil-dimetil-szilil-*N*-metil-trifluoracetamid; TBDMCS = *terc*-butil-dimetil-klór-szilán; Kék, félkövér betűtípussal az optimálisnak választott reakciókörülmények és reagensösszetétel, zárójelben a párhuzamos mérések RSD %-a

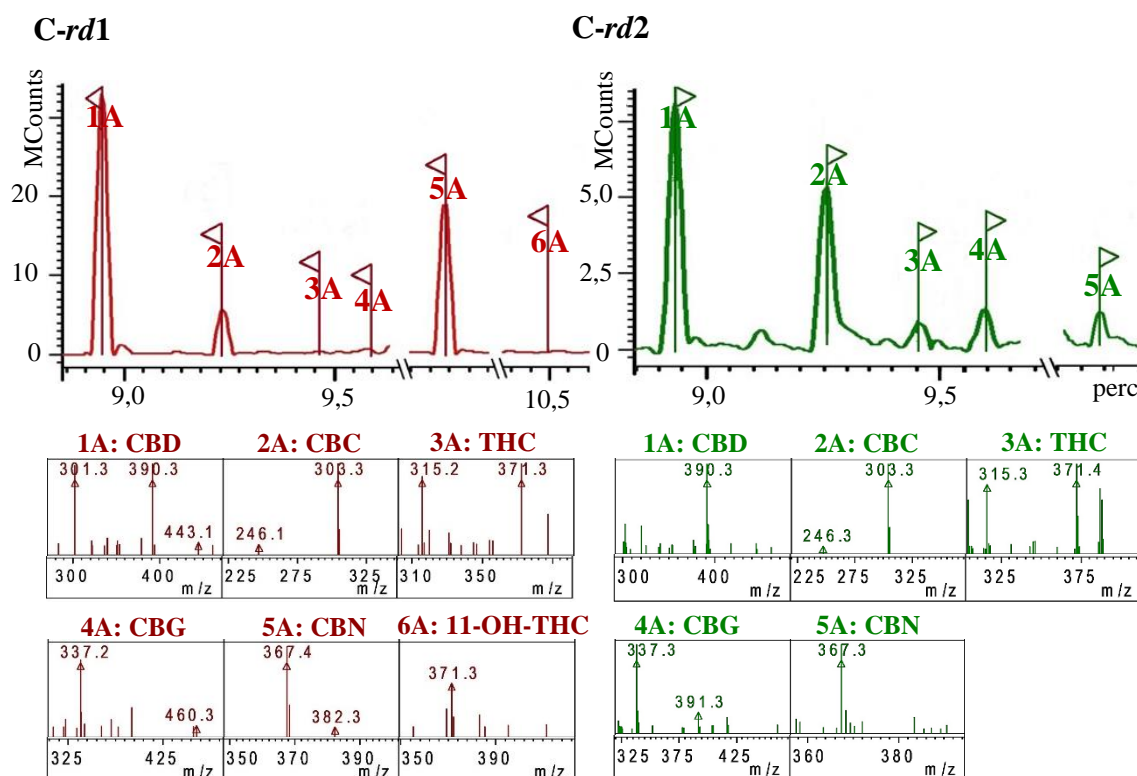
A HMDS-sel optimalizált módszer linearitását a 9. táblázat szerint, a 20-2000 pg/μl származék tartományban vizsgáltam (9. ábra). A vegyületek egymáshoz viszonyított érzékenységekben nagy különbségeket tapasztaltam, a legnagyobb válaszjelet a CBC, a legkisebbet a THC-COOH adta, azonos mennyiségeket figyelembe véve. Az illesztett egyenesek korrelációja (R^2) 0,996-0,999 értéknek adódott. A mért területek jól egyeztek az egyenes egyenletéből számolt értékkel, a módszer torzítatlansága 95,4-104% között változott. Az ismételhetőséget párhuzamos mintaelőkészítéssel vizsgáltam és a relatív standard deviáció (RSD%) értékekkel jellemeztem. A legkisebb szórást a THC-nál tapasztaltam, 2,98 RSD%-ot, a legnagyobbat, 6,2 RSD%-ot a CBD mérésénél. Standard oldatokat vizsgálva az LOQ 20-80 pg/injektálásnak adódott. A THC, 11-OH-THC és CBN meghatározhatósági mennyisége a legmagasabb, rendre 80, 80 és 84 pg/μl. A THC-COOH, CBC és CBD LOQ értéke az első kettő vegyületre 40, a CBD-ra 41 pg/μl, míg a CBG-é a legkisebb 21 pg/μl.



9. ábra KNBD standard oldatok linearitás vizsgálata 0,02-2,00 ng/injektálás tartományban: az egyenes egyenlete, korrelációja és a párhuzamos mérések átlagos RSD %-a vegyületenként

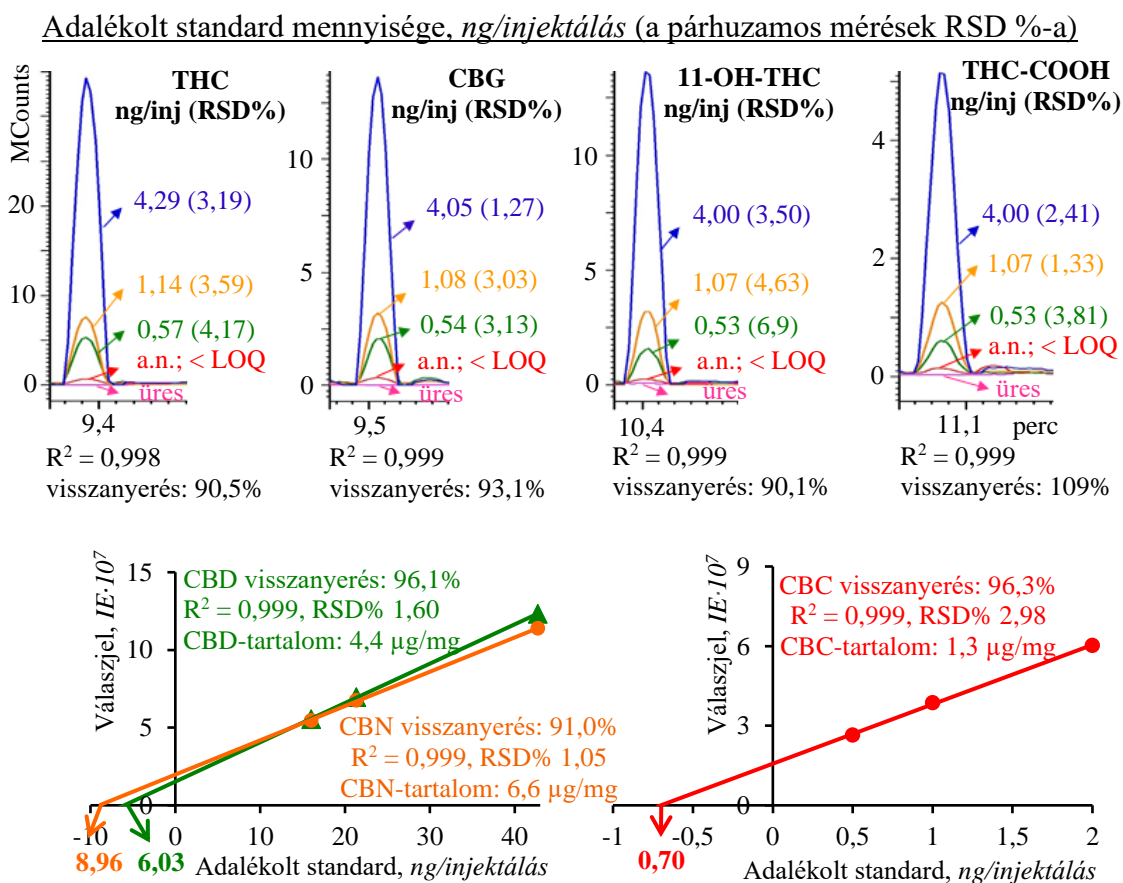
4.1.2 A HMDS alkalmazása szililezőszerként - vadkender KNBD-tartalmának meghatározása az optimalizált mintaelőkészítési eljárással

A mintaelőkészítési módszer gyakorlati alkalmazásának kidolgozásához olyan mátrixra volt szükség, mely nem igényel külön engedélyeztetést, ezáltal könnyen beszerezhető. Ezért a Magyarországon is honos vadkendert (*Cannabis ruderalis*) választottam, mely kisebb hatóanyag-tartalmú, mint pszichoaktív rokonai (*C. sativa*, *C. indica*) és a benne található KNBD-ok arányai is eltérőek. Az alacsony THC-tartalmú növény vadon nő, így gyűjtése egyszerű és gyakorlatilag korlátlan mennyiségben elérhető. A vizsgált virágzó női kender gyűjtése 2016-ban (C-rd1) és 2017-ben (C-rd2) történt. A minták a termőhelytől és a természeti viszonyoktól függően különböző KNBD összetételűek. A korábban gyűjtött növény (C-rd1) a vizsgált vegyületek közül hármat (CBC, CBD és CBN) nagy, míg további hármat (THC, CBG és 11-OH-THC) elhanyagolható mennyiségben detektáltam. A 2017-es növényben (C-rd2) öt vegyületet tartalmazott. Az azonosított vegyületeket és azok tömegspektrumait a 10. ábra mutatja.



10. ábra A kender mintákban (C-rd1, C-rd2) azonosított kannabinoid vegyületek kromatogramjai és tömegspektrumai

Az azonosított KNBD-ok pontos mennyiségét standard addícióval határoztam meg. A *C-rd1* növény CBD, CBN és CBC, míg a *C-rd2* CBD, CBC, CBG KNBD-tartalma volt LOQ feletti. Az addíció során a növényben lévő mennyiséggel összemérhető koncentrációjú, bepárolt standard oldatokhoz adtam a 0,500-0,550 mg analitikai pontossággal mért, elporított növényi szövetet. A *C-rd1*-ben CBN és CBD mennyisége nagyobb volt, mint a CBC-é, ezért az addíciót 20, 30 és 40 µl 0,2 mg/ml-es koncentrációjú és térfogatú CBD és CBN törzsoldatokkal, valamint 10, 20 és 40 µl 0,05 mg/ml-es CBC-vel végeztem (11. ábra). A származékká alakítást a 3.4.4 pont, 8. táblázata szerint, a KNBD vegyületekre vonatkozó optimális mintaelőkészítés szerint készítettem.

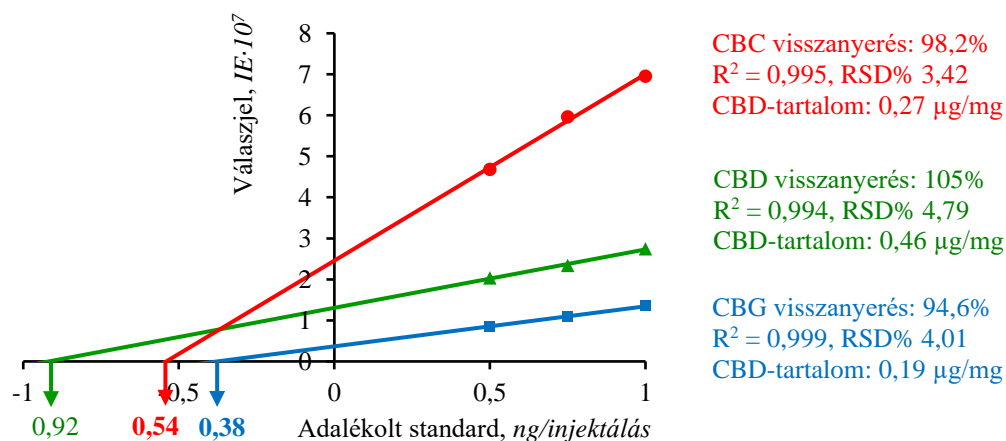
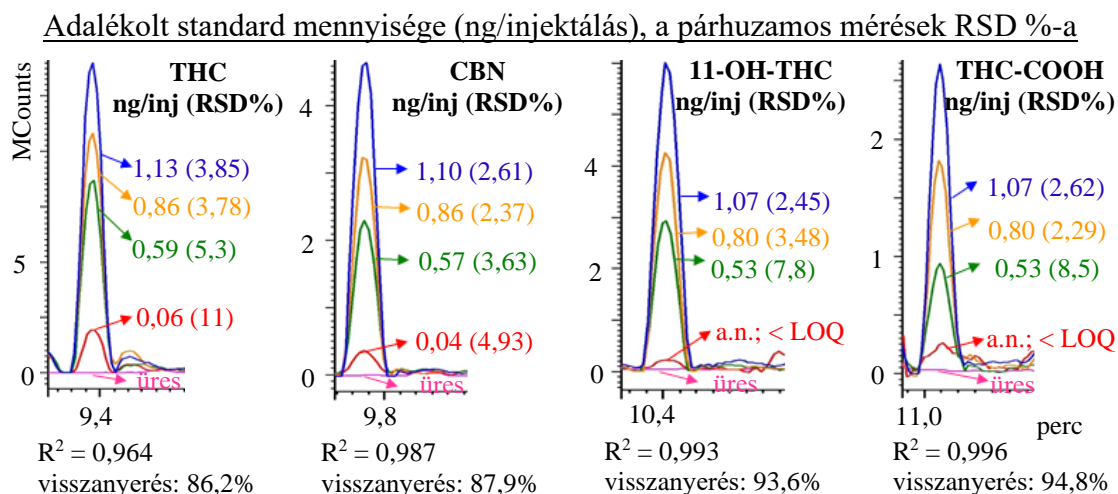


11. ábra *C-rd1* minta hatóanyagtartalmának meghatározása standard addícióval: visszanyerés, a párhuzamos mérések átlagos RSD% és R² adatokkal, valamint az egyenesek tengelymetszetéből számolt CBD, CBN és CBC tartalommal (a.n. = addíció nélkül, közvetlenül származékká alakítva)

A mért válaszjeleket IE-ben kifejezve az adalékolt mintaoldat mennyiségének függvényében ábrázolva, az egyeneseket az x-tengelyre vetítve a kender minták eredeti

KNBD-tartalmát kaptam. A CBN 6,6 µg, a CBD 4,4 µg, a CBC 1,3 µg volt 1 mg szárított növényre vonatkoztatva. Az átfogó kísérlet okán a vadkenderben csekély mennyiségben termelődő CBG, THC és az emberi szervezetben metabolizáció útján keletkező 11-OH-THC és THC-COOH mérhetőségét is vizsgáltam komplex mátrix jelenlétében. 0,50-0,55 mg növényhez 0,5-4 ng/injektálás mennyiségű standardot adva. A C-*rd1* minta mérésekor a visszanyerés 90,1-109%-nak adódott, az illetékt egyenes korrelációja 0,998-0,999 között változott (11. ábra).

A 2017-ben gyűjtött, C-*rd2*-vel jelölt mintában kisebb hatóanyagtartalmat mértem, mint a C-*rd1*-ben (12. ábra).



12. ábra C-*rd2* minta hatóanyagtartalmának meghatározása standard addícióval: visszanyerés, a párhuzamos mérések átlagos RSD% és R² adatokkal, valamint az egyenesek tengelymetszetéből számolt CBC, CBD és CBG tartalommal (a.n. = addíció nélkül, közvetlenül származékká alakítva)

Az addíciós eljárásakor nem tettem különbséget a vegyületek között, mind a hét célvegyületet tartalmazó 0,01 mg/ml koncentrációjú oldat 20, 30 és 40 µl mennyiségéhez adtam a $\pm 0,01$ mg pontossággal kimért 0,71-0,78 mg porított növényt, majd a 3.4.4 pont, 8. táblázat KNBD-ok optimális származékképzési körülményei szerint reagáltattam.

A *C-rd2* növényt addíció nélkül közvetlenül származékká alakítva a metabolitok kivételével minden vegyület kimutatható volt. THC és CBN esetében LOQ-hoz közeli, az alatti, mennyiségeket mértem, míg a CBD, CBC és CBG tartalom egy nagyságrenddel volt nagyobb az előző kettőnél, a felsorolás sorrendjében 0,46, 0,27 és 0,19 µg 1 mg száraz anyagra vonatkoztatva. A linearitás vizsgálat R^2 értéke 0,964-0,999, az adalékolt standard vegyületek visszanyerése 86,2-105% között változott. Az ismételhetséget az injektálások relatív szórásával (RSD%) jellemeztem, mely 2,29-11% volt. Mindkét növényi minta KNBD-tartalmának meghatározásával párhuzamosan standard oldat válaszeljelt is mértem. A visszanyerést a mátrixban és a standardban kapott válaszelemek arányából számoltam. Az eredmények alapján a mátrix hatást kizártam.

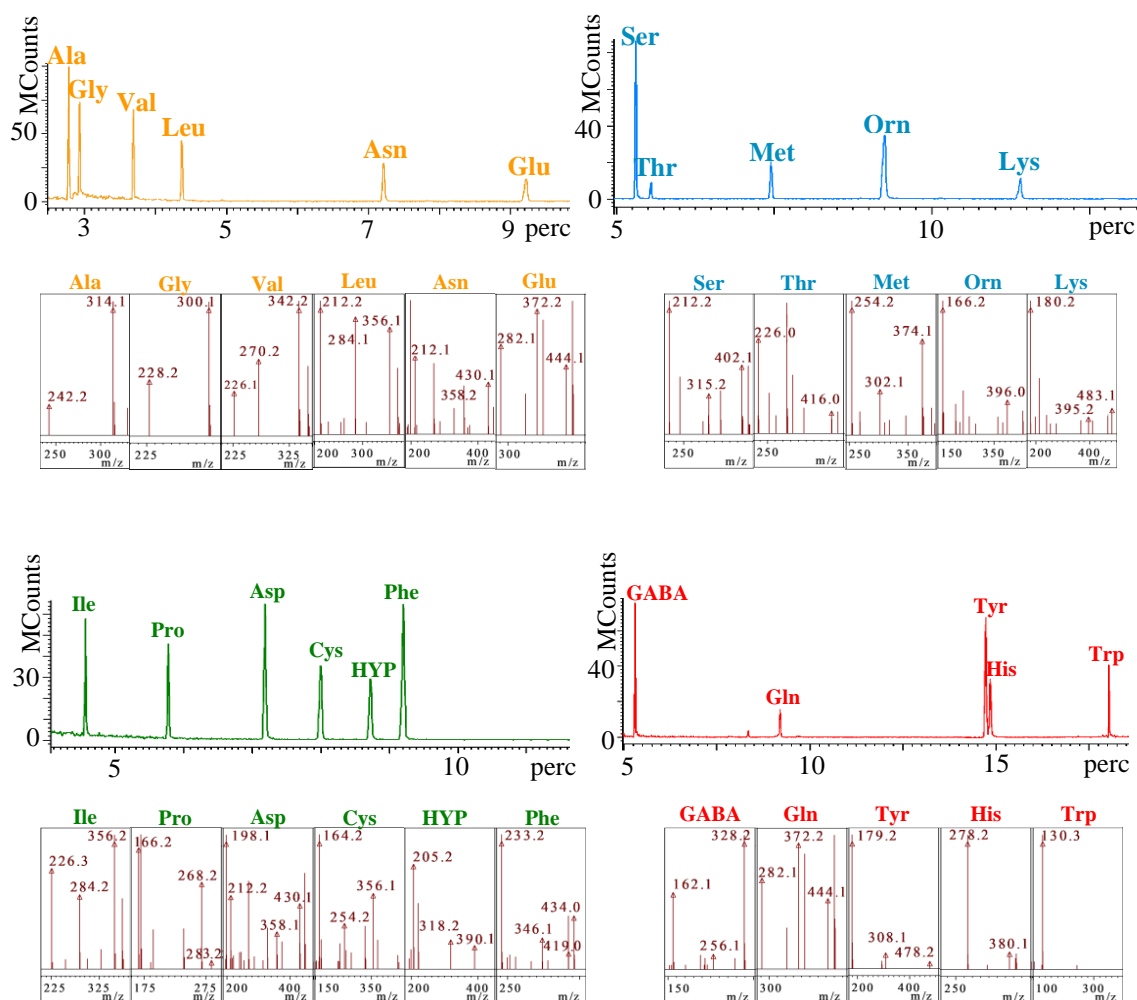
4.2 A HMDS új alkalmazási lehetőségei - egyidejű acilezés és szililezés

4.2.1 A kémiaiilag többfunkciós aminosavak származékká alakítása HMDS-sel

A HMDS újra bizonyította kiváló szililező képességét a KNBD vegyületcsalád GC-MS meghatározásánál és kutatócsoportunk korábbi munkássága [6-7] igazolta, hogy az átlagosnál nagyobb arányú perfluor-karbonsavval (PFKS) párosítva acilező tulajdonságú. A vizsgálataink feltárták, hogy kivételes szimmetrikus szerkezete révén az aromás primer aminok aminocsoportját acilezett származékká alakítja. A primer fenilalkil-aminokkal végezett kutatásokban vizsgáltuk az aromás gyűrűt az aminocsoporttal összekötő alkil lánc tagszámának, valamint a gyűrű szubsztitúciójának hatását az acilezésre és optimalizáltuk a reagenselegy összetételét. A PhD-munkámat a korábbi eredményekre alapoztam és a származékképzési eljárások további vizsgálatához olyan bifunkciós vegyületcsaládot vontam be a kutatásba, ahol amino- és karboxil- funkciós csoportok egyidejűleg voltak a molekulában. Választásom az AS-akra esett, melyeket korábban GC-vel szililezést vagy kloroformátos acilezést követően mértek. A szakirodalomból megismert eljárások gyakori hátránya volt, hogy a származékképzéskor nem keletkeztek egységes termékek. Ez alatt azt értjük, hogy egyszeresen és többszörösen szubsztituált

származékok egyaránt képződtek, ami megnehezítette a kapott eredmények értékelését és bizonytalaná tette a mennyiségi meghatározások pontosságát.

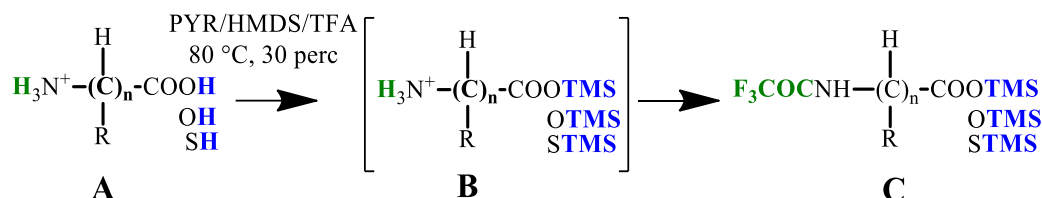
Mivel PhD-kutatásom kezdetéig a módszert csak aromás primer aminok acilezésére alkalmaztuk az első kísérletekben azt vizsgáltam, hogy az AS-ak acilezhetőek-e ha a korábban optimalizált tartományban eső HMDS:TFA 7:3 (v/v) arányú elegyével reagáltatom a vegyületeket PYR-es közegben. A kiértékeléskor megállapítottam, hogy minden aminosocportból azok acilezett termékei keletkeztek, függetlenül attól, hogy az α C-atomhoz kapcsolódott vagy az oldallánc része volt. A tömegspektrumokat tanulmányozva meglepetésként hatott, hogy a reakcióban a karboxilcsoportok, sőt az oldalláncok tiol- és hidroxilcsoportjai is szilileződtek (13. ábra).



13. ábra Aminosavak egy lépésben keletkező trifluoracilezett és szililezett származékainak kromatogramjai és tömegspektrumai

Ezzel sikerült az AS-ak aktív hidrogénjeit egy lépésben a megfelelő acil- és szilil-származékká alakítani egy klasszikusan trimetilszililezésre alkalmazott reagenssel. Az AS-akat a jellemző tömegspektrumaik alapján azonosítottam a $[M]^+$ és a $[M-15]^+$ ionok segítségével. A Gln és Asn a savas közegben Glu-á és Asp-á alakult, így ebben a formában detektáltam azokat, az Arg TMS-észter származékának kis stabilitása miatt nem volt mérhető. A kísérlet során melléktermékek és részlegesen vagy többszörösen szubsztituált származékok keletkezését nem tapasztaltam.

Az egy lépéses trimetilszililezés és trifluoracilezés feltételezett folyamata szerint (14. ábra) az aminosav (14. ábra, A kiindulás molekula) karboxilcsoportjának szilileződését követi (14. ábra, B átmenti termék) - a csökkent bázicitású - aminocsoport acilezése (14. ábra, C termék).



14. ábra Többfunkciós vegyületek egyidejű trimetilszililezésének és trifluoracilezésének feltételezett sorrendisége az AS-ak példáján bemutatva; ahol A jelöli a kiindulási vegyületet, B a csökkent bázicitású trimetilszililezett közti termék és C a szililezett-acilezett végterméket

Mivel a primer fenilalkil-aminok acilezésekor [6-7] a HMDS&TFA reagenspáros PFKS tagja cserélhető volt pentafluor-propionsavra (PFPA) és heptafluor-vajsavra (HFBA), ezért az egy lépéses acil- és szilil-származékká alakítást elvégeztem a fenti reagenspárosokkal is. Minden esetben a megfelelő perfluoracil-TMS észterek keletkeztek azonos fragmentációval. A különféle PFKS-akkal keletkező termékek fragmentációja karakterisztikus. A pentafluorpropionil- és a heptafluor-butiril-TMS észterek töredékionjainak tömege az egy C-atomhoz kapcsolódó két fluoridnak ($-\text{CF}_2$) megfelelően m/z 50 és m/z 100 tömegegységgel növekedtek a trifluoracetil származékokhoz képest. Az Orn és Lys két perfluoracilcsoporttal reagált, ezért ezen AS-aknál a PFKS-tól függően az m/z 100-as és 200-as tömegnövekedés volt megfigyelhető. A legtöbb AS (19-ből 14) TFA-val, a GABA, a His és a Trp PFPA-val, míg az Ala és a Gly HFBA-val adta a legnagyobb válaszjelet. Az egyes AS-akra jellemző SFI-okat,

retenciákat és a három PFKS-val mért válaszjeleket a 11. táblázatban foglaltam össze. A legrövidebb retenciós idővel a trifluoracetil származékok eluálódtak. A Phe, a Glu és az Orn pentafluorpropionil-TMS és heptafluor-butiril-TMS termékeinek retenciós sorrendje megfordult a trifluoracetil-TMS észtereikhez képest. Közeli retenciójuk miatt FS-üzemlétdban a fenti három vegyület csúcsa nem vált el egymástól. A módszer kidolgozása alatt külön oldatban vizsgáltam ezeket, egyenkénti meghatározásukat SFI-jaikra szűréssel oldottam meg.

4.2.1.1 AS-ak egylépéses szililezésének és acilezésének optimalizálása

A módszer optimalizálásakor a kutatócsoport korábbi, primer fenilalkil-aminokkal folytatott kutatását [6] követtem. Oldószerek közül a PYR, az ETAC és az ACN alkalmazhatóságát vizsgáltam. Az ETAC-os és az ACN-es közegben az oldatot enyhén opálosnak találtam, ezért az oldószerek közül egyértelműen a PYR-t részesítettem előnyben. Mivel a fenilalkil-aminok acilezésekor a 80 °C 20 perc megfelelőnek bizonyult [6], az AS-ak egylépéses származékká alakításánál is hasonló eredményre számítottam, ezért a hőfok optimalizálásakor 60, 70, 80 és 100 °C-on 30 percig melegítettem az oldatokat. A mért válaszjelekben 70 °C fölött már nem tapasztaltam számottevő változást. A reakcióidőt 10, 20, 30 és 50 perc között változtattam, a hőfokot 70 °C-on tartva. Az elvártaknak megfelelően a származékká alakulás 20 perc alatt végbement. A kísérletek eredményeként elmondható, hogy az egylépéses acilezés és szililezés HMDS-TFA reagenspárossal széles hőfok és reakcióidő tartományban megfelelően alkalmazható, így a további mérések elvégzéséhez a 80 °C 30 percet választottam.

11. táblázat A háromféle PFKS-val egy lépésben perfluoracilezett és szililezett aminosavak (AS) (NH-TFA/PFP/HFB-TMS = trifluor-acetil/pentafluor-propionil/heptafluor-butiril – trimetilszilil észter származékok) retenciós idejének, szelektív fragmens ionjainak és a ~ 2 ng/μl koncentrációjú származékok válaszjeleinek összehasonlítása

AS	Keletkezett észter	Szelektív fragmens ionok (SFIs), <i>m/z</i>	Retenciós idő (<i>t_R</i>), <i>perc</i>	Válaszjelek, <i>IE/pg · 10⁴</i>		
				TFA	PFP	HFB
Alanin	NH-TFA/PFP/ HFB-TMS	[M-15] ⁺ 242, 292, 342; [M-15+TMS] ⁺ 314, 364, 414	2,88; 2,97; 3,35	1,53	1,04	1,62
Glicin		[M] ⁺ 228, 278, 328; [M+TMS] ⁺ 300, 350, 400	3,09; 3,27; 3,67	1,37	1,39	4,15
Valin		[M-15] ⁺ 270, 320, 370; [M-15+TMS] ⁺ 342, 392, 442; [M-C ₃ H ₈ -15] ⁺ 226, 276, 326	3,87; 4,14; 4,61	1,18	0,42	0,50
Leucin		[M-15] ⁺ 284, 334, 384; [M-15+TMS] ⁺ 356, 406, 456; [M-15-TMS] ⁺ 212, 262, 312	4,56; 4,98; 5,43	1,48	0,81	0,50
Izoleucin		[M-TMS+1] ⁺ 226, 276, 326; [M-15] ⁺ 284, 334, 384 [M-15+TMS] ⁺ 356, 406, 456	4,70; 5,13; 5,63	1,33	0,70	0,72
GABA		[M] ⁺ 271, 321, 371; [M-15] ⁺ 256, 306, 356; [M-15+TMS] ⁺ 328, 378, 428	5,36; 6,13; 6,61	0,35	2,74	1,78
Szerin	NH-TFA/PFP/ HFB-OTMS-TMS	[M+1] ⁺ 346, 396, 446 ; [M-30] ⁺ 315, 365, 415; [M-15+TMS] ⁺ 402, 452, 502; [M-C ₄ H ₁₀ O ₂ Si-15] ⁺ 212, 262, 312; [M-OTMS-15] ⁺ 290, 340	5,44; 6,16; 6,62	3,54	1,92	2,50
Treonin		[M-15] ⁺ 344, 394, 444; [M+1+TMS] ⁺ 432, 482, 532; [M-C ₄ H ₁₀ O ₂ Si-15] ⁺ 226, 276, 326	5,69; 6,44; 6,91	0,79	0,24	0,32
Prolin	NH-TFA/PFP/ HFB-TMS	[M] ⁺ 283; 333, 383; [M-15] ⁺ 268, 318, 368; [M-C ₄ H ₉ O ₂ Si] ⁺ 166, 216, 266	5,90; 6,62; 7,08	1,12	0,34	0,42
Aszparaginsav	NH-TFA/PFP/ HFB-diTMS	[M+1] ⁺ 374, 423, 474; [M-15] ⁺ 358, 408, 458; [M-15-OTMS] ⁺ 268, 318, 368; [M-15+TMS] ⁺ 430, 480, 520; [M-OTMS-TMS] ⁺ 212, 262, 312	7,39; 8,42; 8, 87	3,04	1,37	0,47

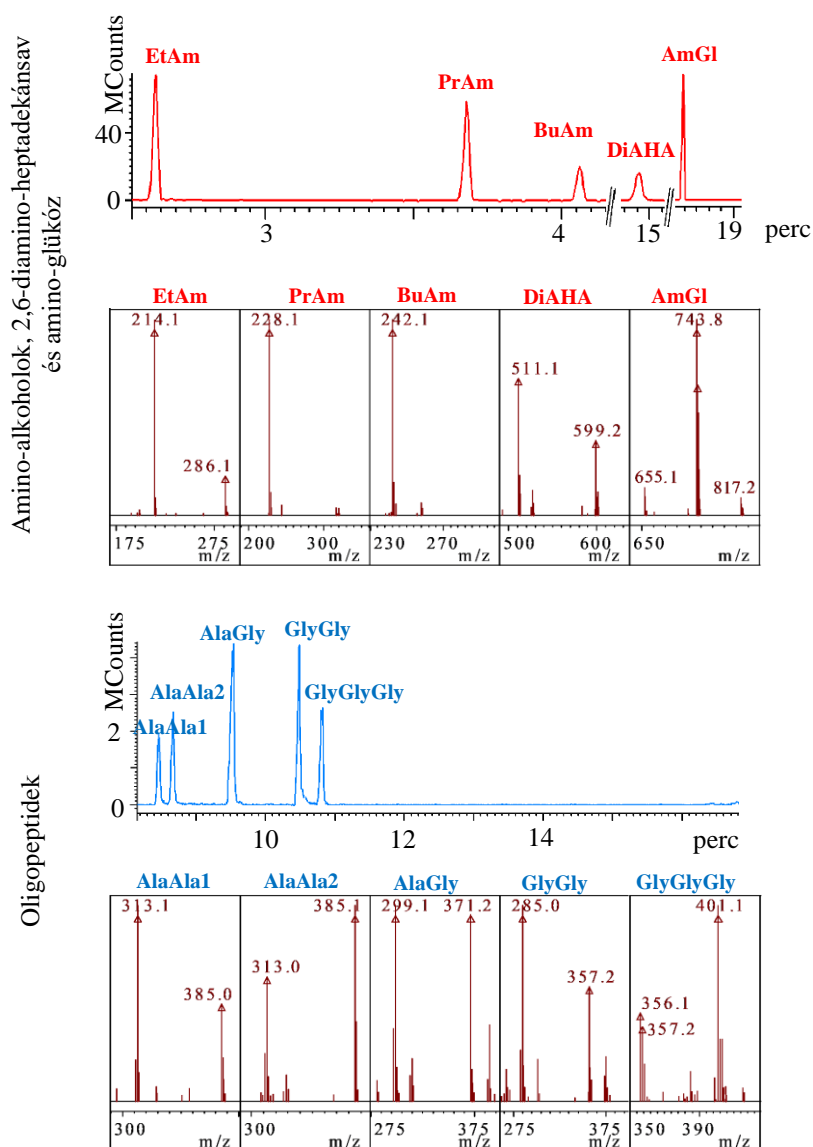
11. táblázat folytatása

AS	Keletkezett észter	Szelektív fragmens ionok (SFIs), <i>m/z</i>	Retenciós idő (<i>t_R</i>), <i>perc</i>	Válaszjelek, <i>IE/pg · 10⁴</i>		
				TFA	PFPA	HFBA
Metionin	NH-TFA/PFP/ HFB-TMS	[M] ⁺ 317, 367, 417; [M-15] ⁺ 302, 352, 402; [M+1+TMS] ⁺ 390, 440, 490; [M-C ₃ H ₆ S] ⁺ 243, 293, 343; [M-CH ₄ S-15] ⁺ 254, 304, 354	7,63; 8,62; 9,12	0,87	0,36	0,50
Hidroxi- prolin	NH-TFA/PFP/ HFB-OTMS-TMS	[M] ⁺ 371, 421, 471 [M-15] ⁺ 356, 406, 456; [M-C ₅ H ₁₃ OSi] ⁺ 254, 304, 354; [M-COOTMS-OTMS] ⁺ 164, 214, 264	8,69; 9,84; 10,18	0,85	0,40	0,45
Fenil- alanin*	NH-TFA/PFP/ HFB-TMS	[M+1] ⁺ 334, 384, 434; [M-15] ⁺ 318, 368, 418; [M-15+TMS] ⁺ 390, 440, 490; [M-NHPFP/HFB-15] ⁺ 205, 205, 205; [M-PFP/HFB-15] ⁺ 220, 220, 220	9,41; 10,37; 10,82	2,28	1,22	1,24
Gluta- minsav*	NH-TFA/PFP/ HFB-diTMS	[M] ⁺ 387, 437, 487; [M-15] ⁺ 372, 422, 472; [M-15-OTMS] ⁺ 282, 332, 382; [M-15+TMS] ⁺ 444, 494, 544	9,42; 10,33; 10,73	0,56	0,17	0,20
Ornitin*	NH,NH- diTFA/PFP/ HFB-TMS	[M] ⁺ 396, 496, 596; [M-15] ⁺ 381, 481, 581; [M-NHPFP/HFB-COOTMS] ⁺ 166, 216, 266; [M-15+TMS] ⁺ 453, 553, 653	9,44; 10,26; 11,12	1,02	0,40	0,33
Lizin	NH,NH- diTFA/PFP/ HFB-TMS	[M] ⁺ 410, 460, 510; [M-15] ⁺ 395, 445, 495; [M-NHTFA/PFP/HFB-COOTMS] ⁺ 180, 230, 280; [M-15+TMS] ⁺ 467, 567, 667	11,62; 12,08; 12,86	1,11	0,34	0,75
Tirozin	NH-TFA/PFP/ HFB-OTMS-TMS	[M-15] ⁺ 406, 456, 506; [M+1+TMS] ⁺ 478, 528, 578; [M-NHTFA] ⁺ 308, 308, 308; [M-NHTFA/PFP/HFB-COOTMS] ⁺ 179, 179, 179	14,99; 14,94; 15,23	1,61	3,82	3,65
Hisztidin	NH-TFA/PFP/ HFB-TMS	[M-15] ⁺ 308, 358, 408; [M-45] ⁺ 278, 328, 378; [M+TMS] ⁺ 395, 445, 495; [M+TMS-15] ⁺ 380, 430, 480	15,11; 15,05; 15,27	5,17	1,71	0,58
Tripto- fán	NH-TFA/PFP/ HFB-TMS	[M] ⁺ 372, 422, 472; [M-15] ⁺ 357, 407, 457; 130	18,03; 18,60; 18,82	2,17	4,66	2,51

Jelölések: * = a három csúcs elválasztása a szelektív ionokra való szűréssel lehetséges

4.2.2 Az egylépéses származékképzés kiterjesztése további multifunkciós vegyületekre

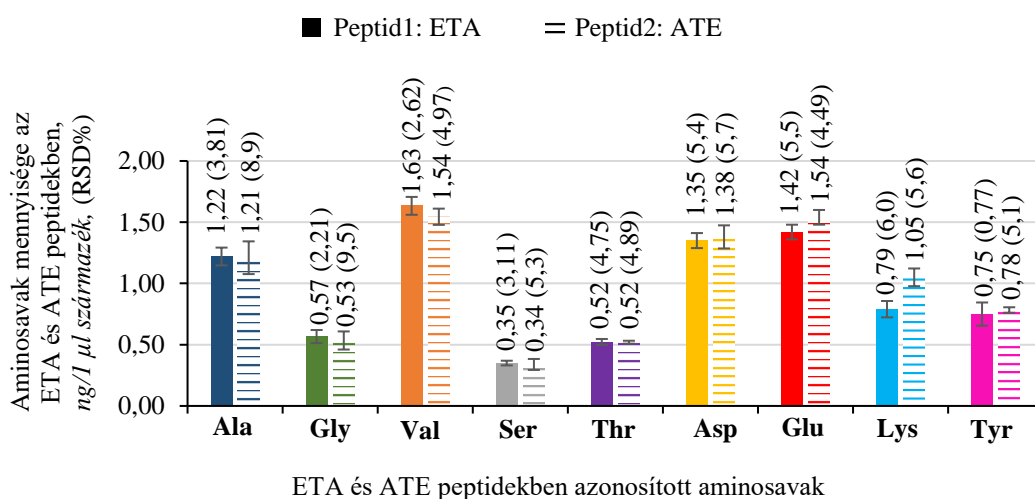
Az AS-akhoz hasonlóan kémiaailag többfunkciós vegyületnek számítanak a DiAHA, az AA-ok: pl. az EtAm, a PrAm és a BuAm, valamint az amino-cukrok (AC) pl. az AmGl is. A felsorolt vegyületek és a peptidek szintén rendelkeznek szabad karboxil- és primer aminocsoporttal, ezért feltételeztem, hogy ezen vegyületek is úgy viselkednek, mint az AS-ak (15. ábra).



15. ábra Amino-alkoholok (EtAm, PrAm, BuAm), 2,6-diamino-heptadekánsav (DiAHA), amino-glükóz (AmGl) és oligopeptidok egylépésben keletkező trimetilszilil-trifluoracil származékaiknak kromatogramjai és tömegspektrumai

A peptidek mérésénél meghatározó a felépítő AS-ak száma. Az oligopeptidek, melyek fehérjék építőkövei lehetnek, úgymint az AlaAla, az AlaGly, a GlyGly és a GlyGlyGly közvetlenül mérhetőek. A tagszám növekedésével a megfelelő illékonyság elérése származékképzéssel egyre nehezebbé vált, hiszen a C- és az N-terminális végeken lévő aktív hidrogének szubsztitúciója általában már nem elégséges, amit az esetleges oldalláncokban lévő hidroxil-, tiol- és aminocsoportok sem tudtak kompenzálni. További határt szabhat a molekulatömeg, hiszen az ioncsapdás MS készülékek meghatározott m/z tömegtartományban detektálnak. A kutatócsoportunk készülékénél ez a határ m/z 50-1000.

Az alkalmazott körülmények között a négy tagú peptideket már nem tudtam natív formájukban mérni. Ezért a több AS-ból álló peptidláncok összetételét a 3.4.3 fejezetben ismertetett hidrolízis és a 3.4.4 szerinti származékká alakítás után határoztam meg (16. ábra).



16. ábra ETA és ATE peptidekben a hidrolízis és az egylépéses származékképzést követően mért AS összetétel

A vizsgálat céljából két 15 tagú peptidet vizsgáltam (Peptid1: ETA és Peptid2: ATE), melyek AS összetétele megegyező volt, szekvenciájuk egymás fordítottjai (egybetűs kódokkal jelölve: ETA = KDQYASNVVVGETA, ATE = ATEGVVNSAYQDK). Mindkét peptid a porcalkotó aggregán G1 doménjének, egy T-sejt epitópot hordozó szekvenciárészlete, valamint annak reverz változata. A szekvenciárészlet szintetikus peptid formában Balb/c egérben arthritogén.

A 3.4.3 szerint hidrolizált peptideket 13 különféle AS alkotta, melyek közül az Arg-t TMS-származékának kis stabilitása miatt nem tudtam mérni. A két mintában mért AS-ak mennyisége megegyezett, mely bizonyította a módszer reprodukálhatóságát. Az AS-ak mennyiségét külső kalibráció alapján számoltam. A mérések szórását a 16. ábra hibásávjai jelölik, az RSD%-uk 0,77 és 9,5 RSD% közötti volt.

A külső kalibráció elkészítésekor az AS-ak linearitási tartományát 50-5000 pg/injektált származék tartományban nyolc koncentráció szinten vizsgáltam, az eredményeket a 12. táblázatban foglaltam össze. A legalacsonyabb LOQ értékű a Ser, a Thr, az Asp, a Met, a Val és a Trp, rendre 46, 43, 49, 47, 60 és 57 pg/injektálás. A GABA linearitási tartománya 411-4931 pg/injektálás között csak egy nagyságrendet fedett le. Az Ile és His LOQ értéke is magasabb volt, mint a többi AS-é, 264 és 329 pg/injektálás. A többi AS legkisebb meghatározható mennyisége 70-120 pg/1 μ l injektált származék volt. Az Arg kivételével, ami kis termikus stabilitása miatt nem detektálható, az AS-ak acilezett-szililezett származékai a vizsgált koncentráció tartományban jól mérhetőek. Az illesztett egyenes R^2 értéke 0,985-0,999 közé esett. Ellenőrzésként az AA-ok és oligopeptidek linearitását is mértem (12. táblázat). Az egyenesek egyenlete alapján megállapítottam, hogy peptidek érzékenysége a tagszám növekedésével csökken és LOQ mennyiségük egy nagyságrenddel magasabb, mint az AS-aké és AA-oké.

12. táblázat Aminosavak, aminosav-alkoholok és oligopeptidok linearitása, az illesztett egyenesek egyenletei és az R^2 értékek

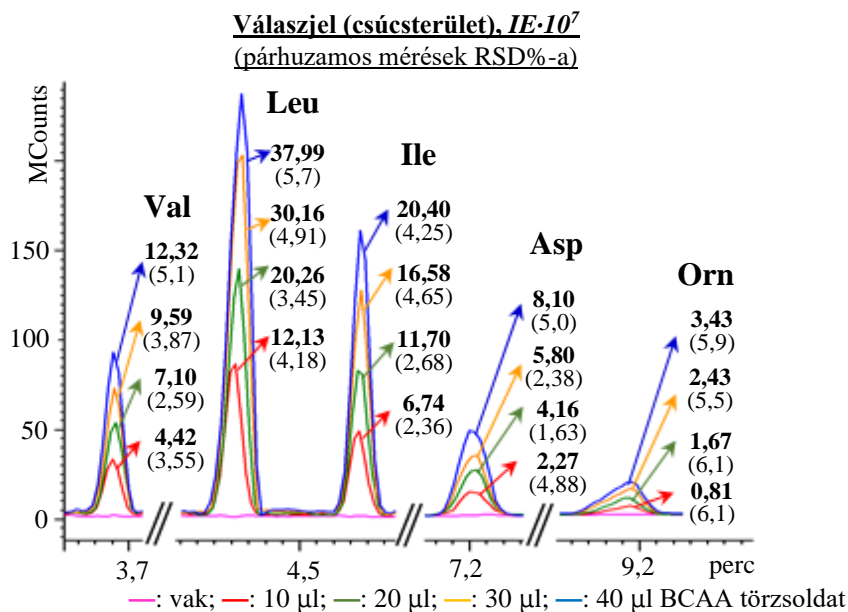
	Célvegyület	Linearitási tartomány, <i>pg/injektálás</i>	Egyenes egyenlete	R^2
Aminosav*	Alanin	92-3298	$y = 0,0039x + 0,3154$	0,993
	Glicin	117-4200	$y = 0,0030x + 0,2807$	0,995
	Valin	60-4342	$y = 0,0025x + 0,2358$	0,998
	Leucin	89-3190	$y = 0,0026x + 0,1861$	0,998
	Izoleucin	264-3808	$y = 0,0022x + 0,2063$	0,997
	GABA	411-4931	$y = 0,0049x - 0,0179$	0,995
	Szerin	46-3298	$y = 0,0055x + 0,0953$	0,996
	Treonin	43-3093	$y = 0,0013x + 0,0124$	0,997
	Prolin	91-3275	$y = 0,0016x - 0,0518$	0,998
	Aszparaginsav	49-3549	$y = 0,0039x + 0,2358$	0,999
	Metionin	47-3411	$y = 0,0012x + 0,0595$	0,998
	Hidroxi-prolin	102-3674	$y = 0,0021x - 0,0652$	0,998
	Fenilalanin	75-5370	$y = 0,0032x + 0,0682$	0,999
	Glutaminsav	70-5019	$y = 0,0008x + 0,0641$	0,998
	Aszparagin	112-3549	$y = 0,0020x - 0,0813$	0,998
	Ornitin	82-2961	$y = 0,0037x - 0,1689$	0,996
	Lizin	105-3093	$y = 0,0017x - 0,0980$	0,999
	Tirozin	93-3334	$y = 0,0048x + 0,7371$	0,992
	Glutamin	120-4334	$y = 0,0008x + 0,0907$	0,995
	Hisztidin	329-4732	$y = 0,0022x - 0,4981$	0,987
Triptofán	57-4091	$y = 0,0024x + 0,6360$	0,989	
Amino-alkohol*	Etanol-amin	90-5273	$y = 0,0012x + 0,0995$	0,999
	Propanol-amin	96-5616	$y = 0,0009x + 0,1143$	0,999
	4-amino-bután-2-ol	95-5557	$y = 0,0004x + 0,0460$	0,998
Peptid#	Alanil-alanin	249-4988	$y = 0,0013x - 0,0877$	0,999
	Glicil-glicin	222-4433	$y = 0,0012x - 0,1667$	0,999
	Alanil-glicin	268-5364	$y = 0,0012x - 0,1865$	0,999
	Glicil-glicil-glicin	250-4995	$y = 0,0003x + 0,2136$	0,999

Jelölések: y = csúcsterület (integrátor egység: * = $IE \cdot 10^7$; # = $IE \cdot 10^6$); x = injektált standard mennyisége, *pg/1 μ l*

4.2.3 Az egylépéses származékképzés teljesítményjellemzőinek meghatározása AS-akkal

4.2.3.1 A módszer arányosságának vizsgálata BCAA és vizelet mintákban

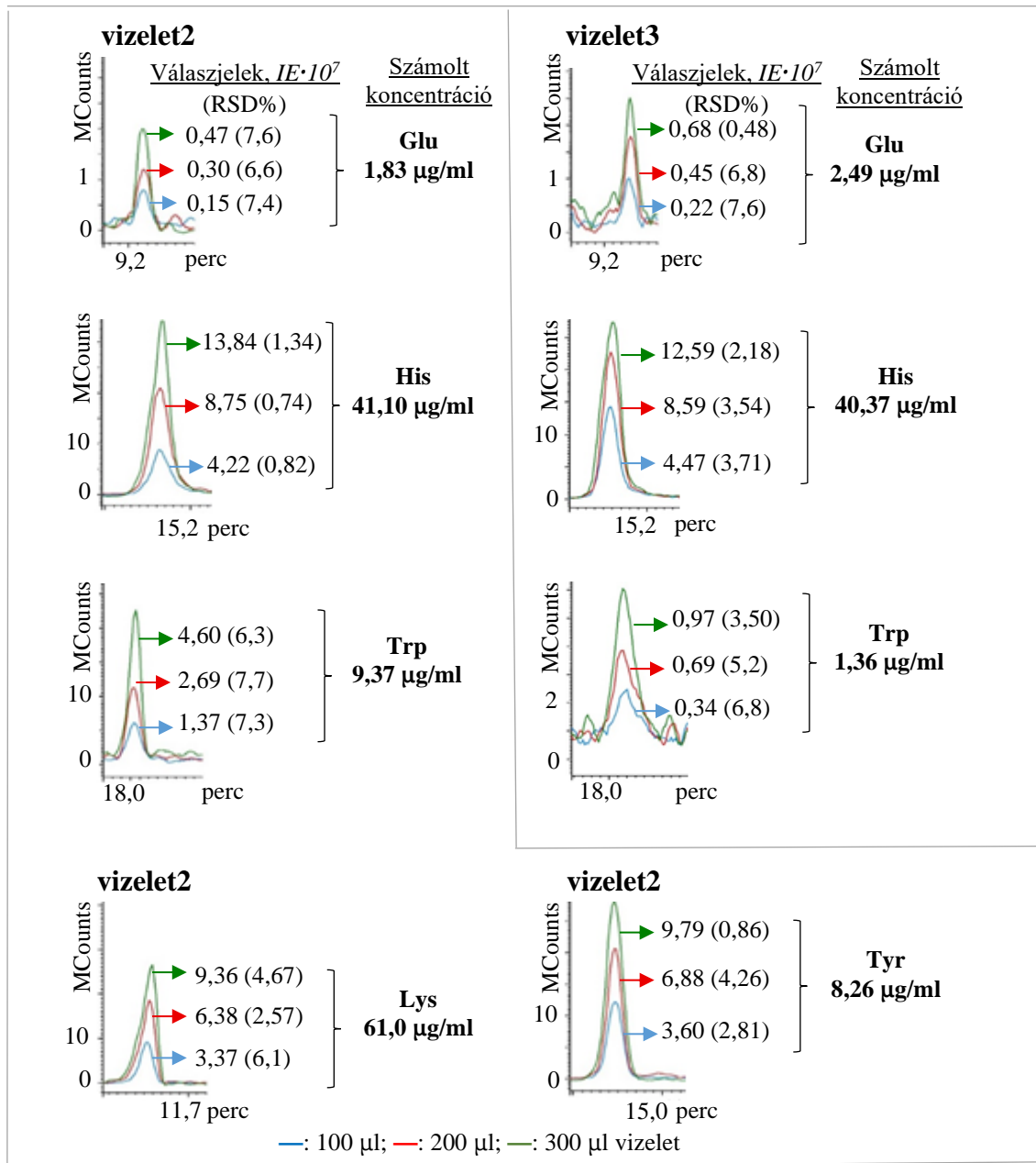
A kidolgozott mintaelőkészítési módszer gyakorlati alkalmazhatóságát magas AS-tartalmú BCAA étrend-kiegészítő és anyagcserezavar és/vagy neurológia rendellenességgel diagnosztizált betegek vizeletének AS-tartalom meghatározásával vizsgáltam. Mindenekelőtt az eljárás arányosságát teszteltem kétféle mátrix jelenlétében. Elsőként egy olyan étrend-kiegészítőt vizsgáltam, mely a „klasszikus BCAA” AS-aknak tekintett Val-on, Ile-on és Leu-on kívül Asp-t és Orn-t tartalmazott. A 3.5 szerint származékká alakított minta 1 µl-ét injektáltam. Az injektált térfogatban így az AS-ak mennyisége elvi érték alapján számolva 0,45-9,03 ng/1 µl hígított származék közé esett, a mérések RSD%-a 1,63-6,1 közötti volt. A különböző koncentráció szinten mért válaszjeleket és RSD%-okat a 17. ábra mutatja.



17. ábra Az egylépéses származékképzés arányosságának jellemzése különböző mennyiségű BCAA étrend-kiegészítő mérésével

Az egylépéses származékképzés arányosságát biológia mátrix vizsgálatával is igazoltam. Vizelet mérésnél a referenciaként alkalmazott minta egészséges önkéntestől (vizelet1),

míg az AS-kat tartalmazók (vizelet2-3) anyagcserezavarral diagnosztizált betegektől származtak. A három különböző kiindulási térfogatú (100, 200 és 300 µl) vizeletet a 3.4.2 szerinti centrifugálást követően a 3.4.4 és 3.5 fejezetben leírtak alapján származékká alakítottam és HMDS-sel 10-szeresére hígítottam. A származékok 1 µl-ét injektáltam a GC-MS készülékbe. Az eredményeket a 18. ábra mutatja.

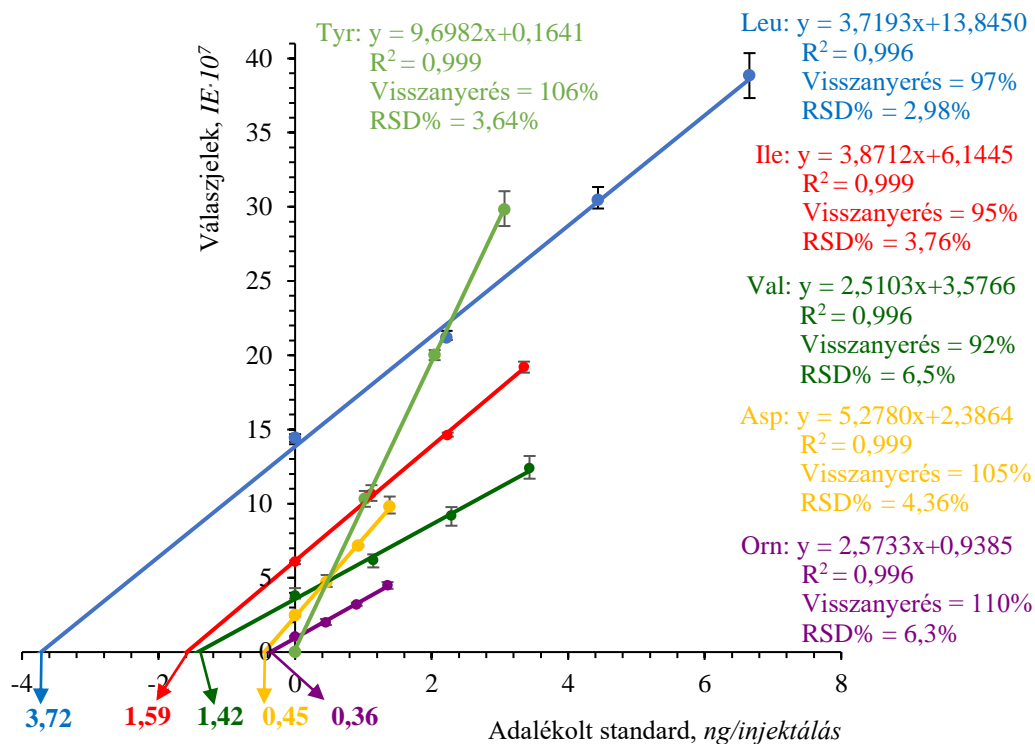


18. ábra Az aminosav tartalom meghatározása anyagcserezavarral diagnosztizált betegek vizeletének különböző kiindulási térfogataiból (vastagon szedve a számolt koncentrációk, zárójelben a párhuzamos mérések RSD%-a)

Mindkét vizeletben nagy mennyiségű Glu-t, His-t és Trp-t mértem, az eredményeket külső kalibráció alapján számoltam. A vizelet2-vel és vizelet3-mal jelölt mintában közel azonos volt a Glu és His mennyisége, előbbi 1,83 és 2,49 µg/ml, utóbbi 41,10 és 40,37 µg/ml. A Trp koncentrációjában már jelentős különbséget tapasztaltam, 9,4 és 1,36 µg/ml értékeket mértem. A vizelet2-ben ezeken felül Lys-t és Tyr-t azonosítottam 61,0 és 8,3 µg/ml koncentrációban. PhD-munkám alatt a fenti két vizeletet tovább elemeztem (ld. 4.2.4.6 fejezet), hogy a feltételezett kóros állapot igazolásához további adatokat gyűjtsek.

4.2.3.2 További teljesítményjellemzők meghatározása BCAA mátrix jelenlétében

A további teljesítményjellemzők meghatározásához standard addíciót alkalmaztam. A korábban vizsgált étrend-kiegészítő mintához a becsült eredeti AS-tartalmuknak megfelelő Leu-t, Ile-t, Val-t, Asp-t és Orn-t tartalmazó „kalibráló”-oldatot készítettem, melybe „belső standardként” Tyr-t tettem. A 3.5 szerint előkészített oldatok. 1 µl-ét injektáltam. Az eredményeket a 19. ábra ismerteti. Az illesztett egyenesek korrelációja 0,996-0,999, a visszanyerés 92-110% közötti érték volt. Az egyenes extrapolációjával kapott x-tengely metszete megadta a minta AS-tartalmát, melyek sorban: Val 1,42; Leu 3,72; Ile 1,59; Asp 0,45 és Orn 0,36 ng/1 µl injektált hígított származék, az eredeti szilárd mintára számítva rendre: 249, 126, 112, 35,6 és 28,5 mg/g volt. A párhuzamos minták többszöri injektálásából számolt ismételhetőség 2,98-6,5 RSD%-nak adódott. A mért értékek az elvitől (-8)-(+40)%-kal tértek el. A PhD-kutatásomban vizsgált étrend-kiegészítő AS-tartalma megfelelt az étrend-kiegészítők hatóanyag-tartalmára vonatkozó irányelveknek [tolerálható eltérés (-20)-(+50) %], a Leu-tartalma 91%, az Asp és az Orn mennyisége 102 és 99% volt. A Val és Leu jelentősebb eltérést mutatott, a feltüntetett érték 126 és 141%-át mértem a termékben.



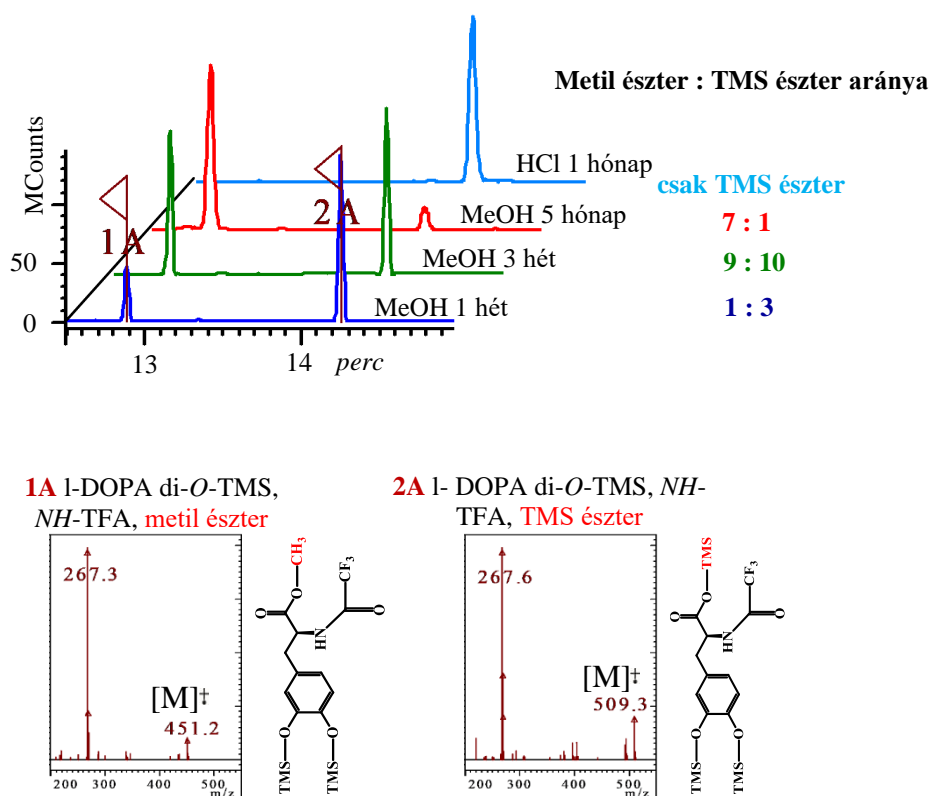
19. ábra Az egylépéses származékképzés teljesítmény jellemzőinek meghatározása standard addícióval BCAA étrend-kiegészítőben

4.2.4 BMA-ok egyidejű acilezése és szililezése

4.2.4.1 A mintaelőkészítés kulcs lépése: törzsoldatkészítés

A BMA vegyületcsoport mintaelőkészítésének kulcsfontosságú lépése volt a helyes oldószer megválasztása. Az irodalmi adatok az oldószert vagy nem tüntették fel vagy leggyakrabban metanol alkalmaztak, ez alól egy tanulmány [142] jelentett kivételt. Kísérleteink elején metanolos törzsoldatokat készítettem, azonban megfigyeltem, hogy az l-DOPA acilezett szililezett származéka frissen készített törzsoldatából egy csúcsban, míg néhány napos állást követően két csúcsban eluálódott. A tömegspektrumokat vizsgálva mindkét csúcsban az m/z 267 volt az abundás ion. A csúcsokat a $[M]^+$ alapján tudtam megkülönböztetni. A korábbi retenciójú csúcsban m/z 451, a későbbiben m/z 509 ionokat detektáltam, amelyek az l-DOPA acilezett metil- és TMS-észter származékainak tömegei. A hűtőben tárolás közben metanolos közegben a karbonsav spontán metil-észterre alakult. A metanolos törzsoldatot rendszeres időközönként származékká alakítva az l-DOPA metil-észterének folyamatos növekedését tapasztaltam, egy hét után 1:3,

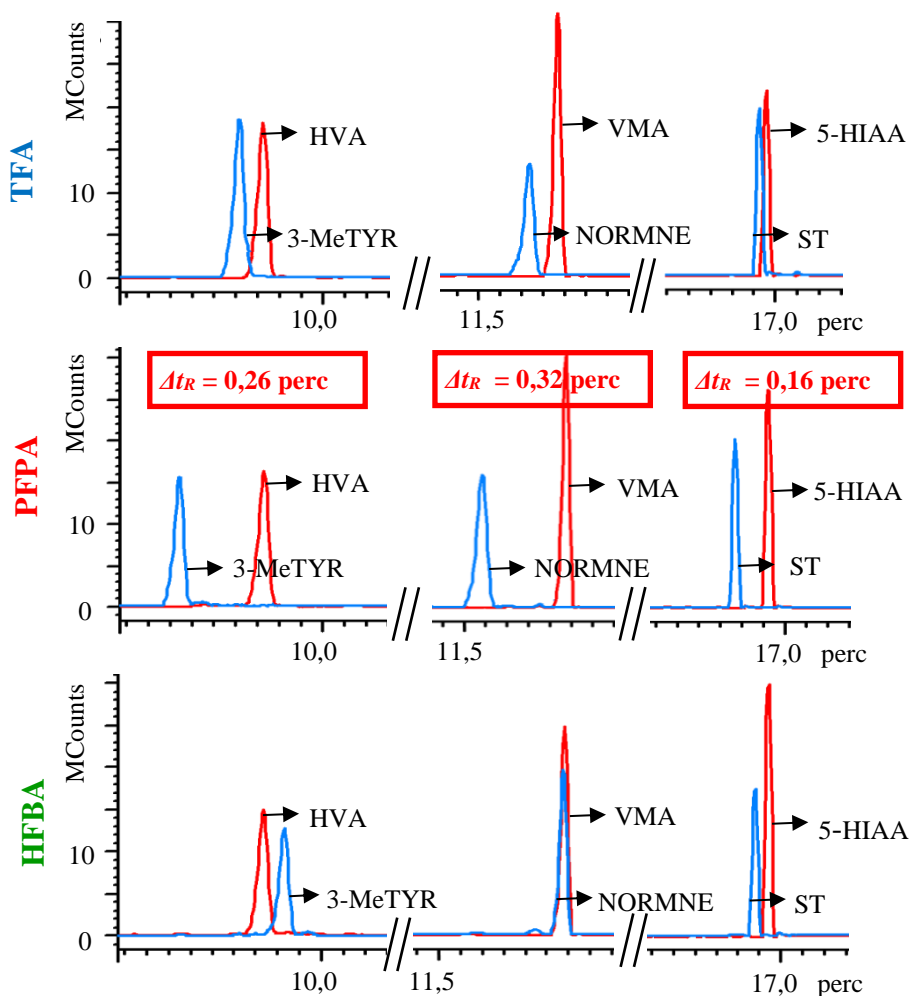
három hét állást követően 9:10 területarányt mutatott a nem metileződött formához képest (20. ábra). Több hónapos tárolás után majd a teljes mennyiség átésztereződött. Az észter képződés jelensége a metabolit savaknál is nyomon követhető volt. Ezért a metanol alkalmazását elvettem és a továbbiakban oldószerként sósavat használtam a törzsoldatkészítéshez. Erősen savas közegben az „epinefrinok” (EP, NOREP, NORMNE) és „triptaminok” (indol-gyűrűs T, 5-MeT, ST) válaszeléneke drasztikus csökkenését tapasztaltam, míg a TYR, 3-MeTYR, DA és l-DOPA stabilitása változatlan volt. Shin és mtsai [142] rámutattak az erősen savas közegben végbemenő triptaminokat érintő polimerizációra, melyet saját tapasztalataim is alátámasztottak. Az irodalmi előzmények és a megfigyelt változások alapján a 0,25 mM HCl-at találtam megfelelő oldószernek, melyben a BMA-ok tárolás alatt megőrizték stabilitásukat és a karbonsavak is egységes TMS-észter származékokként voltak mérhetőek (20. ábra).



20. ábra l-DOPA spontán metil-észterre alakulása metanolos törzsoldatban, a metil- és TMS-észter csúcsok egymáshoz viszonyított aránya tárolás alatt metanolos és sósavas oldatokban és a származékok tömegspektruma

4.2.4.2 A célvegyületek optimális elválasztása, BMA-ok és metabolitjai együttes meghatározása

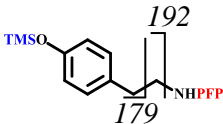
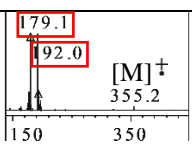
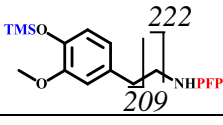
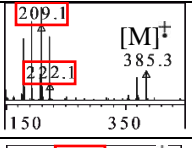
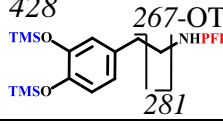
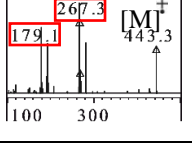
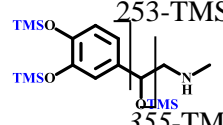
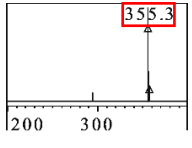
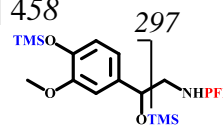
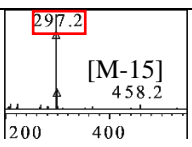
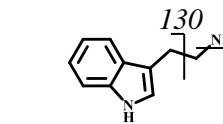
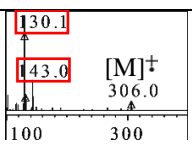
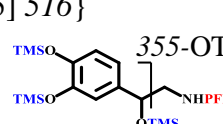
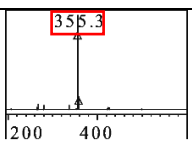
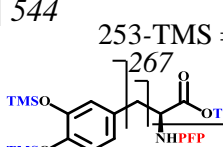
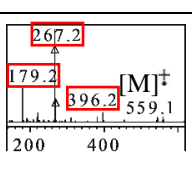
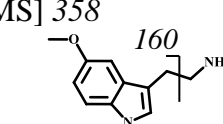
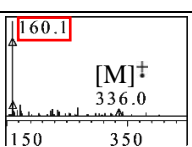
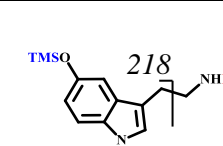
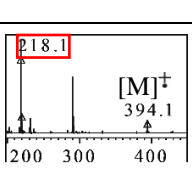
Az AS-aknál alkalmazott HMDS-TFA reagenspárral a válaszjelek maximálisnak tekinthetők voltak, azonban a BMA-ok és metabolitjaik retenciói egymáshoz közel estek, ami az egyidejű meghatározást ellehetetlenítette. A korábban már próbált PFPA-val és HFBA-val a retenciók eltolódtak. A fluor atomok számának növekedésével nőtt a BMA származékok illékonyasága, míg a bomlástermékeké az aminocsoport hiánya miatt változatlan maradt. A maximális különbségeket: 0,26; 0,32 és 0,16 percet, sorban a 3-MeTYR-HVA, a NORMNE-VMA és a ST-5-HIAA szerint, a PFPA-val lehetett elérni (21. ábra).



21. ábra BMA-ok és metabolitjai elválasztása különféle perfluor-karbonsavakkal (TFA, PFPA és HFBA) és a HMDS párosával

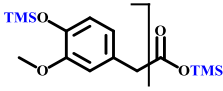
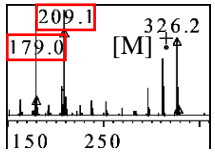
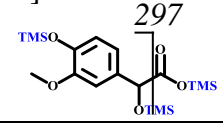
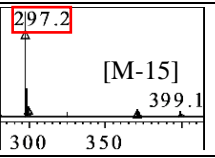
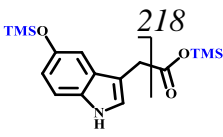
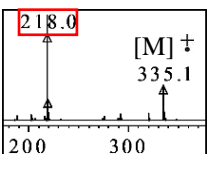
A PFPA alkalmazása kompromisszumos megoldásnak számított, hiszen a pentafluor-propionil-TMS észterek válaszejele kisebb volt, mint a megfelelő trifluor-acil-TMS származékoké, de ez a megoldás a jobb elválasztás miatt szükségzerű volt. Különösen, ha figyelembe vesszük, hogy az elektronionizáció miatt a vegyületek abundáns ionjai páronként megegyeztek: 3-MeTYR-HVA m/z 209; NORMNE-VMA m/z 297 és ST-5-HIAA m/z 218. Ez azzal magyarázható, hogy a BMA-ok aminocsoportot tartalmazó lánca, míg a savak karboxilcsoportja hasadt le és ezáltal minden esetben a páronként megegyező ionizált gyűrűs vázat detektáljuk. A további azonosítást segítették a $[M]^+$ és a $[M-15]^+$ ion, melyek kis intenzitással az EP és NOREP kivételével mindenhol megtalálhatók voltak a spektrumokban és a $-CF_2$ -csoportok m/z 50-es és $-CF_2-CF_2$ -csoportoknak köszönhető m/z 100-as tömegnövekedés a TFA származékokhoz képest itt is megfigyelhető volt, akár csak az AS-aknál. Az EP és NOREP vegyületeknél reagenspárostól függetlenül az amino-csoport vesztést követően a molekulavázból származó m/z 355 ion volt a spektrumban. A jellemző fragmentációs mintázatot a pentafluor-propionil-TMS származékok példáján mutatom be (13. táblázat). A metabolitokból az alkalmazott PFKS-tól függetlenül kizárólag szililezett termékek keletkeztek, melyek az ionizációkor a BMA-hoz hasonlóan viselkedtek, az ezekre vonatkozó adatokat a 14. táblázat mutatja.

13. táblázat BMA-ok pentafluor-propionil-TMS származékainak retenciós ideje, fragmentációja és tömegspektrumai

Célvegyület Retenciós idő, <i>perc</i>	[M] ⁺ ; [M-15]	Szelektív fragmentum ion (SFI), <i>m/z</i>	Tömegspektrum
tiramin 7,58	[M] ⁺ 355	 192 179	
3-metoxi-tiramin 9,59	[M] ⁺ 385	 222 209	
dopamin 10,58	[M] ⁺ 443; [M-15] 428	 267-OTMS = 179 281	
epinefrin 10,72	{[M] ⁺ 399}	 253-TMS = 179 355-TMS = 281	
normetanefrin 11,49	[M] ⁺ 473; [M-15] 458	 297 281	
triptamin 11,93	[M] ⁺ 306	 130 143	
norepinefrin 12,27	{[M] ⁺ 531; [M-15] 516}	 355-OTMS = 267 281	
levodopa 14,25	[M] ⁺ 559; [M-15] 544	 253-TMS = 179 267 396	
5-metoxi-triptamin 15,69	[M] ⁺ 336; [M+TMS] 358	 160 143	
szero-tonin 16,82	[M] ⁺ 394	 218 143	

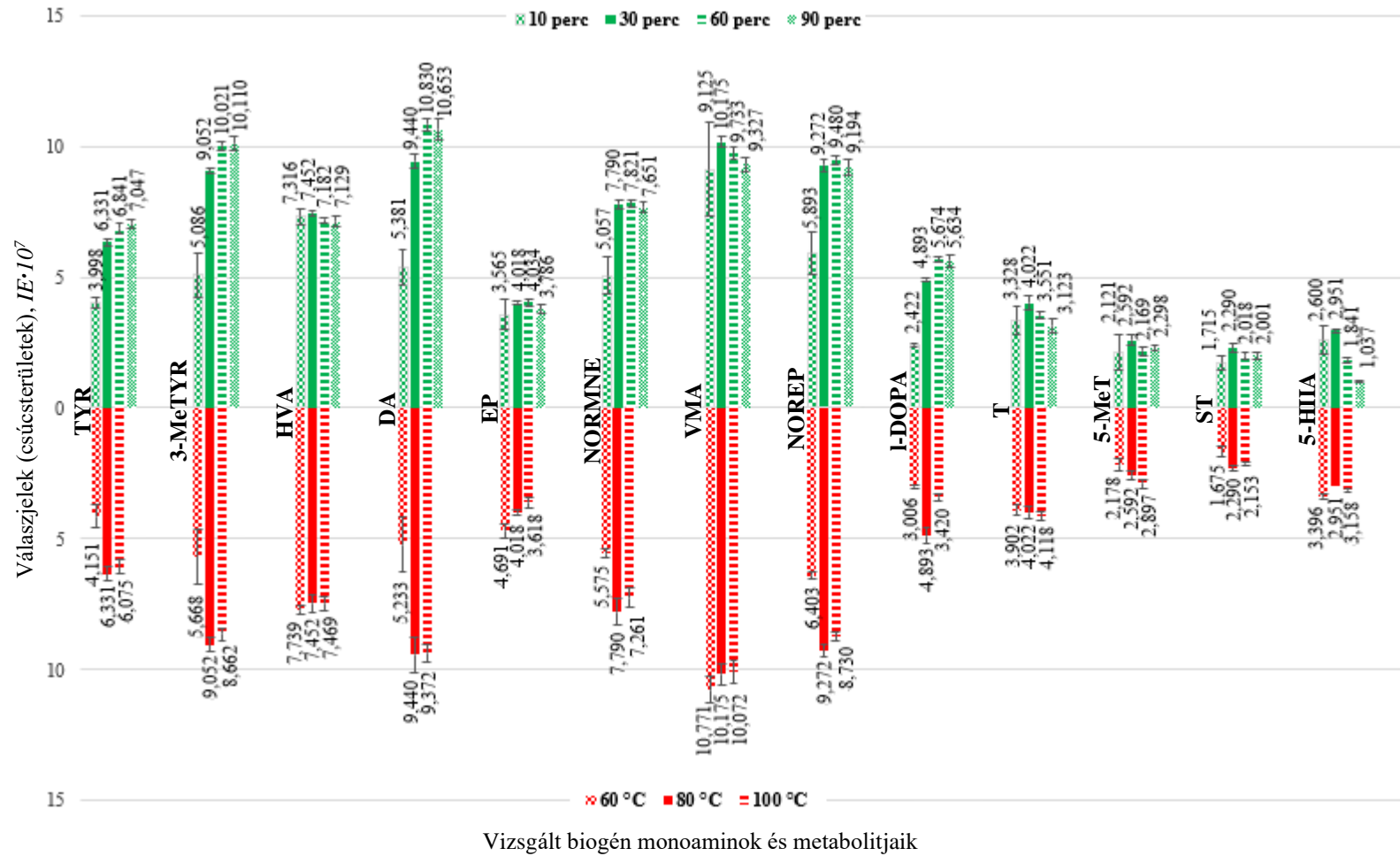
Jelölések: {} = számított elvi *m/z* tömeg, ami a tömegspektrumban nem jelenik meg

14. táblázat BMA metabolitok TMS-észter származékainak retenciós ideje, fragmentációja és tömegspektrumai

Célvegyület Retenciós idő (t_R), perc	[M] ⁺ Szelektív fragmentum ion (SFI), m/z	Tömegspektrum
homovanillinsav 9,85	[M] ⁺ 326; [M-15] 311; [M-30] 296 $209-30 = 179$ 	
vanillil-mandulasav 11,81	[M] ⁺ 414; [M-15] 399 	
5-hidroxi-indolecetsav 16,98	[M] ⁺ 335; [M-15] 320 	

4.2.4.3 A származékképzési módszer optimalizálása a reakcióidő és a hőfok tekintetében

A reagensek optimális arányát kutatócsoportunk korábban már részletesen vizsgálta [6] és az AS-ak acilezett és szililezett származékainak képzésére is sikeresen alkalmaztam, ezért BMA-ok reakciójánál is ezt a reagensösszetételt használtam. A reakciókörülmények optimalizálásakor az időt 10, 30, 60 és 90 perc között változtattam, miközben a hőfokot 80 °C-on tartottam. A hőfok vizsgálatánál 30 percig reagáltattam a vegyületeket 60, 80 és 100 °C-on. A válaszjeleket a 22. ábra alapján hasonlítottam össze, melyek szerint optimális reakciókörülménynek a 80 °C 30 percet választottam, ami megegyezik az AS-aknál választott körülménnyel. A mérések szórását az ábrán hibásávokkal jelölöm, az RSD%-ok 1,19-8,6% közöttiek voltak.



22. ábra BMA-ok egy lépés származékképzésének optimalizálása, a reakcióidő és a -hőfok tekintetében, a válaszjelek összehasonlítása

4.2.4.4 A módszer teljesítményjellemzőinek vizsgálata standard oldatban és vizeletben

Az optimalizált módszerrel származékká alakított vegyületek linearitását hat pontos kalibrációval (10, 50, 100, 500, 1000 pg/injektálás) 16-2200 ng/ml származék koncentráció tartományban vizsgáltam (3.5 fejezet). A kiértékelésnél a FS módban gyűjtött adatokat az egyes vegyületek 13. táblázatban és 14. táblázatban ismertetett SFI-jaira szűrtem. A linearitás (R^2) 0,991-0,999 között változott 3,88-6,4 RSD% ismételhetőség mellett. A napon belüli és napok közötti ismételhetőség 92-106 és 95-110% közötti volt. A módszer főbb teljesítményjellemzőinek adatait standard oldatban a 15. táblázat mutatja.

Mátrixban (vizelet1) szintén meghatároztam a teljesítményjellemzőket (16. táblázat) standard addícióval a 3.5 fejezet alapján. A mintaelőkészítésnél a közvetlen származékképzés módszerét alkalmaztam, a vizeletet és a hozzájuk adott standard oldatokat együtt vákuumbepárlón tömegállandóságig szárítottam, majd a 3.4.4 pont szerint reagáltattam a reagensekkel és az oldatból 1 μ l-t injektáltam. A zavaró csúcsok kiszűrésére vak-oldatot (csak a reagenseket tartalmazta) és a vizeletet önmagában, addíció nélkül is vizsgáltam. Az esetleges mátrix hatás megállapításához és a visszanyerés számolásához a standard oldatok megfelelő mennyiségét mátrix jelenléte nélkül is származékká alakítottam. Az eredményeket az FS-üzemmódban rögzített adatok, SFI-ok szerinti extrahálásával értékeltem.

15. táblázat BMA-ok és metabolitjainak egy lépéses származékká alakításának és GC-MS meghatározásának teljesítményjellemzői standard oldatban

Cél- vegyület	Linearitási tartomány		Egyenes egyenlete	R ²	RSD %	Pontosság, % (RSD%)	
	pg/ injektálás	ng/ml				Napon belüli	Napok közötti
Tiramin	9-876	18-1752	$y = 0,0104x - 0,0539$	0,991	6,4	100 (2,30)	101 (2,59)
3-metoxi- TYR	10-1014	20-2018	$y = 0,0127x + 0,0310$	0,997	5,9	99 (0,60)	97 (2,38)
Homo- vanillinsav	11-1100	22-2200	$y = 0,0103x + 0,1624$	0,997	5,5	102 (1,41)	97 (0,96)
Dopamin	8-838	16-1676	$y = 0,0148x + 0,2538$	0,993	4,58	92 (2,63)	108 (8,4)
Epinefrin	103-1033	206- 2066	$y = 0,0035x - 0,1821$	0,998	6,2	103 (1,99)	104 (0,61)
Norme- tanferin	10-962	20-1932	$y = 0,0107x + 0,2316$	0,995	5,7	98 (5,6)	102 (4,09)
Vanillil- manulasav	10-953	20-1906	$y = 0,0149x + 0,1140$	0,996	4,50	106 (4,09)	110 (3,13)
Norepi- nefrin	9-884	18-1768	$y = 0,0142x + 0,1786$	0,996	5,5	97 (2,40)	95 (3,65)
l-DOPA	10-1022	20-2044	$y = 0,0073x + 0,0609$	0,998	5,6	101 (3,23)	102 (3,97)
Triptamin	89-889	178- 1778	$y = 0,0012x + 0,0003$	0,999	5,6	97 (3,12)	108 (3,56)
5-metoxi- triptamin	49-972	98-1944	$y = 0,0033x - 0,0290$	0,999	4,03	99 (1,33)	104 (3,09)
Szerotonin	51-1026	102- 2052	$y = 0,0006x - 0,0017$	0,999	3,88	100 (0,80)	99 (2,00)
5-hidroxi- indol- ecetsav	52-1036	104- 2072	$y = 0,0018x + 0,0037$	0,993	5,7	101 (1,17)	103 (1,26)

Jelölések: y = csúcsterület (integrátor egység, $IE \cdot 10^7$); x = injektált standard mennyisége, pg; a ng/ml értékek a származékok koncentrációjára vonatkozik, ami a pg/injektálás értékekből számolható

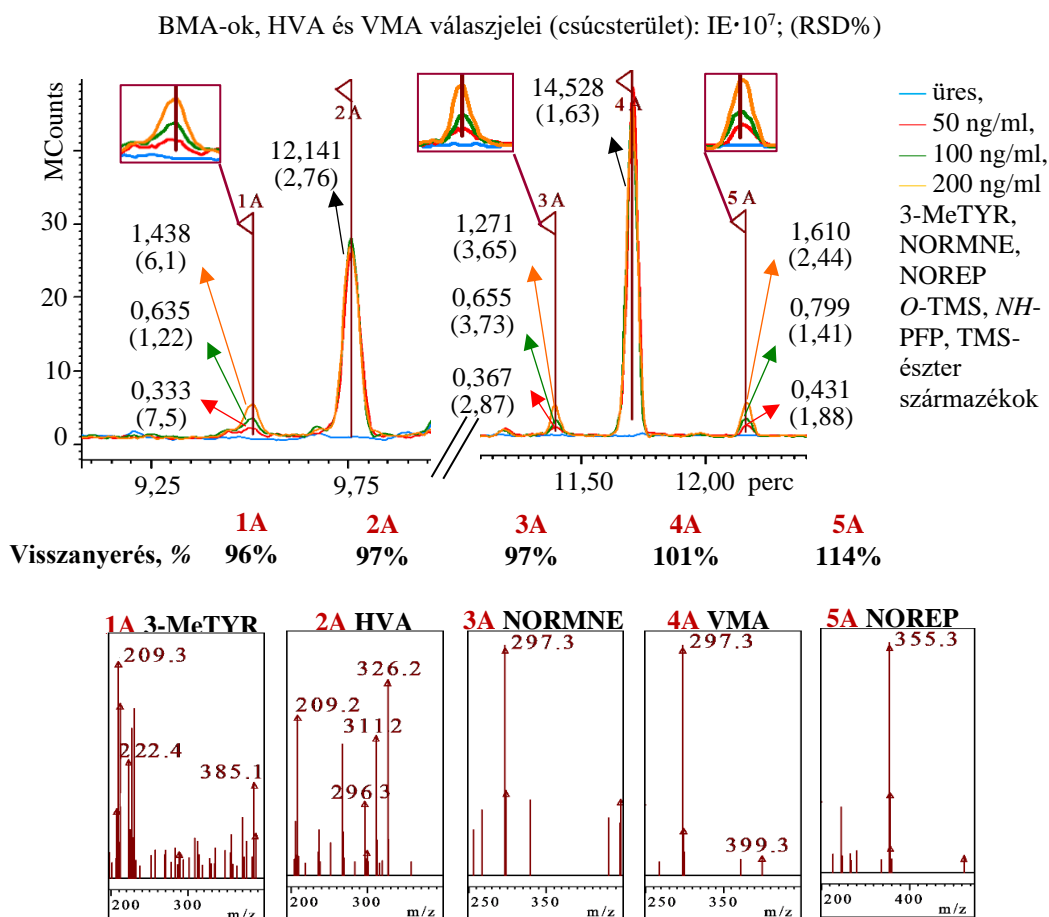
16. táblázat BMA-os és metabolitjainak egy lépéses származékká alakításának és GC-MS meghatározásának teljesítményjellemzői vizeletben

Cél- vegyület	Linearitási tartomány		Egyenes egyenlete	R ²	RSD %	Pontosság, % (RSD%)		Visszanyerés *, %
	pg/ injektálás	ng/ml				Napon belüli	Napok közötti	
						ismételhetőség		
Tiramin	21-680	42-1360	$y = 0,0073x - 0,0316$	0,992	8,6	100 (1,45)	100 (5,1)	92
3-metoxi- TYR	26-824	52-1648	$y = 0,0076x + 0,1888$	0,999	8,0	89 (1,10)	92 (8,0)	96
Homo- vanillinsav	28-901	56-1802	$y = 0,0077x - 0,2001$	0,982	7,5	100 (3,03)	104 (5,1)	97
Dopamin	22-696	44-1392	$y = 0,0088x - 0,0382$	0,997	6,9	99 (4,22)	103 (2,06)	102
Epinefrin	54-861	108-1722	$y = 0,0021x - 0,0477$	0,989	7,4	92 (7,8)	113 (4,14)	108
Norme- tanferin	23-743	46-1486	$y = 0,0073x + 0,1344$	0,989	7,9	99 (5,4)	94 (4,12)	97
Vanillil- manulasav	27-850	54-1700	$y = 0,0119x - 0,2052$	0,991	7,1	96 (2,83)	100 (3,01)	101
Norepi- nefrin	23-729	46-1458	$y = 0,0097x + 0,0984$	0,998	7,3	99 (3,83)	103 (1,43)	114
l-DOPA	29-458	58-916	$y = 0,0043x + 0,0242$	0,989	9,1	96 (4,11)	89 (3,27)	94
Triptamin	43-432	86-864	$y = 0,0027x - 0,0096$	0,991	4,68	93 (2,17)	95 (4,59)	96
5-metoxi- triptamin	54-861	108-1722	$y = 0,0017x - 0,0469$	0,985	9,5	102 (6,1)	96 (10,4)	94
Szerotonin	23-731	46-1462	$y = 0,0021x + 0,3406$	0,998	6,5	93 (0,29)	100 (5,9)	104
5-hidroxi- indol- ecetsav	54-430	108- 860	$y = 0,0062x + 0,0255$	0,986	6,7	98 (1,71)	97 (1,86)	99

Jelölések: y = csúcsterület (integrátor egység, $IE \cdot 10^7$); x = injektált standard mennyisége, pg; a ng/ml értékek a származékok koncentrációjára vonatkozik, ami a pg/injektálás értékekből számolható; * = a visszanyerést a standard oldatokban és a vizeletben mért válaszjelek aránya alapján számoltam

4.2.4.5 BMA-ok és metabolitjainak együttes mérése vizeletben egylépéses származékképzéssel

A kidolgozott módszer gyakorlati alkalmazhatóságának bizonyítására először egészséges önkéntes vizeletéhez (vizelet1) standard addícióval adtam a 3-MeTYR, a NOREP, a NORMNE, a HVA és a VMA vegyületeket, oly módon, hogy azok koncentrációja egy valós beteg vizeletet képviseljen, vagyis a metabolit savak nagy feleslegben legyenek a BMA-okhoz képest (23. ábra). Ezért a VMA és a HVA koncentrációját minden mérésnél 1000 pg/injektálás értéknek választottam, míg a BMA-ok mennyiségét 25, 50 és 100 pg/injektálásnak, ami 50, 100 és 200 ng/ml koncentrációjú származéknak felel meg.

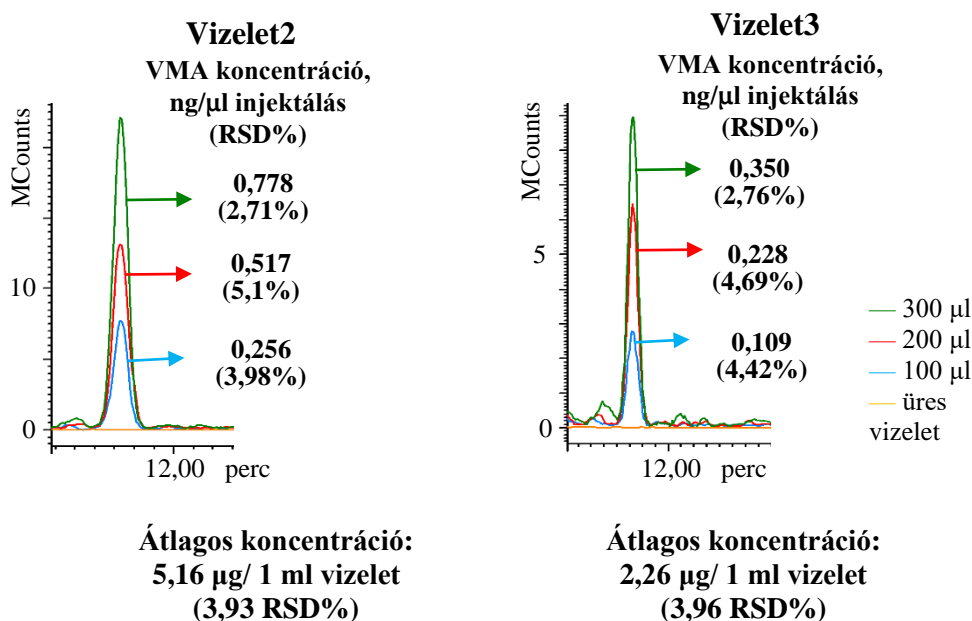


23. ábra 3-MeTYR, NOREP és NORMNE meghatározása 100 μ l vizeletben nagy feleslegű (1000 pg/injektálás) HVA és VMA jelenlétében standard addíciós módszerrel

A vizelet mennyisége 100 µl volt. A származékká alakítást, a mérést és a kiértékelést a 3.4.4 és 4.2.4.4 fejezetekben ismertetettek szerint végeztem. Az esetleges mátrix hatás vizsgálatát az állandó koncentrációjú HVA és VMA szolgálta. A mérések alatt a válaszjelük állandónak bizonyult, a standard oldathoz képest 97% és 101%-os visszanyeréssel mértem, megfelelő ismételhetőséggel (RSD%): HVA 2,76% és VMA 1,63%. Az eredmények alapján nincs mátrix hatás a származékképzést követő GC-MS meghatározásoknál. A három BMA visszanyerése (96-114%) és ismételhetősége (1,21-7,5%) jól egyezik a korábbi méréseinkkel, a pontos adatokat a 23. ábra mutatja.

4.2.4.6 Betegek vizeletének elemzése a közvetlen egy lépéses származékképzéssel

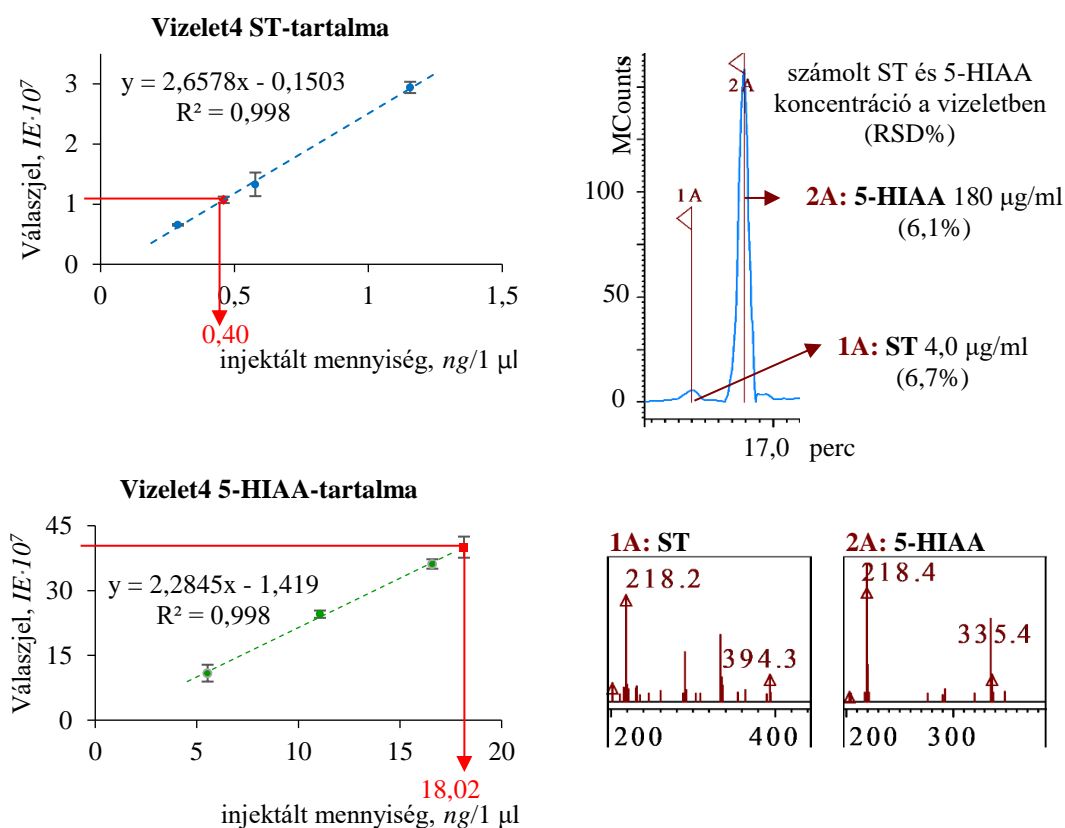
A vizsgálatokhoz három neurológiai-/anyagcserezavarral diagnosztizált beteg vizelete (vizelet2-4) állt rendelkezésemre. A vizelet2 és vizelet3 mintákban a mért AS-ak mellett (4.2.3.1 fejezet, 18. ábra) nagy mennyiségű VMA-t (24. ábra), míg a vizelet4-ben 5-HIAA mellett ST-t (25. ábra) azonosítottam.



24. ábra Vizelet2-3 mintákban azonosított VMA mennyiségi meghatározása közvetlen származékká alakítással HMDS & PFPA reagenspárral

A kidolgozott eljárás arányosságát a vizelet2-3 mátrix jelenlétében 100, 200 és 300 µl vizelet bepárlásával és a 3.4.4 szerinti származékká alakítást követően vizsgáltam (3.5

fejezet). A VMA mennyiségét külső kalibrációval számoltam, ami 5,16 és 2,26 $\mu\text{g}/1\text{ ml}$ vizelet értéknek adódott 3,93 és 3,96 RSD% mellett. A három különböző mennyiségű vizeletben mért koncentrációkat a 24. ábra mutatja. A ST és 5-HIAA mennyiségét a VMA-hoz hasonlóan számoltam. A koncentrációkban tapasztalt nagy különbségek miatt a kalibrációt eltérő, 0,1 mg/ml ST és 1,0 mg/ml 5-HIAA, koncentrációjú oldatokkal készítettem. A származékká alakítást 200 μl vizelet bepárlását követően végeztem. A biológia minta mennyiségét a ST előzetes mérések alapján becsült koncentrációjához igazítottam. A ST mennyisége 4,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (6,7% RSD), az 5-HIAA-jé 180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (6,1% RSD) volt (25. ábra). A mért sav mennyisége a határérték, átlagosan 2000 ml/24 óra vizelettel számolva, több, mint negyvenszerese.



25. ábra ST és 5-HIAA meghatározása a vizelet4 mintában külső kalibrációs módszerrel

5. Megbeszélés

5.1 Növényi kannabinoidok mennyiségi meghatározása trimetilszilil származékokként mátrixaik jelenlétében

A KNBD-ok mérését megelőző mintaelőkészítés kidolgozásánál fontos szempont a minták sokfélesége. A kannabisz hatóanyagtartalmát a termesztés helye és ideje, a talaj tápanyag-tartalma együttesen határozzák meg. Eltérés mutatkozhat a szabadban és a beltéren tartott növények hatóanyag-tartalma között [168]. A KNBD, különösen a pszichoaktív THC tartalom a női virágzó példányokban a legmagasabb, ezen belül is a virágzó hajtásokban. Ezenkívül az ipar a CBD-ban gazdag kendermagot és olajat is nagy mennyiségben használja.

Az orvosi és gyógyászati célra termesztett kender THC-tartalmát legtöbbször szabályozzák és hatóanyagtartalom szerinti kategóriákba sorolják [169]. A THC tartalom ezekben a fajtákban 6-19%. Hazekamp kémiai profil alapján kategorizált 460 Hollandiában gyűjtött kendert. A kutatásban terpének és negyvenhat KNBD koncentrációját mérték [170]. Az orvosi célokra is alkalmazott *C. indica* és *C. sativa* fajoknál jelentős mennyiségű THC-t, 127-137 mg/g-ot mértek. A vadkenderben a fő hatóanyagok: CBD és THC mennyisége $10,9 \pm 9,5$ és $3,53 \pm 5,40$ mg/g volt. Ehhez képest a CBC $0,64 \pm 0,56$ mg/g és a CBG $0,28 \pm 0,38$ mg/g értéke egy nagyságrenddel kisebb volt. Egy szlovén kutatócsoport a Magyarországon előforduló ipari kender CBD-tartalmát 1,5-3% (m/m %) körüli értéknek találta [171]. PhD-munkám során olyan új, extrakció nélküli, közvetlen trimetilszilil származékképzési eljárást dolgoztam ki, melyben a korábban még kannabinoidok szililezésére nem alkalmazott HMDS reagens szerepel TMS-donorként. Ezzel az eljárással a *C. ruderalisra* jellemző alacsony hatóanyag tartalom is mérhető. Ezt a *C-rd1* és *C-rd2* minták KNBD-tartalmának meghatározásával igazoltam. A *C-rd1* fő hatóanyagainak, a CBD-nek és a CBN-nek, a koncentrációja: 4,4 és 6,6 mg/g volt. A CBC ennél alacsonyabb, 1,3 mg/g mennyiségben volt a növényben. A későbbi időpontban gyűjtött *C-rd2* KNBD-profilja és -tartalma alacsonyabb volt, mint a *C-rd1*-é. Legnagyobb, 0,46 mg/g mennyiségben CBD-t, legkisebb, 0,19 mg/g koncentrációban CBG-t tartalmazott. A CBC mért értéke 0,27 mg/g volt. A meghatározott KNBD mennyiségek nagyságrendileg összhangban vannak a Hazekamp és a szlovén kutatók által vadkenderben mért hatóanyag-tartalommal.

5.2 Egylépéses acilezés és szililezés a HMDS/PFKS reagenspárral

A HMDS amellet, hogy sokoldalú szililező reagens, kutatócsoportunk eddig nem ismert, szelektív acilező tulajdonságát is bizonyította [6]. A primer fenilalkil-aminokkal végzett kutatás alapján azt feltételeztük, hogy az aromás gyűrű jelenléte szükséges az aminocsoportok acilezett származékokká alakításához, mivel az alifás aminok (pl. spermin, spermidin, kadaverin és putreszcin) nem reagáltak a HMDS&TFA reagenspárossal. Az AS-ak acilezésekor azonban az aromás gyűrű jelenléte nélkül is képződtek perfluoracil származékok. Ezen felül a karboxilcsoportok aktív hidrogén-atomja TMS-csoporttal szubsztituálódott. A HMDS egyidejű kettős szerepe a származékképzésben újdonság. A kutatási eredményeim alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a gyűrű szerepét egy szililezhető funkciós csoport jelenléte is kiválthatja, ami az aminocsoport bázikusságának csökkentésével elősegíti a hidrogén-atom szubsztitúcióját perfluoracil-csoporttal.

A kidolgozott származékképzési módszer jól alkalmazható étrend-kiegészítő és vizeletminta célvegyület-tartalmának meghatározására. Nagyobb molekulák, úgymint a négy vagy több tagú peptidek mérése kiegészítő mintaelőkészítést igényel. Három különböző tetrapeptiddel végeztem kísérletet: ASAA (Ala-Ser-Ala-Ala), SKWS (Ser-Lys-Trp-Ser) és SWES (Ser-Trp-Glu-Ser). Oldás és közvetlen származékká alakítás után egyik sem volt mérhető az alkalmazott kromatográfias rendszerben. Ezért a mintaelőkészítés első lépéseként sósavas hidrolízist alkalmaztam, mely az alkotó AS-akra bontotta a mintát. A hidrolizált peptidek AS összetétele szárazra párlást és származékképzést követően mérhető volt. A módszer alkalmazható nagyobb tagszámú peptidláncok meghatározására is. Ezt a kutatómunkában az ATE és ETA peptidek GC-MS meghatározásakor bizonyítottam.

Az egylépéses TMS-perfluoracil származékok képzését nemcsak karboxil- és aminocsoport, hanem a hidroxilcsoport szilileződése is segíti, ahogy azt az AA-ok, az AmG1 és a BMA-ok példáján is bemutattam. A HMDS/PFKS párossal végzett reakció a BMA-oknál kiváltja a szakirodalomból megismert kétlépéses származékképzést, mely nagyon érzékeny az alkalmazott körülményekre [142-144]. Az első lépésben a szililezést alacsony hőfokon öt-tíz percig végezték, ezzel védték ki az aminocsoportok szilil-származékká alakulását. A módszert reprodukálva azt tapasztaltuk, hogy az alacsony

hőfok és rövid reakcióidő nem elegendő a szilil-származékok kialakításához, az első lépést (szililezést) követően injektálva az oldatot a kromatogramon és a tömegspektrumban nem észlelhetők a TMS-származékok. További érdekesség, hogy ilyen körülményeket alkalmazva a primer aminocsoporttal nem rendelkező, tehát nem acilezhető EP csúcsa sem detektálható. A második lépés (acilezés) után azonban megjelennek a BMA-ok az *O*-TMS-NH-HFB termékek és a tri-*O*-TMS-EP is. A mintához az egy lépésben adott HMDS-sel és PFKS-val elkerülhető az oldatok többszöri melegítése és lehűtése. A szekunder amin EP is származékká alakítható a reagenseleggyel, azonban ilyenkor csak a hidroxilcsoportok szilileződnek. Az EP triTMS-származék válaszjele jóval kisebb, mint az acilezett-szililezett BMA-származékoké.

A BMA-ok leggyakoribban vizsgált forrása a diagnosztikában a vizelet, aminek nagy előnye, hogy non-invazív módon gyűjthető. A BMA-kat jellemzően a huszonnégy órán keresztül sósavra gyűjtött vizeletből mérik. Az alkalmazott sav töménysége nincs egységesen szabályozva, koncentrációja általában 2-6 N közötti. Figyelembe véve az irodalmi előzményeket [142] és a saját tapasztalataimat (ld. 4.2.4.1 és 5. fejezet) ez nem egy ideális választás. A kezdeti minta „epinefrin”- (EP, NOREP, NORMNE) és „triptamin”-tartalma (T, 5-MeT, ST) csökkenhet, míg a sav hígulással eléri a 0,27 mM koncentrációt, ami megtévesztő eredményhez vezethet. Ezeket a szempontokat szem előtt tartva érdemes lenne a mintagyűjtésre vonatkozó protokollt megújítani és szabályozni.

A BMA-ok és metabolitjaik az egészséges emberek vizeletében is előfordulnak, jelenlétük nem feltétlenül utal kóros elváltozásra. A diagnosztikában a huszonnégy óra alatt gyűjtött vizeletre vonatkoztatott biogén amin koncentráció a meghatározó. A klinikai gyakorlatban alkalmazott határtérték az EP-re és NOREP-re a legalacsonyabb 20–100 µg/24 óra. A DA-hoz, a NORMNE-hez és a 3-MeTYR-hoz tartozó referencia koncentráció egy nagyságrenddel nagyobb, 400-550 µg/24 óra. A metabolit savak 6–8 mg/24 óra tartomány fölött jelezhetik a kóros elváltozást. Nőknél és gyerekeknél ezek a határértékek alacsonyabbak is lehetnek. A vizsgált minták egy nap alatt gyűjtött térfogata nem állt rendelkezésemre, ezért átlagosan 2000 ml/24 óra vizelettel számoltam. A vizelet₂ a 8 mg/24 óránál magasabb (10,3 mg/24 óra), míg a vizelet₃ az alatti (4,5 mg/24 óra) VMA-t tartalmazott. A vizelet magas VMA szintje egy tumoros megbetegedést, a neuroblasztomát mutathatja ki, míg a magas 5-HIAA tumorra, karcinogénre és nem karcinogénre egyaránt, továbbá cisztás fibrózisra és felszívódási zavarra is utalhat. A

vizsgált vizelet⁴ minta metabolit sav sokkal magasabbnak adódott, mint a referencia tartomány felső értéke. Az egészségi állapot mellett a mért értékeket a vizsgálat előtti napokban fogyasztott élelmiszerek (sajt, gyümölcsök, avokádó, paradicsom, padlizsán és bizonyos csonthéjasok) és gyógyszerek (aspirin, acetaminofen, antihisztaminok és antidepresszánsok) is befolyásolják. A vérben vagy vizeletben mért magas AS tartalom különféle metabolikus zavarok és az elégtelen veseműködés indikátora lehet [172]. A biológia minták műszeres elemzése fontos része a betegség megállapításának, azonban a diagnózis felállítása mindenképpen orvosi kompetenciát és a panaszok, tünetek és vizsgálati eredmények együttes figyelembevételét igényli. E betegségek egy része kezelhető megfelelő diétával, étrend-kiegészítőkkel és gyógyszeres terápia alkalmazásával.

Az étrend-kiegészítők vitamin és ásványi anyag, valamint makrotápanyag-tartalmát és a gyártáshoz felhasználható alapanyagok listáját a 37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet és az élelmiszerkönyv előírásai szabályozzák. Az étrend-kiegészítők AS-tartalma nem esik a szabályozása hatálya alá, de ezen összetevőkre is alkalmazhatók az általános irányelvek. A termékeket forgalomba hozatalkor be kell jelenteni a hatóságnál. A készítmények előállítása, minőség ellenőrzése, csomagolása, tárolása és forgalmazása során a Veszélyelemzés és Kritikus Ellenőrzőpontok (HACCP) alapelveire épülő eljárásokat kell alkalmazni és fenntartani. A termékeken feltüntetett hatóanyagok mennyiségének a gyártó által elvégzett vizsgálatokon alapuló átlagértékeknek kell lennie. Az irányelvek alapján a fő összetevők (-20)-(+50)%-kal térhetnek el a csomagoláson feltüntetett értéktől. A PhD-munkában vizsgált BCAA-minta AS-tartalma megfelelt ennek a kritériumnak. A minimális „hatóanyag” tartalom mellett fontos a felső határérték megállapítása is, hiszen ezen termékeket általában egy normál étrend kiegészítéseként fogyasztják a vásárlók, így fennállhat a túladagolás veszélye.

6. Következtetések

Kutatásom első lépéseként átfogó származékképzési tanulmányt készítettem, melyben a legismertebb szililező reagensek (HMDS, BSTFA, MSTFA és MTBSTFA) és a katalizátorok hatását vizsgáltam növényi KNBD-ok származékképzésére azonos kromatográfiás rendszerben. Megállapítottam, hogy a KNBD-ok trimetilszilil származékokká alakítására a korábban még ilyen célra nem alkalmazott HMDS a legmegfelelőbb választás. Egy rövid, tizenhárom perces programban választottam el öt növényi KNBD-ot és a két fő metabolitot. Extrakció nélküli, közvetlen származékképzést követően mértem két kenderminta hatóanyagtartalmát a mátrixaik jelenlétében.

A HMDS acilező tulajdonságát PFKS jelenlétében, melyet kutatócsoportunk ismert fel, bővítettem egyidejű szililezéssel. A módszerrel elsőként alakítottam az AS-akat, az AA-okat, a DiAHA-t, az oligopeptidek és a BMA-okat egy lépésben acilezett-szililezett származékokká. Az új eljárást BCAA étrend-kiegészítő AS-tartalmának meghatározására és neurológiai vagy anyagcsere rendellenességgel diagnosztizált betegek vizeletének elemzésére hasznosítottam. A reagenspár PFKS tagjának optimalizálásával elválasztottam a BMA-okat savas bomlástermékeiktől. A módszerrel vizelet minták BMA-tartalmát mértem nagy feleslegű savas metabolit jelenlétében. A mintaelőkészítés főbb teljesítményjellemzőit meghatároztam standard oldattal és mátrix jelenlétében is. Felismertem az oldószer jelentőségét a törzsoldatkészítésben. Új mintagyűjtési protokoll bevezetésére tettem javaslatot. A szakirodalomból megismert időigényes, savas és semleges frakciókat külön gyűjtő eljárást egyszerűsítettem, a KNBD-okat, AS-akat és BMA-okat mátrixaik jelenlétében alakítottam származékká GC-MS meghatározásukat megelőzően.

7. Összefoglalás

Új mintaelőkészítési technikákat dolgoztam ki a biológiailag aktív vegyületek, a KNBD-ok, az AS-ak és a BMA-ok HMDS-sel képzett származékaiknak GC-MS meghatározásához. A kannabinoidok származékképzési tanulmányában a HMDS szililező tulajdonságát hat másik reagenssel hasonlítottam össze öt növényi KNBD és két bomlástermék, semleges és savas vegyületek, egyidejű mennyiségi mérésekor. A vegyületek elválasztására egy gyors, mindösszesen tizenhárom perces programot használtam. A HMDS és a TFA, amelyeket még eddig nem használtak a KNBD-k származékká alakításához, ideális választásnak bizonyultak.

Új szelektív és kvantitatív analitikai eljárást mutattam be, amely az AS-ak, az AA-ok, az AmGI, a DiAHA, az oligopeptidek és a BMA-ok teljes származékká alakítását egyetlen lépésben extrakció nélkül biztosítja. Ennek az új módszernek az alapja a HMDS és a PFKS párok egyedi reakcióképessége. A PFKS optimalizálásával először alkalmaztam egylépéses acilezést és szililezést a BMA-ok és savas metabolitjaik elválasztására, valamint szelektív, közvetlen kvantitatív meghatározására, egyetlen GC-MS mérésben.

Az extrakció nélküli származékképzés gyakorlati használhatóságát közvetlen mintaelőkészítési technikával igazoltam. A szárított növényi szövetek KNBD-tartalmát, az étrend-kiegészítő, valamint a vizelet AA- és BMA-koncentrációját a mátrix jelenlétében mértem. Az analitikai teljesítmény-jellemzőket mind a modelloldatokban, mind a vizeletmátrixokban meghatároztam. Az új módszer alkalmazásával elkerülhető a célvegyületek vesztesége (idő- és munkaigényes extrakciós lépések nélkül alkalmazható), ami gyors, szelektív, érzékeny, idő-, munka-, költség- és oldószer-hatékony munkastratégiát eredményez a zöld kémiai követelményeknek megfelelően.

8. Summary

New sample preparation techniques have been developed for the GC-MS determination of biologically active compounds, such as cannabinoids, amino acids, biogenic monoamines and for their metabolites as their HMDS-derivatives. In the derivatization study of cannabinoids, the silylating properties of HMDS have been compared with six other reagents in the simultaneous quantitative measurement of five plant KNBDs and two metabolites, both neutral and acidic compounds. A fast program, only thirteen minutes long, has been applied to separate the compounds. HMDS and TFA, which have never been used for derivatization of the KNBDs, have proven to be an ideal choice.

A new selective and quantitative analytical method has been presented that ensures the conversion of amino acids, amino alcohols, amino sugars, amino carboxylic acids, oligopeptides (di- and tripeptides), and BMAs to complete derivatives in a single step without extraction. The basis of this new method is associated with the unique reactivity of the HMDS and perfluorocarboxylic acid reagent pairs. By optimizing the associated perfluorocarboxylic acid's selection, one-step acylation and silylation was first applied to separate BMAs from their corresponding acidic metabolites. Compounds were quantified selectively in a single GC-MS run.

The practical utility of extraction free derivatization was verified by direct sample preparation technique. The cannabinoid content of the dried plant tissues, the amino acid concentrations of the dietary supplement and the urine, and the amount of the biogenic monoamines in biological samples were measured in the presence of the matrix. Analytical performance characteristics were determined both in model solutions and in urine matrices. The loss of target compounds is avoided by the new method (it is applicable without time and work consuming extraction steps), resulting in a fast, selective, sensitive, time-, labour-, cost-, and solvent-effective working strategy, corresponding to the green chemical requirements.

9. Irodalomjegyzék

- [1] Bartle, K.D., P. Myers (2002) History of gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21: 547-557.
- [2] Moldoveanu, S., V. David, Derivatization methods in GC and GC/MS, in *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*, P. Kusch, Editor. 2019, IntechOpen. p. 1-26.
- [3] Kremmer, T., K. Torkos, Származékképzési eljárások az elválasztástechnikában, in *Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata*. 2010, Akadémiai Kiadó: Magyarország. p. 205-212.
- [4] Osthoff, R.C., S.W. Kantor, Organosilazane compounds, in *Inorganic Syntheses*. 2007, John Wiley & Sons: Hoboken. p. 55-64.
- [5] Brochmann-Hanssen, E., A.B. Svendsen (1962) Separation and identification of sympathomimetic amines by gas-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51: 938-941.
- [6] Molnár, B., A. Csámpai, I. Molnár-Perl (2015) Hexamethyldisilazane as an acylation generator for perfluorocarboxylic acids in quantitative derivatization of primary phenylalkyl amines confirmed by GC/MS and computations. *Analytical Chemistry*, 87: 848-852.
- [7] Molnár, B., B. Fodor, I. Boldizsár, I. Molnár-Perl (2015) Quantitative silylation speciations of primary phenylalkyl amines, including amphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine prior to their analysis by GC/MS. *Analytical Chemistry*, 87: 10188-10192.
- [8] (UNODC), U.N.O.o.D.a.C. https://www.unodc.org/doc/wdr2016/WDR_2016_Chapter_1_Cannabis.pdf. [cited 2020. 06.13.].
- [9] Statista. Estimated number of cannabis users worldwide from 2010 to 2018. [cited 2020. 08.14.]; Available from: <https://www.statista.com/statistics/264734/number-of-cannabis-users-worldwide-by-region/>.
- [10] Fókuszpont, N.D. <https://drogfokuszpont.hu/wp-content/uploads/K%C3%A1b%C3%ADt%C3%B3szer%C3%BCgyi-helyzetk%C3%A9p.pdf>. [cited 2020. 06.13.].
- [11] Cardenia, V., T.G. Toschi, S. Scappini, R.C. Rubino, M.T. Rodriguez-Estrada (2018) Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for

the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *J. Food Drug Anal.*, 26: 1283-1292.

[12] Gyires, K., Z. Fürst, Kábítószer-abúzus. Élvezeti szerek, in *A farmakológia alapjai*. 2011, Medicina Könyvkiadó Zrt.: Budapest. p. 601-602.

[13] de Oliveira, G.L., M.H. Voloch, G.B. Sztulman, O.N. Neto, M. Yonamine (2008) Cannabinoid contents in cannabis products seized in Sao Paulo, Brazil, 2006-2007. *Forensic Toxicol.*, 26: 31-35.

[14] Mechoulam, R. (2005) Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *British Journal of Pharmacology*, 146: 913-915.

[15] Orrin Devinsky, E.T., Linda Laux, Daniel Friedman, Anup Patel, Judith Bluvstein, Michael Chez, Charuta Joshi, Roberta Cilio, Francis Filloux, Evan Fertig, Angus Wilfong, Paul D. Lyons, Yong Park, Robert Flamini, Matthew Wong, Ian Miller, Eric Marsh. Efficacy and safety of Epidiolex (cannabidiol) in children and young adults with treatment-resistant epilepsy: update from the expanded access program. [cited 2020 08.14.]; Available from: https://www.aesnet.org/meetings_events/annual_meeting_abstracts/view/2414222.

[16] Huestis, M.A., A. Barnes, M.L. Smith (2005) Estimating the time of last cannabis use from plasma delta(9)-tetrahydrocannabinol and II-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol concentrations. *Clin. Chem.*, 51: 2289-2295.

[17] Huestis, M.A., M. ElSohly, W. Nebro, A. Barnes, R.A. Gustafson, M.L. Smith (2006) Estimating time of last oral ingestion of cannabis from plasma THC and THCCOOH concentrations. *Ther. Drug Monit.*, 28: 540-544.

[18] Karschner, E.L., D.M. Schwoppe, E.W. Schilke, R.S. Goodwin, D.L. Kelly, D.A. Gorelick, M.A. Huestis (2012) Predictive model accuracy in estimating last delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) intake from plasma and whole blood cannabinoid concentrations in chronic, daily cannabis smokers administered subchronic oral THC. *Drug Alcohol Depend.*, 125: 313-319.

[19] Wisniak, J. (2013) Pierre-Jean Robiquet. *Educación Química*, 24: 139-149.

[20] Ádám, V., A kémiai idegingerület átvitel (neurotranszmisszió) molekuláris alapjai, in *Orvosi biokémia*. 2006, Medicina: Budapest. p. 540-546.

[21] Emery, P.W., Amino acids: Metabolism, in *Encyclopedia of Human Nutrition*. 2012. p. 72-78.

- [22] Pinto, M.C.X., M.J.N. de Paiva, O.C. Oliveira-Lima, H.C. Menezes, Z.D.L. Cardeal, M.V. Gomez, R.R. Resende, R.S. Gomez (2014) Neurochemical study of amino acids in rodent brain structures using an improved gas chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 55: 24-37.
- [23] Shatla, H.M., H.Y. Tomoum, S.M. Elsayed, I.A. Elagouza, R.H. Shatla, M.M. Mohsen, A.N. Hamed (2014) Role of plasma amino acids and urinary organic acids in diagnosis of mitochondrial diseases in children. *Pediatric Neurology*, 51: 820-825.
- [24] Canfield, C.-A., P.C. Bradshaw (2019) Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases. *Translational Medicine of Aging*, 3: 70-89.
- [25] Tournissac, M., M. Vandal, C. Tremblay, P. Bourassa, S. Vancassel, V. Emond, A. Gangloff, F. Calon (2018) Dietary intake of branched-chain amino acids in a mouse model of Alzheimer's disease: Effects on survival, behavior, and neuropathology. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 4: 677-687.
- [26] Blau, N., J.B. Hennermann, U. Langenbeck, U. Lichter-Konecki (2011) Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104: S2-S9.
- [27] Eisenhofer, G., I.J. Kopin, D.S. Goldstein (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*, 56: 331-349.
- [28] Nuñez, M., A. del Olmo, J. Calzada, Biogenic Amines, in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press: Oxford. p. 416-423.
- [29] Tofalo, R., G. Perpetuini, M. Schirone, G. Suzzi, Biogenic Amines: Toxicology and health effect, in *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P.M. Finglas, and F. Toldrá, Editors. 2016, Academic Press: Oxford. p. 424-429.
- [30] Naccarato, A., E. Gionfriddo, G. Sindona, A. Tagarelli (2014) Development of a simple and rapid solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for the analysis of dopamine, serotonin and norepinephrine in human urine. *Anal. Chim. Acta*, 810: 17-24.
- [31] Tran, M.T.C., J. Baglin, T.T.T. Tran, K.T. Hoang, L.T. Phung, A. Read, R.F. Greaves (2014) Development of a new biochemical test to diagnose and monitor neuroblastoma

in Vietnam: Homovanillic and vanillylmandelic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical biochemistry*, 47: 206-215.

[32] Wojnowski, W., J. Namiesnik, J. Plotka-Wasyłka (2019) Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness. *Microchem J.*, 145: 130-138.

[33] Plotka-Wasyłka, J., V. Simeonov, J. Namiesnik (2018) Characterization of home-made and regional fruit wines by evaluation of correlation between selected chemical parameters. *Microchem J.*, 140: 66-73.

[34] Papageorgiou, M., D. Lambropoulou, C. Morrison, J. Namiegnik, J. Plotka-Wasyłka (2018) Direct solid phase microextraction combined with gas chromatography - Mass spectrometry for the determination of biogenic amines in wine. *Talanta*, 183: 276-282.

[35] Aramaki, H., N. Tomiyasu, H. Yoshimura, H. Tsukamoto (1968) Forensic Chemical Study on Marihuana. I. a Detection Method of the Principal Constituents by Thin-layer and Gas Chromatographies. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 16: 822-826.

[36] Lewis, R., S. Ward, R. Johnson, D.T. Burns (2005) Distribution of the principal cannabinoids within bars of compressed cannabis resin. *Anal. Chim. Acta*, 538: 399-405.

[37] de Meijer, E.P.M., M. Bagatta, A. Carboni, P. Crucitti, V.M.C. Moliterni, P. Ranalli, G. Mandolino (2003) The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163: 335-346.

[38] Hillig, K.W., P.G. Mahlberg (2004) A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Am. J. Bot.*, 91: 966-975.

[39] Ilias, Y., S. Rudaz, P. Mathieu, J.L. Veuthey, P. Christen (2004) Analysis of cannabis material by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Chimia*, 58: 219-221.

[40] Ilias, Y., S. Rudaz, P. Mathieu, P. Christen, J.L. Veuthey (2005) Extraction and analysis of different *Cannabis* samples by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 28: 2293-2300.

[41] Mehmedic, Z., S. Chandra, D. Slade, H. Denham, S. Foster, A.S. Patel, S.A. Ross, I.A. Khan, M.A. ElSohly (2010) Potency trends of delta 9-THC and other cannabinoids in confiscated *Cannabis* preparations from 1993 to 2008. *Journal of forensic sciences*, 55: 1209-1217.

- [42] Lata, H., S. Chandra, N. Techen, I.A. Khan, M.A. ElSohly (2010) Assessment of the genetic stability of micropropagated plants of *Cannabis sativa* by ISSR markers. *Planta Med.*, 76: 97-100.
- [43] Chandra, S., H. Lata, Z. Mehmedic, I.A. Khan, M.A. ElSohly (2010) Assessment of cannabinoids content in micropropagated plants of *cannabis sativa* and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Planta Med.*, 76: 743-750.
- [44] Lata, H., S. Chandra, I.A. Khan, M.A. ElSohly (2010) High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high delta(9)-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. *Planta Med.*, 76: 1629-1633.
- [45] Omar, J., M. Olivares, M. Alzaga, N. Etxebarria (2013) Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *J. Sep. Sci.*, 36: 1397-1404.
- [46] Chan, K.W. (2014) Validating a gas chromatography-mass spectrometric method and sample classification procedure for cannabis profiling using cannabinoids from case samples. *Aust. J. Forensic Sci.*, 46: 424-432.
- [47] Omar, J., M. Olivares, J.M. Amigo, N. Etxebarria (2014) Resolution of co-eluting compounds of *Cannabis Sativa* in comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry detection with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares. *Talanta*, 121: 273-280.
- [48] Tayyab, M., D. Shahwar (2015) GCMS analysis of *Cannabis sativa* L. from four different areas of Pakistan. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 5: 114-125.
- [49] Lanz, C., J. Mattsson, U. Soydaner, R. Brenneisen (2016) Medicinal Cannabis: In vitro validation of vaporizers for the smoke-free inhalation of Cannabis. *PLoS One*, 11: 18.
- [50] Leghissa, A., Z.L. Hildenbrand, F.W. Foss, K.A. Schug (2018) Determination of cannabinoids from a surrogate hops matrix using multiple reaction monitoring gas chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 41: 459-468.
- [51] Beres, T., L. Cernochova, S.C. Zeljkovic, S. Benicka, T. Gucky, M. Bercak, P. Tarkowski (2019) Intralaboratory comparison of analytical methods for quantification of major phytocannabinoids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 411: 3069-3079.

- [52] Jang, E., H. Kim, S. Jang, J. Lee, S. Baeck, S. In, E. Kim, Y.U. Kim, E. Han (2020) Concentrations of THC, CBD, and CBN in commercial hemp seeds and hempseed oil sold in Korea. *Forensic Sci.Int.*, 306: 8.
- [53] Groger, T., M. Schaffer, M. Putz, B. Ahrens, K. Drew, M. Eschner, R. Zimmermann (2008) Application of two-dimensional gas chromatography combined with pixel-based chemometric processing for the chemical profiling of illicit drug samples. *J. Chromatogr. A*, 1200: 8-16.
- [54] ElSohly, M.A., Z. Mehmedic, S. Foster, C. Gon, S. Chandra, J.C. Church (2016) Changes in cannabis potency over the last 2 decades (1995-2014): Analysis of current data in the United States. *Biol. Psychiatry*, 79: 613-619.
- [55] Leiman, K., L. Colomo, S. Armenta, M. de la Guardia, F.A. Esteve-Turrillas (2018) Fast extraction of cannabinoids in marijuana samples by using hard-cap espresso machines. *Talanta*, 190: 321-326.
- [56] Mthembi, P.M., E.M. Mwenesongole, M.D. Cole (2019) Chemical profiling of the street cocktail drug 'nyaope' in South Africa using GC-MS II: Stability studies of the cannabinoid, opiate and antiretroviral components during sample storage. *Forensic Sci.Int.*, 300: 187-192.
- [57] Slosse, A., F. Van Durme, N. Samyn, D. Mangelings, Y. Vander Heyden (2020) Evaluation of data preprocessings for the comparison of GC-MS chemical profiles of seized cannabis samples. *Forensic Sci.Int.*, 310: 13.
- [58] Villamor, J.L., A.M. Bermejo, M.J. Taberner, P. Fernandez (2004) Determination of cannabinoids in human hair by GC/MS. *Anal. Lett.*, 37: 517-528.
- [59] Thorspecken, J., G. Skopp, L. Potsch (2004) In vitro contamination of hair by marijuana smoke. *Clin. Chem.*, 50: 596-602.
- [60] de Oliveira, C.D.R., M. Yonamine, R.L.D. Moreau (2007) Headspace solid-phase microextraction of cannabinoids in human head hair samples. *J. Sep. Sci.*, 30: 128-134.
- [61] Emidio, E.S., M. Prata Vde, H.S. Dorea (2010) Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 670: 63-71.
- [62] Breidi, S.E., J. Barker, A. Petroczi, D.P. Naughton (2012) Enzymatic digestion and selective quantification of underivatized delta-9-tetrahydrocannabinol and cocaine in human hair using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.*: 1-8.

- [63] Tzatzarakis, M.N., A.K. Alegakis, M.P. Kavvalakis, E. Vakonaki, P.D. Stivaktakis, K. Kanaki, A.I. Vardavas, E.G. Barbounis, A.M. Tsatsakis (2017) Comparative evaluation of drug deposition in hair samples collected from different anatomical body sites. *J. Anal. Toxicol.*, 41: 214-223.
- [64] Luo, D., F. Chen, K. Xiao, Y.Q. Feng (2009) Rapid determination of delta(9)-Tetrahydrocannabinol in saliva by polymer monolith microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 77: 1701-1706.
- [65] Anzillotti, L., E. Castrignano, S.S. Rossi, M. Chiarotti (2014) Cannabinoids determination in oral fluid by SPME-GC/MS and UHPLC-MS/MS and its application on suspected drivers. *Sci. Justice*, 54: 421-426.
- [66] Anzillotti, L., F. Marezza, L. Calo, R. Andreoli, S. Agazzi, F. Bianchi, M. Careri, R. Cecchi (2019) Determination of synthetic and natural cannabinoids in oral fluid by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry: A pilot study. *Talanta*, 201: 335-341.
- [67] Leghissa, A., J. Smuts, C.L. Qiu, Z.L. Hildenbrand, K.A. Schug (2018) Detection of cannabinoids and cannabinoid metabolites using gas chromatography with vacuum ultraviolet spectroscopy. *Sep. Sci. Plus*, 1: 37-42.
- [68] Grafinger, K.E., S. Kronert, A. Broillet, W. Weinmann (2020) Cannabidiol and tetrahydrocannabinol concentrations in commercially available CBD E-liquids in Switzerland. *Forensic Sci.Int.*, 310: 12.
- [69] Silveira, G.D., S. Loddi, C.D.R. de Oliveira, A.D. Zucoloto, L.V.G. Fruchtengarten, M. Yonamine (2017) Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of cannabinoids in human breast milk. *Forensic Toxicol.*, 35: 125-132.
- [70] Poole, C.F. (2013) Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1296: 2-14.
- [71] Halket, J.M., V.G. Zaikin (2003) Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 9: 1-21.
- [72] Ciolino, L.A., T.L. Ranieri, A.M. Taylor (2018) Commercial cannabis consumer products part 1: GC-MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci.Int.*, 289: 429-437.

- [73] Delgado-Povedano, M.M., C.S.C. Callado, E. Priego-Capote, C. Ferreiro-Vera (2020) Untargeted characterization of extracts from *Cannabis sativa* L. cultivars by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution mode. *Talanta*, 208: 10.
- [74] Gonzalez-Marino, I., J.B. Quintana, I. Rodriguez, R. Cela (2010) Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217: 1748-1760.
- [75] Racamonde, I., E. Villaverde-de-Saa, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela (2012) Determination of delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1245: 167-174.
- [76] Pellegrini, M., E. Marchei, R. Pacifici, S. Pichini (2005) A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36: 939-946.
- [77] Brunet, B., C. Doucet, N. Venisse, T. Hauet, W. Hebrard, Y. Papet, G. Mauco, P. Mura (2006) Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues. *Forensic Sci.Int.*, 161: 169-174.
- [78] Chiarotti, M., L. Costamagna (2000) Analysis of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci Int*, 114: 1-6.
- [79] Gustafson, R.A., E.T. Moolchan, A. Barnes, B. Levine, M.A. Huestis (2003) Validated method for the simultaneous determination of delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization. *J. Chromatogr. B*, 798: 145-154.
- [80] Mannila, J., M. Lehtonen, T. Jarvinen, P. Jarho (2004) Determination of delta9-tetrahydrocannabinol from rabbit plasma by gas chromatography-mass spectrometry using two ionization techniques. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 810: 283-290.

- [81] Goodwin, R.S., R.A. Gustafson, A. Barnes, W. Nebro, E.T. Moolchan, M.A. Huestis (2006) Delta(9)-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in human plasma after controlled oral administration of cannabinoids. *Ther Drug Monit*, 28: 545-551.
- [82] Scurlock, R.D., G.B. Ohlson, D.K. Worthen (2006) The detection of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol (THCA) in whole blood using two-dimensional gas chromatography and EI-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 30: 262-266.
- [83] Lowe, R.H., E.L. Karschner, E.W. Schwilke, A.J. Barnes, M.A. Huestis (2007) Simultaneous quantification of delta 9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta 9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human plasma using two-dimensional gas chromatography, cryofocusing, and electron impact-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1163: 318-327.
- [84] Karschner, E.L., E.W. Schwilke, R.H. Lowe, W.D. Darwin, H.G. Pope, R. Herning, J.L. Cadet, M.A. Huestis (2009) Do delta 9-tetrahydrocannabinol concentrations indicate recent use in chronic cannabis users? *Addiction*, 104: 2041-2048.
- [85] Castro, A.L., S. Tarelho, P. Melo, J.M. Franco (2018) A fast and reliable method for quantitation of THC and its 2 main metabolites in whole blood by GC-MS/MS (TQD). *Forensic Sci.Int.*, 289: 344-351.
- [86] Leghissa, A., Z.L. Hildenbrand, F.W. Foss, K.A. Schug (2018) Determination of the metabolites of delta 9-tetrahydrocannabinol in urine and plasma using multiple reaction monitoring gas chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Sep. Sci. Plus*, 1: 43-47.
- [87] Pacifici, R., S. Pichini, M. Pellegrini, M.C. Rotolo, R. Giorgetti, A. Tagliabracci, F.P. Busardo, M.A. Huestis (2020) THC and CBD concentrations in blood, oral fluid and urine following a single and repeated administration of "light cannabis". *Clin. Chem. Lab. Med.*, 58: 682-689.
- [88] Andrews, R., S. Paterson (2012) A validated method for the analysis of cannabinoids in post-mortem blood using liquid-liquid extraction and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci.Int.*, 222: 111-117.

- [89] Pelicao, F.S., M.D. Peres, J.F. Pissinate, B.S. De Martinis (2014) A one-step extraction procedure for the screening of cocaine, amphetamines and cannabinoids in postmortem blood samples. *J. Anal. Toxicol.*, 38: 341-348.
- [90] Gasse, A., H. Pfeiffer, H. Kohler, J. Schurenkamp (2016) Development and validation of a solid-phase extraction method using anion exchange sorbent for the analysis of cannabinoids in plasma and serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Int. J. Legal Med.*, 130: 967-974.
- [91] Purschke, K., S. Heintl, O. Lerch, F. Erdmann, F. Veit (2016) Development and validation of an automated liquid-liquid extraction GC/MS method for the determination of THC, 11-OH-THC, and free THC-carboxylic acid (THC-COOH) from blood serum. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408: 4379-4388.
- [92] Andrenyak, D.M., D.E. Moody, M.H. Slawson, D.S. O'Leary, M. Haney (2017) Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, 11-nor-9-carboxy-THC and cannabidiol in human plasma using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 41: 277-288.
- [93] Rosado, T., L. Fernandes, M. Barroso, E. Gallardo (2017) Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 1043: 63-73.
- [94] Gottardo, R., D. Sorio, M. Ballotari, F. Tagliaro (2019) First application of atmospheric-pressure chemical ionization gas chromatography tandem mass spectrometry to the determination of cannabinoids in serum. *J. Chromatogr. A*, 1591: 147-154.
- [95] Boldis, O., G. Kocsis, A. Gachalyi, J. Furesz (2003) Gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring measurement of 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-carboxylic acid in urine. *Journal of chromatographic science*, 41: 190-194.
- [96] Dietz, L., A. Glaz-Sandberg, H. Nguyen, G. Skopp, G. Mikus, R. Aderjan (2007) The urinary disposition of intravenously administered 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in humans. *Ther Drug Monit*, 29: 368-372.

- [97] Lowe, R.H., T.T. Abraham, W.D. Darwin, R. Herning, J.L. Cadet, M.A. Huestis (2009) Extended urinary delta 9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. *Drug Alcohol Depend.*, 105: 24-32.
- [98] Eller, S., L.G. Flaiban, B. Paranhos, J.L. da Costa, F.R. Lourenco, M. Yonamine (2014) Analysis of 11-nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol in urine samples by hollow fiber-liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in consideration of measurement uncertainty. *Forensic Toxicol.*, 32: 282-291.
- [99] Baeck, S., B. Kim, B. Cho, E. Kim (2019) Analysis of cannabinoids in urine samples of short-term and long-term consumers of hemp seed products. *Forensic Sci.Int.*, 305: 6.
- [100] Pacifici, R., S. Pichini, M. Pellegrini, R. Tittarelli, F. Pantano, G. Mannocchi, M.C. Rotolo, F.P. Busardo (2019) Determination of cannabinoids in oral fluid and urine of "light cannabis" consumers: a pilot study. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 57: 238-243.
- [101] Strano-Rossi, S., F. Molaioni, F. Rossi, F. Botre (2005) Rapid screening of drugs of abuse and their metabolites by gas chromatography/mass spectrometry: application to urinalysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19: 1529-1535.
- [102] Moon, J.Y., J.Y. Kim, M.H. Moon, B.C. Chung, M.K. In, M.H. Choi (2008) Validated gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary cannabinoids purified with a calcium-hardened beta-cyclodextrin polymer. *J. Chromatogr. A*, 1204: 87-92.
- [103] Jung, J., M.R. Meyer, H.H. Maurer, C. Neususs, W. Weinmann, V. Auwarter (2009) Studies on the metabolism of the delta 9-tetrahydrocannabinol precursor delta 9-tetrahydrocannabinolic acid A (Delta 9-THCA-A) in rat using LC-MS/MS, LC-QTOF MS and GC-MS techniques. *J. Mass Spectrom.*, 44: 1423-1433.
- [104] Hidvegi, E., G.P. Somogyi (2010) Detection of cannabigerol and its presumptive metabolite in human urine after Cannabis consumption. *Pharmazie*, 65: 408-411.
- [105] De Brabanter, N., W. Van Gansbeke, F. Hooghe, P. Van Eenoo (2013) Fast quantification of 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) using microwave-accelerated derivatisation and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Forensic Sci.Int.*, 224: 90-95.
- [106] Nadulski, T., F. Pragst (2007) Simple and sensitive determination of delta(9)-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation,

headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 846: 78-85.

[107] Musshoff, F., H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea (2002) Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 26: 554-560.

[108] Gambelunghe, C., R. Rossi, C. Ferranti, R. Rossi, M. Bacci (2005) Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *J. Appl. Toxicol.*, 25: 205-211.

[109] Minoli, M., I. Angeli, A. Ravelli, F. Gigli, F. Lodi (2012) Detection and quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair by GC/MS/MS in negative chemical ionization mode (NCI) with a simple and rapid liquid/liquid extraction. *Forensic Sci.Int.*, 218: 49-52.

[110] Angeli, I., S. Casati, A. Ravelli, M. Minoli, M. Orioli (2018) A novel single-step GC-MS/MS method for cannabinoids and 11-OH-THC metabolite analysis in hair. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 155: 1-6.

[111] Rodrigues, A., M. Yegles, N. Van Elsue, S. Schneider (2018) Determination of cannabinoids in hair of CBD rich extracts consumers using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci.Int.*, 292: 163-166.

[112] Kieliba, T., O. Lerch, H. Andresen-Streichert, M.A. Rothschild, J. Beike (2019) Simultaneous quantification of THC-COOH, OH-THC, and further cannabinoids in human hair by gas chromatography-tandem mass spectrometry with electron ionization applying automated sample preparation. *Drug Test. Anal.*, 11: 267-278.

[113] Kim, J.Y., J.C. Cheong, M.K. Kim, J.I. Lee, M.K. In (2008) Simultaneous determination of amphetamine-type stimulants and cannabinoids in fingernails by gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Pharm. Res.*, 31: 805-813.

[114] Moore, C., S. Rana, C. Coulter (2007) Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. *J. Chromatogr. B*, 852: 459-464.

[115] Rotolo, M.C., M. Pellegrini, P. Martucci, R. Giacobbe, A. De Palma, R. Pacifici, S. Pichini, F.P. Busardo, M. Bisconti (2019) Cannabinoids determination in bronchoalveolar lavages of cannabis smokers with lung disease. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 57: 498-503.

- [116] Papoutsis, I., P. Nikolaou, A. Dona, C. Pistos, M. Stefanidou, C. Spiliopoulou, S. Athanaselis (2012) A validated GC-MS method for the determination of delta(9)-tetrahydrocannabinol and 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples. *Forensic Toxicol.*, 30: 51-58.
- [117] Schwilke, E.W., E.L. Karschner, R.H. Lowe, A.M. Gordon, J.L. Cadet, R.I. Hering, M.A. Huestis (2009) Intra- and intersubject whole blood/plasma cannabinoid ratios determined by 2-dimensional, electron impact GGMS with cryofocusing. *Clin. Chem.*, 55: 1188-1195.
- [118] Schwilke, E.W., D.M. Schwoppe, E.L. Karschner, R.H. Lowe, W.D. Darwin, D.L. Kelly, R.S. Goodwin, D.A. Gorelick, M.A. Huestis (2009) Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. *Clin. Chem.*, 55: 2180-2189.
- [119] Gray, T.R., A.J. Barnes, M.A. Huestis (2010) Effect of hydrolysis on identifying prenatal cannabis exposure. *Anal Bioanal Chem*, 397: 2335-2347.
- [120] Karschner, E.L., A.J. Barnes, R.H. Lowe, K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis (2010) Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol, Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397: 603-611.
- [121] Milman, G., A.J. Barnes, R.H. Lowe, M.A. Huestis (2010) Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217: 1513-1521.
- [122] Milman, G., D.M. Schwoppe, E.W. Schwilke, W.D. Darwin, D.L. Kelly, R.S. Goodwin, D.A. Gorelick, M.A. Huestis (2011) Oral fluid and plasma cannabinoid ratios after around-the-clock controlled oral delta(9)-tetrahydrocannabinol administration. *Clin. Chem.*, 57: 1597-1606.
- [123] Schwilke, E.W., R.G. Gullberg, W.D. Darwin, C.N. Chiang, J.L. Cadet, D.A. Gorelick, H.G. Pope, M.A. Huestis (2011) Differentiating new cannabis use from residual urinary cannabinoid excretion in chronic, daily cannabis users. *Addiction*, 106: 499-506.
- [124] Anizan, S., G. Milman, N. Desrosiers, A.J. Barnes, D.A. Gorelick, M.A. Huestis (2013) Oral fluid cannabinoid concentrations following controlled smoked cannabis in chronic frequent and occasional smokers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405: 8451-8461.

- [125] Bergamaschi, M.M., E.L. Karschner, R.S. Goodwin, K.B. Scheidweiler, J. Hirvonen, R.H.C. Queiroz, M.A. Huestis (2013) Impact of prolonged cannabinoid excretion in chronic daily cannabis smokers' blood on per se drugged driving laws. *Clin. Chem.*, 59: 519-526.
- [126] Bergamaschi, M.M., A. Barnes, R.H.C. Queiroz, Y.L. Hurd, M.A. Huestis (2013) Impact of enzymatic and alkaline hydrolysis on CBD concentration in urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405: 4679-4689.
- [127] Lee, D., R. Vandrey, D.R. Mendu, S. Anizan, G. Milman, J.A. Murray, A.J. Barnes, M.A. Huestis (2013) Oral fluid cannabinoids in chronic Cannabis smokers during oral delta(9)-tetrahydrocannabinol therapy and smoked Cannabis challenge. *Clin. Chem.*, 59: 1770-1779.
- [128] Lee, D., R. Vandrey, G. Milman, M. Bergamaschi, D.R. Mendu, J.A. Murray, A.J. Barnes, M.A. Huestis (2013) Oral fluid/plasma cannabinoid ratios following controlled oral THC and smoked cannabis administration. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405: 7269-7279.
- [129] Anizan, S., M.M. Bergamaschi, A.J. Barnes, G. Milman, N. Desrosiers, D. Lee, D.A. Gorelick, M.A. Huestis (2015) Impact of oral fluid collection device on cannabinoid stability following smoked cannabis. *Drug Test. Anal.*, 7: 114-120.
- [130] Lee, D., R. Vandrey, D.R. Mendu, J.A. Murray, A.J. Barnes, M.A. Huestis (2015) Oral fluid cannabinoids in chronic frequent cannabis smokers during ad libitum cannabis smoking. *Drug Test. Anal.*, 7: 494-501.
- [131] Lee, D., M.M. Bergamaschi, G. Milman, A.J. Barnes, R.H.C. Queiroz, R. Vandrey, M.A. Huestis (2015) Plasma cannabinoid pharmacokinetics after controlled smoking and ad libitum Cannabis smoking in chronic frequent users. *J. Anal. Toxicol.*, 39: 580-587.
- [132] Balducci, C., G. Nervegna, A. Cecinato (2009) Evaluation of principal cannabinoids in airborne particulates. *Anal. Chim. Acta*, 641: 89-94.
- [133] Mantovani, C.D., J.P.E. Silva, G. Forster, R.M. de Almeida, E.M.D. Diniz, M. Yonamine (2018) Simultaneous accelerated solvent extraction and hydrolysis of 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid glucuronide in meconium samples for gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B*, 1074: 1-7.
- [134] Stalling, D.L., C.W. Gehrke, R.W. Zumwalt (1968) A new silylation reagent for amino acids bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31: 616-622.

- [135] Carrasco-Pancorbo, A., E. Nevedomskaya, T. Arthen-Engeland, T. Zey, G. Zurek, C. Baessmann, A.M. Deelder, O.A. Mayboroda (2009) Gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry: Analytical validation and applicability to metabolic profiling. *Analytical Chemistry*, 81: 10071-10079.
- [136] Mandalakis, M., M. Apostolaki, E.G. Stephanou (2010) Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217: 143-150.
- [137] Li, J., H.Y. Qi, Y.B. Wang, Q. Su, S. Wu, L. Wu (2016) Hollow fiber-stir bar sorptive extraction and microwave assisted derivatization of amino acids in biological matrices. *J. Chromatogr. A*, 1474: 32-39.
- [138] Takeo, E., R. Sasano, S. Shimma, T. Bamba, E. Fukusaki (2017) Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography–mass-spectrometry-based metabolomics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124: 700-706.
- [139] Zhang, X.K., Y.B. Lan, B.Q. Zhu, X.F. Xiang, C.Q. Duan, Y. Shi (2018) Changes in monosaccharides, organic acids and amino acids during Cabernet Sauvignon wine ageing based on a simultaneous analysis using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 104-112.
- [140] Kubinec, R., P. Kotorá, V. Ferenczy, J. Blaško, P. Podolec, A. Hengerics Szabó, D. Behúlová, V. Bierhanzl, R. Čabala, S. Stuchlík, W. Filipiak, N.M. Tháňg (2018) Simultaneous analysis of carbohydrates, polyols and amines in urine samples using chemical ionization gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 41: 449-458.
- [141] Yoon, H.R. (2013) Determination of plasma dibasic amino acids following trimethylsilyl- trifluoroacyl derivatization using gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Pharm. Res.*, 36: 366-373.
- [142] Shin, H.J., N.H. Park, W. Lee, M.H. Choi, B.C. Chung, J. Hong (2017) Metabolic profiling of tyrosine, tryptophan, and glutamate in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry combined with single SPE cleanup. *J. Chromatogr. B*, 1051: 97-107.
- [143] Hong, J.Y., N.H. Park, M.S. Oh, H.S. Lee, H. Pyo, J. Hong (2013) Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 940: 94-103.

- [144] Park, N.H., J.Y. Hong, H.J. Shin, J. Hong (2013) Comprehensive profiling analysis of bioamines and their acidic metabolites in human urine by gas chromatography/mass spectrometry combined with selective derivatization. *J. Chromatogr. A*, 1305: 234-243.
- [145] Aragon, A., J. Legradi, A. Ballesteros-Gomez, J. Legler, M. van Velzen, J. de Boer, P. Leonards (2017) Determination of monoamine neurotransmitters in zebrafish (*Danio rerio*) by gas chromatography coupled to mass spectrometry with a two-step derivatization. *Anal. Bioanal. Chem.*, 409: 2931-2939.
- [146] Zaikin, V.G., J.M. Halket (2003) Derivatization in mass spectrometry - 2. Acylation. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 9: 421-434.
- [147] Doig, M.V., R. Andela (2000) Analysis of pharmacologically active cannabinoids by GC-MS. *Chromatographia*, 52: S101-S102.
- [148] Saito, T., A. Wtsadik, K.B. Scheidweiler, N. Fortner, S. Takeichi, M.A. Huestis (2004) Validated gas chromatographic-negative ion chemical ionization mass spectrometric method for delta(9)-tetrahydrocannabinol in sweat patches. *Clin. Chem.*, 50: 2083-2090.
- [149] Thomas, A., C. Widmer, G. Hopfgartner, C. Staub (2007) Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45: 495-503.
- [150] Kim, S.Y., J.Y. Kim, W. Kwon, M.K. In, Y.E. Kim, K.J. Paeng (2013) Method development for simultaneous determination of amphetamine type stimulants and cannabinoids in urine using GC-MS. *Microchem J.*, 110: 326-333.
- [151] Baptista, M.J., P.V. Monsanto, E.G. Pinho Marques, A. Bermejo, S. Avila, A.M. Castanheira, C. Margalho, M. Barroso, D.N. Vieira (2002) Hair analysis for delta(9)-THC, delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci Int*, 128: 66-78.
- [152] Chu, M.H., O.H. Drummer (2002) Determination of delta9-THC in whole blood using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, 26: 575-581.
- [153] Marsili, R., S. Martello, M. Felli, S. Fiorina, M. Chiarotti (2005) Hair testing for delta(9)-THC-COOH by gas chromatography/tandem mass spectrometry in negative chemical ionization mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19: 1566-1568.

- [154] Kim, J.Y., M.K. In (2007) Determination of 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using gas chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion chemical ionization mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21: 1339-1342.
- [155] Han, E., Y. Park, E. Kim, S. In, W. Yang, S. Lee, H. Choi, S. Lee, H. Chung, J.M. Song (2011) Simultaneous analysis of delta(9)-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in hair without different sample preparation and derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55: 1096-1103.
- [156] Kim, J.Y., J.C. Cheong, J.I. Lee, M.K. In (2011) Improved gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometric method for determination of 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using mechanical pulverization and bead-assisted liquid-liquid extraction. *Forensic Sci.Int.*, 206: E99-E102.
- [157] Thieme, D., H. Sachs, M. Uhl (2014) Proof of cannabis administration by sensitive detection of 11-nor-delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using selective methylation and application of liquid chromatography-tandem and multistage mass spectrometry. *Drug Test. Anal.*, 6: 112-118.
- [158] Lewis, J., A. Molnar, D. Allsop, J. Copeland, S.L. Fu (2016) Rapid elimination of carboxy-THC in a cohort of chronic cannabis users. *Int. J. Legal Med.*, 130: 147-152.
- [159] Meier, S.I., S.C. Koelzer, M. Schubert-Zsilavec, S.W. Toennes (2017) Analysis of drugs of abuse in Cerumen - correlation of postmortem analysis results with those for blood, urine and hair. *Drug Test. Anal.*, 9: 1572-1585.
- [160] Stefanelli, F., F.G. Pesci, M. Giusiani, S. Chericoni (2018) A novel fast method for aqueous derivatization of THC, OH-THC and THC-COOH in human whole blood and urine samples for routine forensic analyses. *Biomed. Chromatogr.*, 32: 10.
- [161] Barnes, A.J., K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis (2014) Quantification of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol in human oral fluid by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit*, 36: 225-233.
- [162] Kaspar, H., K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner (2008) Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *J. Chromatogr. B*, 870: 222-232.
- [163] Mudiam, M.K.R., C. Ratnasekhar (2013) Ultra sound assisted one step rapid derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas

chromatography-mass spectrometric determination of amino acids in complex matrices. *J. Chromatogr. A*, 1291: 10-18.

[164] Namera, A., M. Yashiki, M. Nishida, T. Kojima (2002) Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 776: 49-55.

[165] Huang, J., N. Gan, F.Y. Lv, Y.T. Cao, C.R. Ou, H.Q. Tang (2016) Environmentally friendly solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of biogenic amines in fish samples. *J. Sep. Sci.*, 39: 4384-4390.

[166] Monteleone, M., A. Naccarato, G. Sindona, A. Tagarelli (2013) A reliable and simple method for the assay of neuroendocrine tumor markers in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 759: 66-73.

[167] Husek, P., Z. Svagera, D. Hanzlikova, L. Rimnacova, H. Zahradnickova, I. Opekarova, P. Simek (2016) Profiling of urinary amino-carboxylic metabolites by in-situ heptafluorobutyl chloroformate mediated sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1443: 211-232.

[168] Swift, W., A. Wong, K.M. Li, J.C. Arnold, I.S. McGregor (2013) Analysis of Cannabis Seizures in NSW, Australia: Cannabis Potency and Cannabinoid Profile. *PLoS One*, 8: 9.

[169] Hazekamp, A., E.R. Heerdink (2013) The prevalence and incidence of medicinal cannabis on prescription in The Netherlands. *European journal of clinical pharmacology*, 69: 1575-1580.

[170] Hazekamp, A.T.K., Papadimitriou S. (2016) Cannabis: From Cultivar to Chemovar II - A Metabolomics Approach to Cannabis Classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1: 205-215.

[171] Glivar, T., J. Erzen, S. Kreft, M. Zagozen, A. Cerenak, B. Ceh, E.T. Benkovic (2020) Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Industrial Crops and Products*, 145: 9.

[172] Sandler, Y., *Amino Acids Profiling for the Diagnosis of Metabolic Disorders*. 2019.

10. Saját publikációk jegyzéke**10.1 Disszertációhoz kötődő publikációk:**

Fodor, B., Üveges, E., Molnár-Perl, I. (2020) Direct sample preparation and simultaneous perfluoroacylation - Trimethylsilylation of biogenic monoamines along with their acidic metabolites for a single step analysis by GC-MS. Anal. Chim. Acta, 1127: 9-19. **IF: 5,977***

Fodor, B., A. Csampai, Molnar-Perl, I. (2020) Hexamethyldisilazane and perfluorocarboxylic acid couples achieve trialkylsilylation and acylation of active proton containing organics in a single step. Microchem J., 154: 104554 **IF: 3,594***

Fodor, B., Boldizsár, I., Molnár-Perl, I. (2018) Alkylsilyl speciation and direct sample preparation of plant cannabinoids prior to their analysis by GC-MS. Anal. Chim Acta, 1021: 51-59. **IF: 5,256**

Fodor, B., Molnar-Perl, I. (2017) The role of derivatization techniques in the analysis of plant cannabinoids by gas chromatography mass spectrometry. Trends Anal. Chem., 95: 149-158. **IF: 7,030**

*várható impakt faktor érték

10.2 Disszertációhoz nem kötődő publikációk:

Zürn, M., Tóth, G., Kraszni, M., Sólyomváry, A., Mucsi, Z., Deme, R., Rózsa, B., **Fodor, B.,** Molnár-Perl, I., Horváti, K., Bősze, Sz., Pályi, B., Kis, Z., Béni, Sz., Noszál, B., Boldizsár, I., (2019) Galls of European Fraxinus trees as new and abundant sources of valuable phenylethanoid and coumarin glycosides. Ind. Crops Prod., 139: 111517 **IF: 4,191**

Molnár, B., **Fodor, B.,** Boldizsár, I.; Molnár-Perl, I., (2016) Trimethylsilyl speciations of cathine, cathinone and norephedrine followed by gas chromatography mass spectrometry: Direct sample preparation and analysis of khatamines. J. Chromatogr. A, 1440: 172-178. **IF: 3,981**

Molnár, B., **Fodor, B.**, Csámpai, A., Hidvégi, E., Molnár-Perl, I., (2016) Structure-related new approach in the gas chromatography/mass spectrometry analysis of cathinone type synthetic drugs. *J. Chromatogr. A*, 1477: 70-75.

IF: 3,981

Molnár, B., **Fodor, B.**, Boldizsár, I., Molnár-Perl, I., (2015) Quantitative silylation speciations of primary phenylalkyl amines, including amphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine prior to their analysis by GC/MS. *Anal. Chem.*, 87: 10188-10192.

IF: 5,886

11. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Perlné Dr. Molnár Ibolya** egyetemi tanárnak, fáradhatatlan útmutatásáért, lankadatlan támogatásáért és folyamatos ösztönzéséért. Köszönöm kitűntető bizalmát, hasznos tanácsait, szakmai szemléletem megalapozását és rendszeres finomítását.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Boldizsár Imre** egyetemi docensnek a növényi minták beszerzéséért és előkészítésükben nyújtott segítségéért, **Zsigrainé Dr. Vasanits Anikó** egyetemi adjunktusnak a mindennapos problémák megoldásában nyújtott tanácsaiért és **Dr. Molnár Borbála** volt doktorandusz hallgatónak, hogy a gyakorlati tudását átadta.

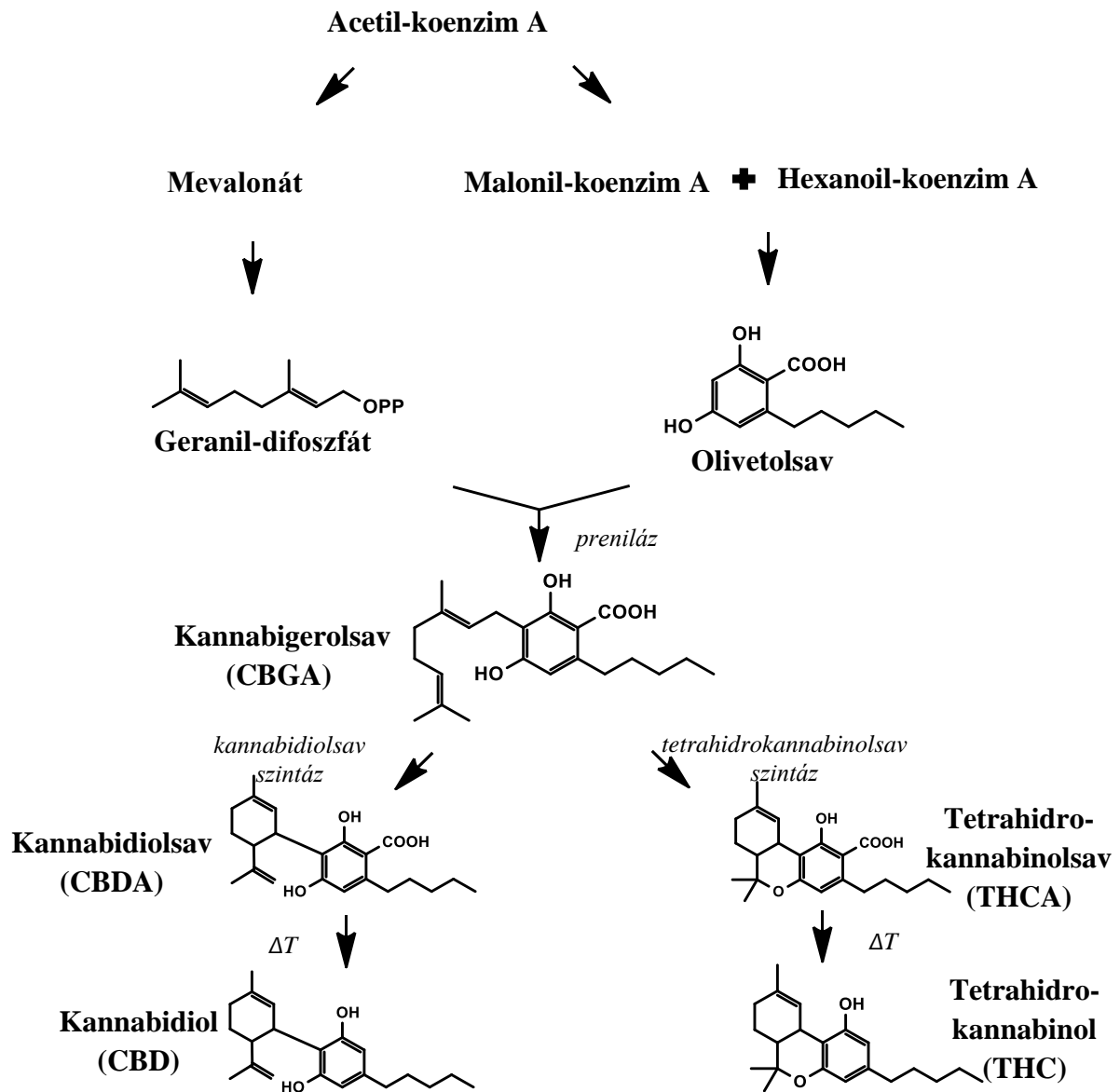
Hálás vagyok **Üveges Elina**, **Bartos Adrienn** és **Mikó Norbert** jelenlegi és korábbi gyógyszerészhallgatóknak, hogy kitartó munkájukkal segítették a kutatást.

Köszönet illeti **Dr. Hídvégi Elődöt** a Nemzetközi Szakértői és Kutató Központ munkatársát, hogy a kutatáshoz a kannabinoid típusú vegyületek standard oldatait biztosította, **Dr. Róna Kálmán** egyetemi magántanárt, az Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet Toxikológiai Laboratóriumának vezetőjét, amiért az általuk elemzett vizelet mintákat rendelkezésemre bocsátotta, továbbá **Dr. Bösze Szilviát** és **Kiskó Máriát**, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársait a peptidek szintéziséért és előkészítésükben nyújtott munkájukért és **Dr. Csámpai Antal** egyetemi tanárt az egylépéses származékképzés reakciómechanizmusának megértéséhez nyújtott segítségéért.

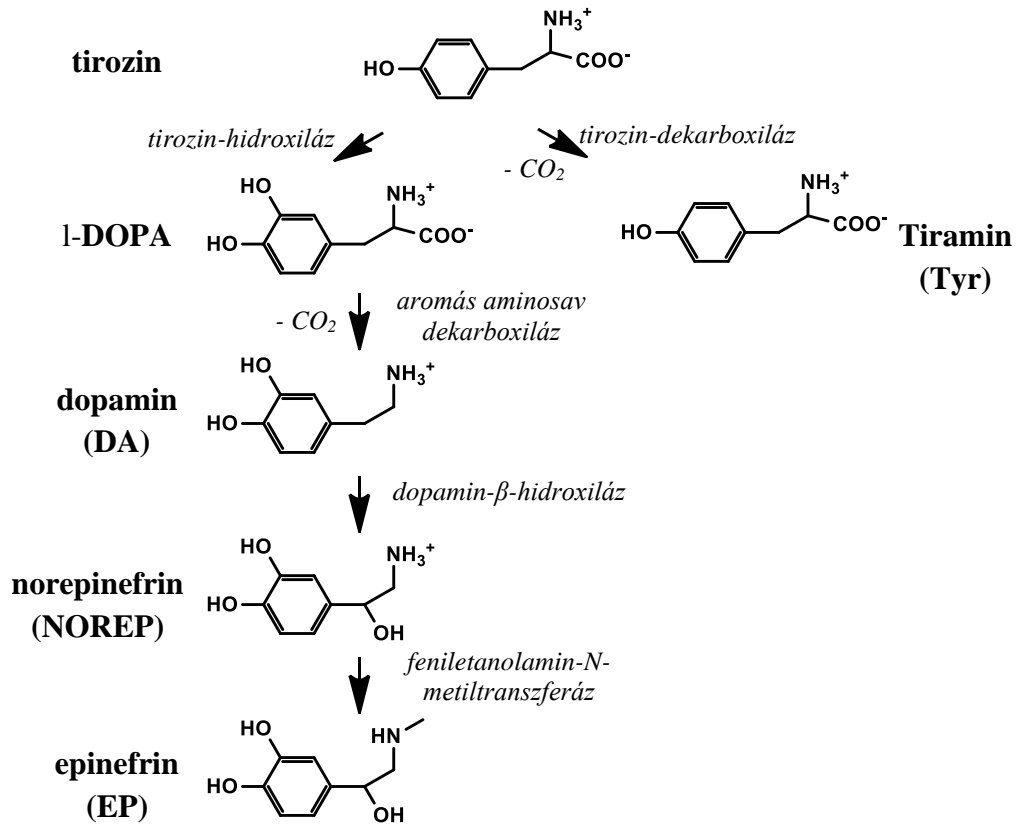
Köszönöm **Dr. Szalai István** korábbi tanszékvezető egyetemi tanárnak, jelenlegi intézetigazgatónak és **Csörgeiné Dr. Kurin Krisztina** tanszékvezető egyetemi docenseknek, hogy lehetővé tették munkámat az ELTE Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszékén. Köszönet a **Semmelweis Egyetemnek** az eredményeim nemzetközi konferenciákon való bemutatásához nyújtott hozzájárulásáért.

Hálás vagyok a családom és barátaim állandó támogatásáért és végtelen türelméért.

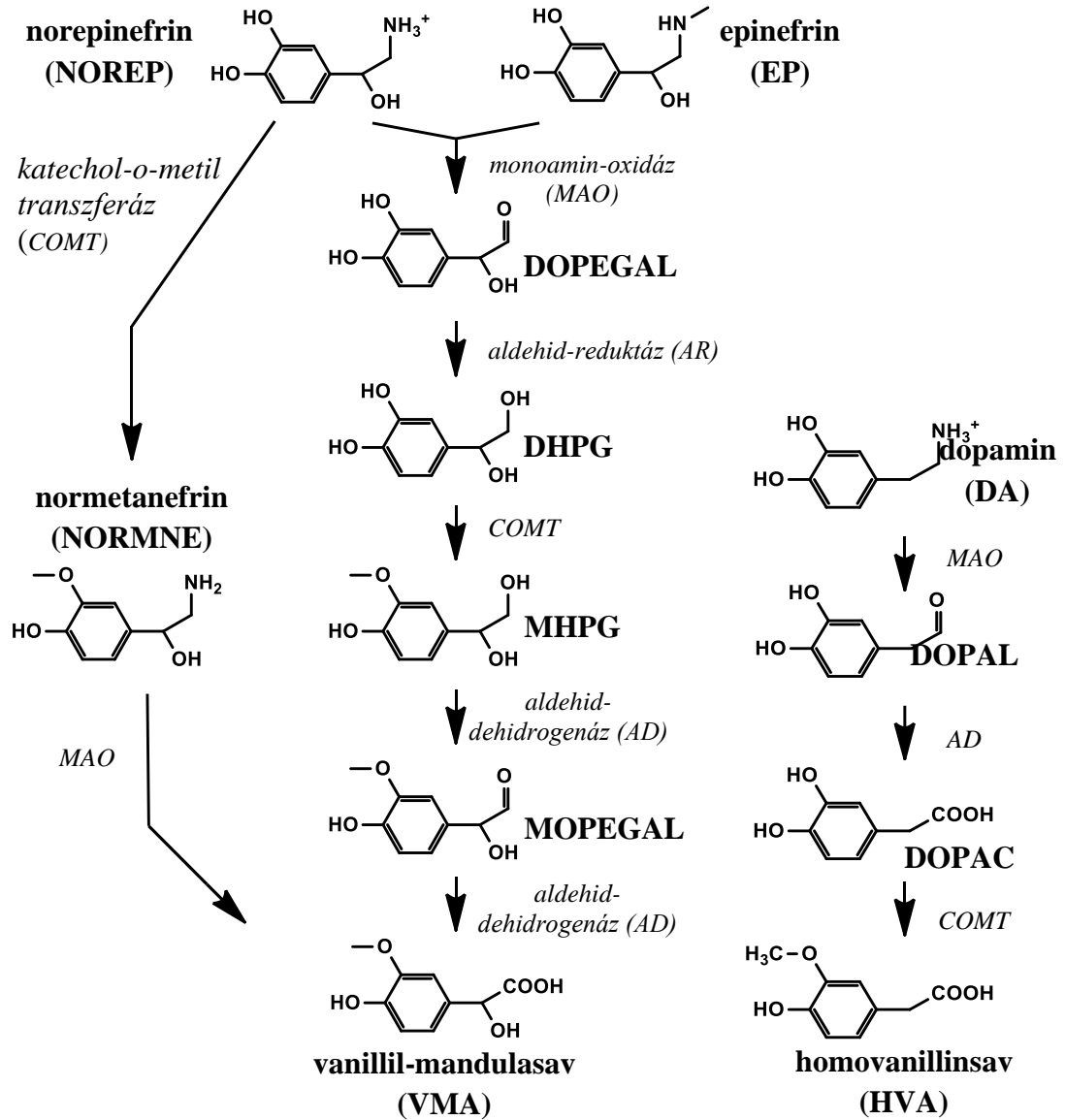
12. Függelék: Kannabinoidok és catecholaminok bioszintézise és bomlása



1. ábra A fő kannabinoidok bioszintézise (DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.02.011)



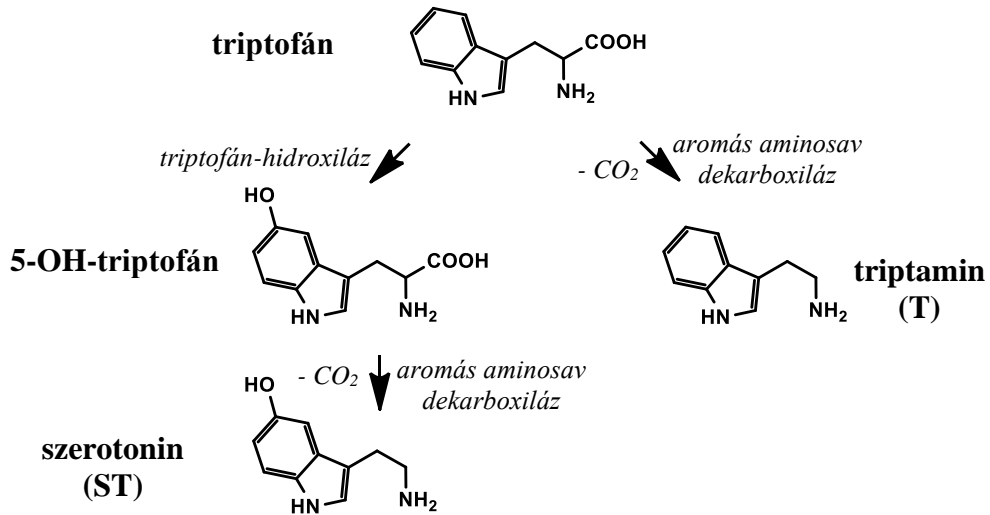
2. ábra A katecholaminok bioszintézise (DOI: 10.1186/1478-811X-11-34)



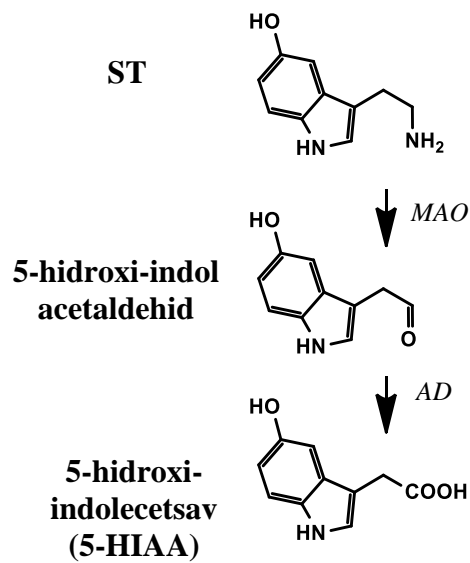
3. ábra A catecholaminok metabolizmusa

(Sarah Kamal, Sarah L. Lappin: Biochemistry, Catecholamine Degradation)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545235/>



4. ábra A triptaminok bioszintézise (DOI: 10.2174/1874082000903010035)



5. ábra A triptaminok metabolizmusa (DOI: 10.3389/fendo.2019.00158)