

**Egy- és kétdimenziós LC-MS kapcsolt technikák
bioanalitikai, lipidomikai és metabolomikai**

alkalmazása

PHD ÉRTEKEZÉS

Készítette

Körmöczi Tímea

Témavezető

Dr. Berkecz Róbert

egyetemi adjunktus



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

GYTK Gyógyszeranalitikai Intézet és SZAOK Orvosi Vegytani Intézet

SZEGED

2022

Tartalomjegyzék

Az értekezésben használt rövidítések.....	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	6
2.2. Kétdimenziós folyadékkromatográfiai technikák.....	10
2.3. Tömegspektrometria	15
2.4. A foszfolipidek szerepe a szorongásos megbetegedésekben	23
2.5. Az N,N-dimetiltriptamin terápiás céllal történő adagolása iszkémiás állatokban	29
2.6. Szintetikus kannabinoidok és metabolitjaik.....	31
2.6.1. <i>4F-MDMB-BICA, mint új szintetikus kannabinoid</i>	38
3. Célkitűzés.....	41
4. Kísérleti rész.....	43
4.1. Vizsgált anyagok.....	43
4.1.1. <i>A vérplazma glicerofoszfamid és szfingofoszfamid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel</i>	43
4.1.2. <i>Az agyi glicerofoszfamid és szfingofoszfamid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel</i>	43
4.1.3. <i>Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására...</i>	45
4.1.4. <i>4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata</i>	45
4.2. Felhasznált vegyszerek.....	46
4.3. Állatkísérletek	46
4.3.1. <i>A vérplazma glicerofoszfamid és szfingofoszfamid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel</i>	46
4.3.2. <i>Az agyi glicerofoszfamid és szfingofoszfamid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel</i>	47
4.3.3. <i>Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására...</i>	47
4.4. Mintaelőkészítési módszerek	48
4.4.1. <i>A vérplazma glicerofoszfamid és szfingofoszfamid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel</i>	48
4.4.2. <i>Az agyi glicerofoszfamid és szfingofoszfamid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel</i>	49
4.4.3. <i>Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására...</i>	50
4.4.4. <i>4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata</i>	51

4.5. Alkalmazott műszerek, kromatográfiai oszlopok, módszerek és szoftverek.....	53
4.5.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfólipid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel	53
4.5.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfólipid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel	54
4.5.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására...	58
4.5.4. 4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata	62
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	65
5.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfólipid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel	65
5.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfólipid vizsgálata online 2D-UHPLC-HRMS módszerrel.....	72
5.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására.....	80
5.4. 4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata	88
6. Összefoglalás.....	96
7. Summary.....	100
8. Hivatkozások	104
9. Közlemények listája	112
9.1. Az értekezés alapját képező közlemények	112
9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó, az értekezésben fel nem használt közlemények	113
9.3. Előadások	114
9.4. Poszterek	115
9.5. Témavezetések	118
10. Köszönetnyilvánítás	119
11. Függelék.....	120

Az értekezésben használt rövidítések

1D	egydimenziós
1D-LC	egydimenziós folyadékkromatográfia
2D	kétdimenziós
2D-LC	általánosan a kétdimenziós folyadékkromatográfia
ACN	acetonitril
AGC	automatikus erősítésszabályozás
AM	felbontás
AMT	α -metiltriptamin
a.u.	önkéntes egység
C18	18 szénatom hosszúságú láncokat tartalmazó állófázis
CER	ceramid
CID	ütközéssel indukált disszociáció
CV%	variációs koefficiens %
DHPC	dorzális hippokampusz
DDA	adatfüggő mérés
DIA	adatfüggetlen mérés
DMT	<i>N,N</i> -dimetiltriptamin
EMCDDA	Kábítószer és a Kábítószer-függőség Európai Megfigyelőközpontja
ESI	elektroporlasztásos/elektrospray ionizáció
FA	hangyasav
FWHM	félértékszélesség
HILIC	hidrofil kölcsönhatási folyadékkromatográfia
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HR	nagy felbontás
HRMS	nagy felbontású tömegspektrometria
INMT	indoletilamin- <i>N</i> -metiltranszferáz
IT	gyűjtési idő
LC	folyadékkromatográfia
LC-MS	általánosan folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria

LOD	kimutatási (detektálási) határ
LOQ	meghatározási határ
<i>m/z</i>	tömeg/töltés
MRM	kiválasztott ionátmenet detektálása
MS	tömegspektrometria, tömegspektrométer
MS/MS	tandem tömegspektrometria
NP	normál fázis
NPLC	normál fázisú folyadékkromatográfia
NSZKK	Nemzeti Szakértői és Kutató Központ
OPLS-DA	ortogonális részleges legkisebb négyzetek diszkriminációs analízise
PA	foszfatidsav
PC	foszfatidil-kolin
PE	foszfatidil-etanolamin
PFC	prefrontális kéreg
PG	foszfatidil-glicerin
PI	foszfatidil-inozitol
RF	rádiófrekvencia
R_s	kromatográfiás felbontás
RP	fordított fázis
PRM	párhuzamos reakció monitorozás
RPLC	fordított fázisú folyadékkromatográfia
PS	foszfatidil-szerin
SIM	kiválasztott ionkövetés
SM	szfingomielin
<i>sn</i>	sztereospecifikus számozási rendszer
SRM	kiválasztott ionátmenet detektálása
THC	tetrahidrokannabinol
THF	tetrahidrofurán
TOF	repülési idő analizátor
t_R	retenciós idő
UHPLC	ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
VHPC	ventrális hippokampusz

1. Bevezetés

A **bioanalitika** az analitika biológiai minták analízisével foglalkozó tudományterülete, amely komplex folyamat, ami nem csak az analitikai mérést jelenti, hanem magába foglalja a felvetett biológiai kérdés megválaszolásához szükséges analitikai módszer megtervezését, a mintavételt, a mintaelőkészítést, a módszerfejlesztést, szükség esetén a validálást, az analitikai mérés végrehajtását és legvégül a kapott adatok kiértékelését és értelmezését [1].

Biológiai minták analízise során a vizsgált vegyületek forrásukat tekintve egyrésztől lehetnek a vizsgált szervezetben természetes módon jelenlévő anyagok azaz endogének, másrésztől a környezetből valamilyen módon bejutott/bejuttatott vegyületek (exogének), amelyek különböző biokémiai folyamatokban vesznek részt és alakulnak át.

Az „omikák” (*omics*) tudományterülete a biológiai molekulák egy csoportjának együttes vizsgálatát célozza meg, annak érdekében, hogy az egyes komponensek közötti összefüggések rendszerszintű megértése lehetővé váljon. Az omikákon belül megkülönböztetünk az örökítőanyag összességével foglalkozó genomikát, az RNS-sel és a gének átírásával foglalkozó transzkriptomikát, a transzláció során képződő fehérjéket vizsgáló proteomikát és az anyagcsere kis molekulatömegű termékeivel, azaz a metabolitokkal valamint azok útvonalával foglalkozó **metabolomikát**. A **lipidomika**, melyet gyakran a metabolomika részeként említenek, a sejtekben, szövetekben és biológiai folyadékokban található lipidek összességével foglalkozik.

Napjainkban a **folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás** (LC-MS) módszerek széles körű elterjedése figyelhető meg a gyógyszerkutatás (farmakológiai, farmakokinetikai vizsgálatok, hatóanyag kutatás, metabolizmus és toxikológia), az igazságügy, az élelmiszeripar, a népegészségügy, az orvos-biológiai kutatások (genomika, transzkriptomika, proteomika, metabolomika, biomarkerkutatás), az orvos-diagnosztika vagy akár a környezetvédelem bioanalitikai területein. Az **egydimenziós folyadékkromatográfia** az egyik legjelentősebb elválasztási technika az összetett biológiai mátrixok vizsgálatánál. A komplex minták metabolomikai, lipidomikai vagy proteomikai mérése során a nagyszámú komponensek koelúciója megnehezíthetik azok minőségi és mennyiségi meghatározását. Ezekre megoldást nyújthat az offline vagy online **kétdimenziós folyadékkromatográfias** (2D-LC) módszerek alkalmazása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Az összetett biológiai minták elemzésénél elengedhetetlen a vizsgálandó anyagok komponenseinek elválasztása, melynek kiváló módszerei a kromatográfias technikák. A kromatográfias elválasztás az eltérő fizikai-kémiai tulajdonságú komponensek két fázis közötti (mozgó- és állófázis) elválasztásán alapul. A különböző kromatográfias módszerek csoportosítása történhet a mozgó- és állófázis halmazállapota szerint. Napjainkban az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a folyadékkromatográfia (LC) azon belül a nagyhatékonyságú (HPLC) és az ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (UHPLC) technika. Ez egy olyan oszlopkromatográfias módszer (állófázis), ahol a mozgófázis folyadék, melynek áramlása kényszeráram hatására jön létre [2–4].

A LC módszereket az álló- és mozgófázis fázisviszonya alapján különböző osztályokba sorolhatjuk, amelyek közül a leggyakrabban alkalmazott a normál fázisú folyadékkromatográfia (NPLC), a fordított fázisú folyadékkromatográfia (RPLC) illetve a hidrofíl kölcsönhatási kromatográfia (HILIC).

A **normál fázisú folyadékkromatográfia** az egyik legrégebbi módszer, mely során poláris tulajdonságú vegyületeket választanak el poláris állófázison apoláris, vízmentes mozgófázis segítségével. A normál fázisú folyadékkromatográfiaiban a nagy mechanikai stabilitása miatt a leginkább elterjedt állófázis a szilikagél (80–90%), emellett gyakoriak még az alumínium-oxid (5–10%) és a szilikagélhez kötött poláris csoportot tartalmazó állófázisok (5–10%) is. A poláris csoportot tartalmazó kémiaiilag módosított töltetekkel (amid, amino, ciano, diol, nitro stb.) a szilikagélnél megfigyelt, a víz által okozott dezaktiváló hatás csökkenthető, valamint a szelektivitás növelése érhető el [4].

A mozgófázisok jellemzésére bevezették az eluenserősség fogalmát, mely megadja a vizsgált komponensek visszatartásának mértékét az adott folyadékkromatográfias módban. A normál fázisú folyadékkromatográfia esetében a mozgófázis apoláris jellegének csökkenésével növelhető az eluenserősség és így csökken a vizsgált vegyületek visszatartása. A normál fázisú elválasztás során leggyakrabban alkalmazott mozgófázisok a hexán, heptán és izooktán (gyengébb elúciós képességű oldószerek). A klórozott szénhidrogének, mint a diklóromtán,

diklórétán vagy a kloroform használatával növelhetjük a kevésbé apoláris szerves anyagok oldhatóságát. A normál fázisú folyadékkromatográfiában az erősebb oldószerek közé az éterek, észterek és alkoholok tartoznak [4].

A **hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (HILIC)** az olyan kis molekulatömegű, nagy polaritású és ionos vegyületek vizsgálatára jött létre, melyek más folyadékkromatográfias módszerek egyikével sem, vagy nehezen vizsgálhatók. Habár az ionos és ionos formába hozható molekulák elválasztására a fordított fázisú ionpár kromatográfia és az ioncserés kromatográfia is alkalmazható, a nagy polaritású, protonfunkciós csoportot nem tartalmazó vegyületek esetében az elválasztás csak HILIC alkalmazásával oldható meg [4,5].

A HILIC elválasztás során az állófázis polárisabb, mint a mozgófázis. HILIC állófázisként az apoláris felületű állófázisokat kivéve, szinte az összes folyadékkromatográfiában alkalmazott állófázis használható, mint a szilikagél, fém-oxid (alumínium-oxid, cirkónium-oxid, titán-dioxid), polárisan módosított szilikagél (amid, amino, nitril, diol módosított), anioncserélők, kationcserélők, zwitter-ionos (kettős ionos) és speciálisan módosított állófázisok. HILIC elválasztás során a fizikailag szorbeálódott víz határfelületi réteget képez, amelybe a vizsgált vegyületek beoldódnak a vízdékonyságuktól függően. Minél nagyobb egy komponens vízdékonysága, annál több időt tölt a határfelületi rétegben, így annál nagyobb lesz a retenciós ideje. A másik fontos visszatartást megszabó tényező az erős ionos (ioncserés) kölcsönhatás, különösen a módosított szilikagél állófázisokon [4,6,7].

HILIC-ben használt mozgófázisnak kevésbé polárisnak kell lennie az állófázishoz képest és kis mennyiségben vizet kell tartalmaznia, mivel a vizsgált komponensek eltérő vándorlási sebességét az állófázis felületén kialakult vízréteg és a mozgófázis közötti eltérő megoszlás fogja eredményezni. Ebből adódóan HILIC elválasztás esetében a víz lesz az erős oldószert, aminek növelésével a visszatartás csökkenthető. Ugyanakkor a víztartalom (az állófázistól és a vegyület szerkezetétől függően) nem haladhatja meg a 30–40 v/v%-ot, mert e fölött megváltozik a kromatográfias elválasztás mechanizmusa. A mozgófázisban a vízhez mellett a vízzel elegyedő, lehetőleg kis viszkozitású szerves oldószert alkalmaznak, amely leggyakrabban acetonitril (ACN). További mozgófázis szerves oldószerként lehet alkalmazni metanolt (MeOH), acentont és tetrahidrofuránt (THF), de utóbbi esetében figyelembe kell venni, hogy a polimerek nagy részét duzzasztja. HILIC alkalmazásánál további kritikus szempont a megfelelő puffer vagy mozgófázis adalék alkalmazása.

Mivel a módszer 60–70%-ban acetonitril és metanol tartalmú, így szerves alapú pufferek használata ajánlott, melyet – főleg MS detektálásnál és a szilárd anyag kiválást elkerülve – leggyakrabban 5–50 mM koncentrációban alkalmaznak. Pufferként és mozgófázis adalékként használatos anyagok például az ammónium-acetát, ammónium-formiát, hangyasav, ecetsav és trifluoecetsav [4,6,7].

A módszer nagy előnye, hogy változatos szerkezetű vegyületek elválasztására alkalmas, mint például semleges vegyületek, melyek poláris csoportot tartalmaznak (pl. polihidroxi vegyületek), savas jellegű funkciós csoportot tartalmazó vegyületek, bázikus funkciós csoportot tartalmazó vegyületek és ionos vagy ionizálható vegyületek választhatók el. A HILIC elterjedésének további magyarázata, hogy tömegspektrometriás detektálással (MS) kompatibilis, így nagyon poláris vagy ionos vegyületek vizsgálatára adhat megoldást, melyeket fordított fázisban nem, vagy csak ionpárpépző aditívek hozzáadása után lehet elválasztani, amelyek az MS mérést zavarják. A fentiek ismeretében elmondható, hogy mára a HILIC jelentős szerepet tölt be a hagyományos kromatográfiai módszerek között [4,6,7].

A **fordított fázisú folyadékkromatográfia** alkalmazása napjainkban a legelterjedtebb technika, melyet főként apoláris anyagok elválasztására használnak egy apolárisabb állófázis és egy polárisabb mozgófázis segítségével. Az állófázis kémiaiilag módosított szilika, amelynek felületét leggyakrabban hidrofób alkil (C_2 , C_4 , C_8 , C_{18} és C_{30} tagszámú), fenil, perfluorozott-fenil, ciklohexil vagy ciano csoportokkal tesznek apolárisabbá. Minél hosszabb a szénlánc, annál inkább hidrofób karakterű lesz az állófázis, mely rendszerint a retenció növekedésével jár. Az alkil lánc hosszának hatása a visszatartásra telítési görbével jellemezhető, melynek maximuma $-C_{12}$ körül van, azaz a szénatomszám növelése a retenciós tényező értéke nem változik jelentősen. Ennek ellenére mégis a C_{18} -as állófázis terjedt el, amely *Horváth és munkatársai* nevéhez fűződik. Napjainkban a modern szilikagél alapú állófázisok 10 μm alatti átlagos szemcseátmérőjű, homogén eloszlású, alacsony fémtartalmú teljesen porózus részecskékkel töltöttek, melynél a szemcse teljesen gömbszimmetrikus, a felületét nem borítják mélyedések vagy kiugrások. A kis szemcseméretű porózus töltetek előnye, hogy mechanikailag stabilabbak, ezáltal nagyobb nyomáson is működnek (akár 1000–1400 bar), valamint a szemcsét körülvevő álló folyadékfilm okozta zónaszélesedés kisebb. A 2 μm alatti töltetekkel rendelkező állófázisok használatával nagyobb kromatográfiai felbontás érhető el, ezáltal az összetett minták hatékonyabban vizsgálhatók. Jellemzően ilyenek a biológiai minták, mint a teljes vér, vérplazma,

vizelet, különböző szervi, szöveti extraktumok. Az elmúlt évek másik nagy sikere a 2 µm alatti teljesen porózus töltetek mellett a héjszerkezetű töltetek [4].

A mozgófázis általában egy vagy több szerves oldószer, víz és mozgófázis adalék keveréke. A fordított fázisú folyadékkromatográfiában leggyakrabban alkalmazott mozgófázisok a víz mellett az ACN, etanol (EtOH), MeOH, 2-propanol és THF. A 2-propanolt nagy viszkozitásuk miatt csak ritkán alkalmazzák. A vegyületeket elúciós sorrendje a növekvő hidrofób tulajdonság szerint változik. A mozgófázis poláris jellegének csökkentését, azaz elúciós erejének növelését további szerves oldószer hozzáadásával érhetjük el, szemben a normál fázisú vagy HILIC elválasztási módszerekkel [2,5].

Nem meglepő, hogy napjaink legnépszerűbb kromatográfiai módszere, hiszen a mozgófázis kismértékű változtatásával a retenció könnyen szabályozható az elválasztandó anyagok széles skáláján, a kis molekuláktól egészen a biológiai makromolekulákig.

Biológiai minták vizsgálatokor különösen igaz, hogy az elválasztani kívánt komponensek kromatográfiai tulajdonságai nagymértékben eltérnek egymástól, ilyenkor az izokratikus elválasztás során – amikor is az eluensösszetétel nem változik a mérés alatt – a nagyobb megoszlási hányadossal jellemzett komponensnek nagyobb visszatartása mellett nagyobb csúcshélesség és rosszabb kromatográfiai csúcshimmetria figyelhető meg. Az eluenserősség növelésével viszont a korábban eluálódó vegyületek közötti felbontás romlik, holtidőben történő elúció és/vagy koelúció léphet fel. Erre a problémára az egyik megoldás a gradiens elúció alkalmazása, amely során változik a mozgófázis összetétele. A vizsgált vegyületek visszatartásának csökkenését több paraméter változtatásával is el lehet érni, így beszélhetünk oldószer gradiensről, áramlási sebesség gradiensről, hőmérséklet gradiensről, pH gradiensről, ionpár- vagy só gradiensről. Azt a függvényt, amely szerint időben eltérő módon változtatjuk az alábbi paraméter(ek)e)t nevezzük gradiens alaknak. A fent említett mindhárom kromatográfiai elválasztási módszer leggyakrabban az mozgófázis gradiens alkalmazza. Fontos figyelembe venni, hogy gradiens elúció alkalmazásával a mérés során megváltozik az állófázis felülete, ezért a következő mérés előtt vissza kell állítani a kezdeti körülményeket. Ezt hívjuk az oszlop egyensúlyozásának vagy ekvibrációnak. Az azonos kondíció tartása a mérések között kritikus a reprodukálhatóság szempontjából [4].

2.2. Kétdimenziós folyadékkromatográfiai technikák

Napjainkban egyre nagyobb szükség van az összetett biológia minták mérésére, így az egydimenziós folyadékkromatográfia (1D-LC) az analitikai kémia egyik legjelentősebb elválasztási technikájává vált. A komplex minták metabolomikai, lipidomikai vagy proteomikai mérése során a nagyszámú komponensek koelúciója megnehezíti a minőségi és mennyiségi meghatározásukat. Erre megoldást nyújthat a két- illetve multidimenziós kromatográfia, amely két (vagy több) folyadékkromatográfiai rendszer összekapcsolása. A kétdimenziós kromatográfiánál három főbb technikai megvalósítás különböztethető meg: „offline”, „online”, és „szakaszos” elrendezés [8–10].

Az **offline 2D-LC** analízis során a két dimenzió nincs egymással fizikailag közvetlenül kapcsolatban. Az első oszlopról megadott időközönként gyűjtött frakciók mérése később egy másik kromatográfiai módszerrel történik. A módszer előnye, hogy rendkívül rugalmas, így nem szükséges a gyűjtés sorrendjében mérni a frakciókat. További előnye, hogy a második dimenziós elválasztás optimalizálható a frakciók összetételétől függően, ezért a második dimenzióban az egyes frakcióra eltérő kromatográfiai módszer alkalmazható. A módszer hátrányaként említendő, hogy idő és munkaigényes. A módszer kivitelezését tovább nehezíti, hogy az összegyűjtött frakciókat megfelelően tárolni és előkészíteni kell a további analízisig [11].

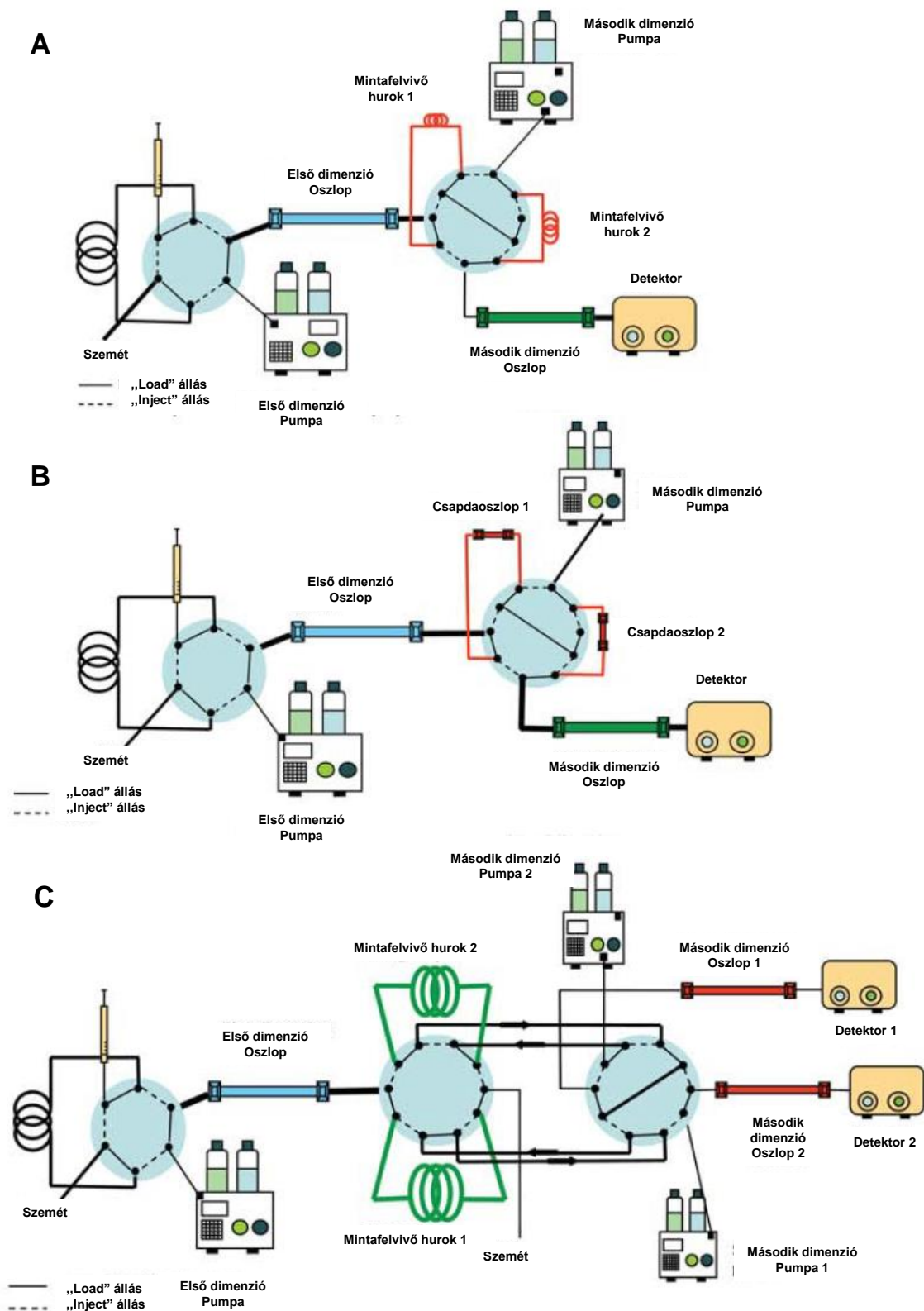
Az **online 2D-LC (1. ábra)** esetén – az offline elrendezéssel ellentétben – a két dimenzió fizikailag is közvetlenül össze van kötve egymással egy többutas kapcsolószelep (általában 6, 8, 10 vagy 12) segítségével. A szelepbe két azonos térfogatú mintafelvívő hurok (*loop*) van bekötve. Amíg az első dimenzió eluátumának frakció gyűjtése az egyik hurokba történik, addig párhuzamosan a korábban másik hurokba gyűjtött frakció elválasztása történik a második dimenzióban. A szelep váltás során a két hurok működési ciklusa felcserélődik (**1A ábra**) [12,13]. Hurok alkalmazása – mely passzív mintaátviteli eljárás (*passive modulation*) – egy egyszerű és hatékony módszer, azonban használatkor ügyelni kell az oldószer összeférhetlenségre különösen ortogonális elválasztáskor, mivel a második dimenzióban a minta oldószere az első dimenziónál használt mozgófázis lesz. Erre nyújt megoldást, ha a hurokban lévő minta a második dimenzió mozgófázisával van hígítva (*active-solvent modulation*) vagy pedig vákuum és a hurok köré szerelt fűtőszálak segítségével elpárologtatjuk az oldószert (*vacuum-evaporation modulation*). Másik korlátozó tényező a hurok térfogata,

mely nem lehet túl nagy a második dimenziós oszlop túlterhelésének elkerülése érdekében, de nem lehet túl kicsi se, hogy elegendő mennyiségű első dimenziós mintát lehessen gyűjteni [14].

Az első oszlopról a frakciók csapdázása történhet hurok helyett oszlopon is (csapdaoszlop, *stationary-phase-assisted modulation*). Csapdázásra általában egy rövid, 2–30 mm hosszú, 1–6 mm belső átmérőjű oszlopot használnak. A módszer során ameddig az egyik csapdaoszlop az első dimenzió eluátumából a vizsgált vegyületek csapdázódnak, addig az előző ciklusban a másik csapdaoszlopon gyűjtött minta eluálódik a második dimenzió oszlopára. Ez a beállítás lehetőséget ad a minta dúsítására a csapdaoszlopon, melynek eredményeként keskeny csúcsokat kaphatunk a második dimenzióban (**1B ábra**). Csapdaoszlop alkalmazásának előnye, hogy csökkenteni lehet a hurok esetében tapasztalt oldószer összeférhetetlenséget. A módszer további előnye, hogy a dúsítás következtében érzékenyebb detektálás érhető el, valamint a frakció gyűjtés során a térfogat nem korlátozó tényező (a hurokkal ellentétben), addig amíg visszatartja a mérendő komponenseket. Ugyanakkor ez adja a módszer hátrányát is, ezért is fontos a megfelelő mozgó- és állófázis kiválasztása, hogy a különböző tulajdonságú vegyületeket egységesen vissza lehessen tartani. Erre megoldást nyújt az első dimenzió effluentjének eluenserősségének csökkentése hígító pumpa segítségével. További hátrány, hogy a módszerfejlesztés során még több kromatográfias körülményt kell optimalizálni [13,14].

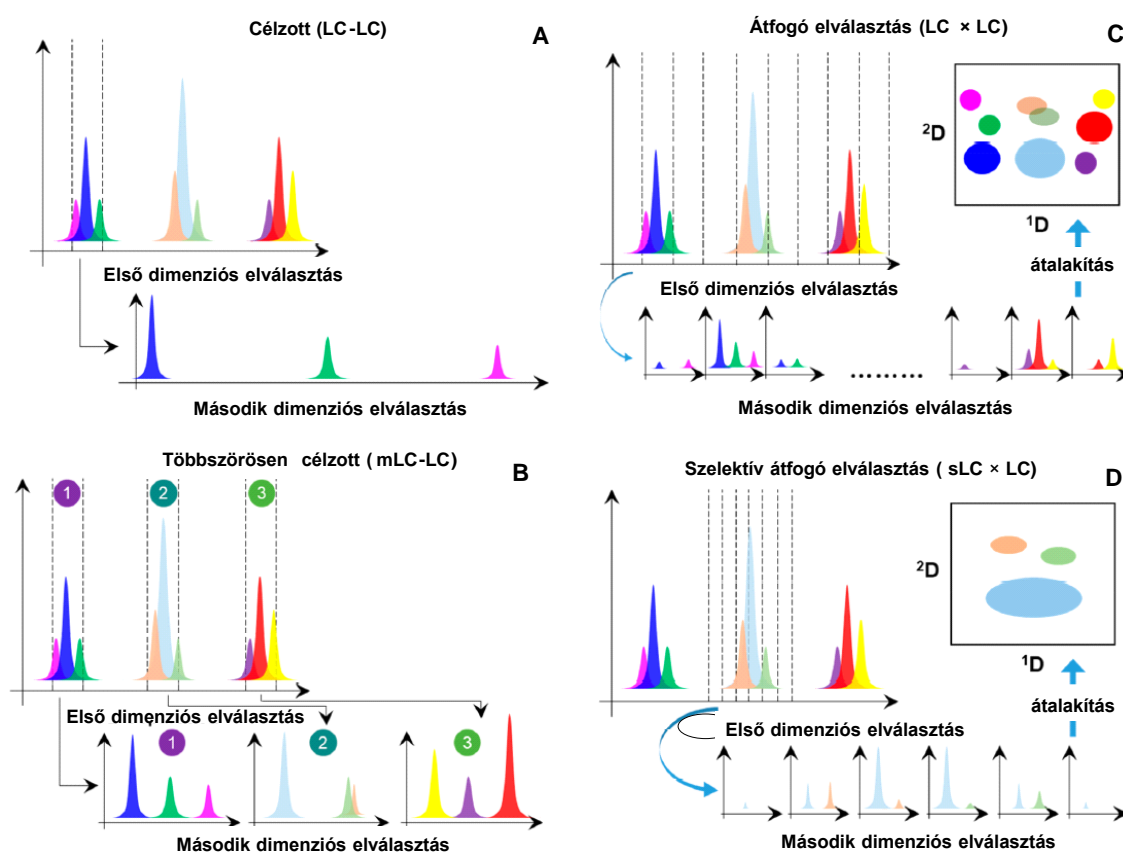
Az online 2D-LC rendszer további kapcsolási lehetősége a párhuzamos oszlopok alkalmazása a második dimenzióban két detektor használatával. Az adatok kiértékelése során gondosan kell eljárni, mivel ekkor az egymást követő frakciók mérése párhuzamosan történik, ezért a két kromatogram és a kapott adatok egyeztetése szükséges (**1C ábra**) [13].

Az online módszer legnagyobb előnye, hogy gyors és könnyen automatizálható. Ugyanakkor be kell látni, hogy egy ilyen rendszer kivitelezése bonyolult, több kromatográfias eszközre van szükség, mint például megfelelő szeleprendszerre, analitikai pumpákra és oszloptermosztát(ok)ra. Nagy körültekintéssel kell megválasztani a mozgófázis összetételét különösen az ortogonális módszereknél, hiszen a második dimenzióban a minta oldószere az első dimenziónál használt mozgófázis lesz. További hátrány, hogy a második dimenzióban a gradiens elúció lehetősége korlátozott, mivel az oszlop egyensúlyozása hosszabb időt vesz igénybe a gyűjtött frakciók számától és az első dimenziós analízis idejétől függően [12,15].



1. ábra Az online 2D-LC módszer sematikus ábrája, (A) a frakciók csapdázása hurokkal, (B) csapdaoszloppal, valamint (C) párhuzamos oszlopokkal a második dimenzióban [16].

A **szakaszos** („*stop-and-go*”) módszer alkalmazásakor az első dimenziós elválasztást eluálását megszakítják, majd az első frakció második dimenziós elválasztása történik. A második dimenziós mérés befejezésével folytatódik az első dimenziós elválasztás. A módszer előnye az offline 2D-LC-hez képest, hogy a két oszlop közvetlenül össze van kapcsolva (hurok vagy csapdaoszlop nélkül), így a frakciók gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos technikai problémák kiküszöbölhetők [11]. A módszer legnagyobb hátrányát az adja, hogy a megállított áramlás során jelentős diffúzió lép fel, amely csúcshévesedéshez vezet. A kismolekulákra ez a viselkedés különösen jellemző. Ennek köszönhetően a szakaszos technika nem terjedt el széles körben [17], ugyanakkor nagyobb molekulák, például peptidek esetén sikeresen alkalmazzák [18].



2. ábra A kétdimenziós elválasztás különböző típusai [14].

Mindhárom kétdimenziós módszer végrehajtható átfogó vagy teljes, illetve az úgynevezett „heart-cutting” módszerrel a frakciók gyűjtésétől függően, melyet a **2. ábra** szemléltet. (Az utóbbi kifejezést a továbbiakban **célzott** módszerként használom, mert jelenleg nincs magyar szakirodalmi megfelelője, és a módszer technikáját tekintve így

célszerű alkalmazni). A célzott módszernél (*single heart-cutting*, LC–LC, **2A ábra**) az első dimenzióból csak egy, a számunkra érdekes frakció kerül kivágásra, majd a második dimenzióban újabb elválasztásra. A **többszörösen célzott** módszer (*multiple heart-cutting*, mLC–LC, **2B ábra**) esetén, több frakciót gyűjtenek a második dimenziós elválasztáshoz. Célzott módszerek esetén csapdaoszlop használatával a második dimenzióban kisebb térfogatú oszlop alkalmazása is elegendő, mivel az első dimenzió nagy része a hulladékgyűjtőbe kerül. Ez lehetővé teszi a második dimenzióban rövidebb oszlopok használatát a hatékonyság csökkenése nélkül, így jelentősen rövidülhet a teljes analízis idő. Ilyen esetben fontos, a megfelelő csapdaoszlop kiválasztása, amelyet a nagy nyomásingadozás és a magas nyomási körülmények között is használni lehet [14].

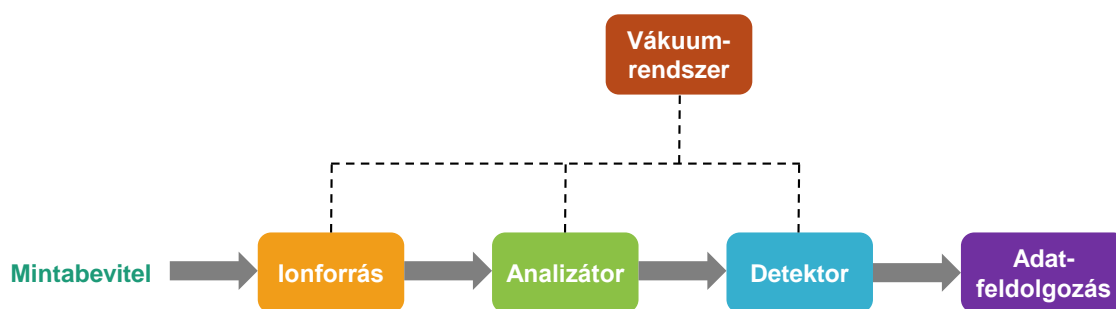
Abban az esetben, ha az első dimenzió összes frakcióját vizsgáljuk a második dimenzióban, **átfogó** elválasztásról (*comprehensive*, LC × LC, **2C ábra**) beszélünk. Ilyen esetben a hurok alkalmazása a második dimenziós futási idejét korlátozza, mivel a szelepváltást a hurok térfogata és az első dimenzió áramlási sebessége és a második dimenzió egyensúlyozása határozza meg, így a második dimenziós elválasztás általában gyors. Ha az első dimenzióban történt elválasztás egy specifikus régióját a második dimenzióban választják el, akkor **szelektív átfogó** technikáról (*selective comprehensive*, sLC × LC, **2D ábra**) beszélünk. Az átfogó módszert főleg ismeretlen minták nem célzott mérése esetén alkalmazzák, mikor a fő cél a lehető legtöbb komponens azonosítása egyetlen futásból. Ez a megközelítés lehetővé teszi összetett biológiai minták hatékonyabb elválasztását. Így tehát elmondható, hogy a célzott módszer a minta kis alkotóelemeire összpontosít, míg az átfogó elválasztás a mintáról teljes jellemzés adhat [14].

A kétdimenziós kromatográfias rendszer hatékonysága és az elválasztandó komponensek száma növelhető, ha a két dimenzió ortogonális, azaz eltérő az elválasztás mechanizmusa. Ez különböző szelektivitású oszlopok kombinációjával érhető el úgy, hogy a két dimenzióban a retenciók között ne legyen lineáris kapcsolat. Számos kromatográfias elválasztási mód választható a szelektivitás széles skáláján, mint a méret, a hidrofobicitás vagy a töltés. Például foszfolipidek analízise során gyakran a HILIC kromatográfiát kapcsolják össze fordított fázisú kromatográfiával, ezáltal a HILIC első dimenzióban a lipid osztályokat a fejcsoportok, azaz a polaritásuk szerint választják el, míg a második dimenzióban az azonos lipidosztályhoz tartozó specieszek fordított fázisú elválasztása a zsírsav alkil láncok száma, a kettős kötések száma és azok elhelyezkedése alapján történik, így lehetővé téve az izomerek elválasztását [13,19].

Felmerülhet a kérdés, hogy az adott mintánál a hagyományos egydimenziós módszer vagy a kétdimenziós elválasztás lesz a hatékony. Általánosságban elmondható, hogy a 2D módszerhez szükséges műszerek drágábbak és több felhasználói tapasztalatot igényelnek. Ugyanakkor a 2D nyújtotta nagyobb kromatográfias felbontóképesség lehetősége nagyon vonzó, így egy ponton az előnyök meghaladják a magas költségeket. Ennek ellenére az 1D módszer mellett szól, hogy az esetek túlnyomó többségében rövidebb analízisidőt igényel [9].

2.3. Tömegspektrometria

A kromatográfias eljárások spektrofotometriás detektálással önmagukban nem, vagy csak mérsékelten adnak információt a vizsgált vegyületek kémiai szerkezetéről. Ezért ismeretlen vegyületek azonosítása céljából, különösen biológiai minták esetében a vizsgált vegyületek elválasztását követően (online, offline) olyan detektálási technikát kell alkalmaznunk, amely során részleges vagy teljes szerkezeti információt nyerhetünk. Erre kiváló megoldást nyújt a tömegspektrometriás (MS) analízis, amely használatával a vizsgált vegyületekkel kapcsolatban a következő főbb információkat nyerhetjük: szülőion és fragmensionjainak tömeg/töltése (m/z), intenzitásuk és fragmentációs mintázatuk [20].



3. ábra A tömegspektrométer vázlatos felépítése.

A tömegspektrométer három fő részből épül fel: ionforrásból, tömeganalizátorból és detektorból (3. ábra). A mintát a készülékbe történő bevezetés során ionizáljuk az ionforrás segítségével, majd az így képződő ionokat tömeg/töltésük (m/z) alapján az analizátor szétválasztja, majd azok a detektorba jutva elektromos jelet váltanak ki. Általánosan elmondható, hogy a tömegspektrométer analizátor és detektor

egysége vákuum alatt működik, azonban az ionforrások kialakításuktól függően lehetnek vákuum alatt illetve légköri nyomáson [20].

1. táblázat A leggyakoribb ionizációs technikák.

Ionizációs módszerek	Rövidítések
Elektronütközéses ionizáció	EI
Kémiai ionizáció	CI
Gyors atom bombázás	FAB
Elektroporlasztásos ionizáció	ESI
Légköri nyomású kémiai ionizáció	APCI
Mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció	MALDI
Légköri nyomású fotoionizáció	APPI
Direkt analízis valós időben	DART

Az ionok előállítására a tömegspektrométerben számos módszert fejlesztettek ki, melyek közül a leggyakoribbakat az **1. táblázat** foglalja össze. Az ionizációs technikától függően képződhetnek pozitív vagy negatív töltésű gyökionok vagy kvázi molekulaionok (adduktok). A gyökionok az elektronütközéses ionizáció (EI), kémiai ionizáció (CI) és gyors atom bombázás (FAB) során – amely nagyvákuumban történik – pozitív töltésűek lesznek egy vagy több elektron leadásával és negatívak egy vagy több elektron felvételével. A légköri nyomású ionizációk (ESI, APCI, APPI) során jellemzően a vizsgált vegyület protonálódhat vagy deprotonálódhat, valamint különböző ionokkal, mint például nátrium-, kálium-, ammónium-, acetát-, formiát-, kloridionokkal kvázi-molekulaionokat képezhetnek [21].

Napjaink egyik legelterjedtebb folyadékkromatográfiával kompatibilis ionizációs módszere az **elektroporlasztásos** (elektrospray) **ionizációs** technika (ESI). Az értekezésben alkalmazott mérések során minden esetben ESI módszert alkalmaztunk, így a továbbiakban csak erről az ionizációs technikáról írok részletesebben. Az ionok képződése során két fontos folyamat játszódik le párhuzamosan az ionforrásban. Egyrészt az oldószer elpárologtatása (deszolvatáció) és így a mérendő komponensek gázfázisba juttatása, másrészt a töltött részecskék előállítása. Fontos megjegyezni, hogy az ESI technika, szemben az EI vagy CI-val, úgynevezett „lágý” ionizációs módszer, amely során a szülőion nem, vagy részben

fragmentálódik. A leggyakoribb két ionizációs technikát összehasonlítva az APCI esetében döntően csak egyszeresen töltött ionok, míg ESI során többszörösen töltött ionok is képződhetnek [21].

A vizsgált minta oldatát egy 3–5 kV nagyfeszültségre kapcsolt fűtött fém kapillárisba vezetik, ahol a kapilláris végén töltést vesz fel. Ezzel egy időben, a folyadék a kapillárist körülvevő csőből kiáramló porlasztógáz (*nebulizing gas*) segítségével porlasztódik. A feszültségnek köszönhetően a kapilláris végén úgynevezett Taylor-kónusz alakul ki, melyről kis töltött cseppek szakadnak le. Az ionizáció folyamata a mai napig nem teljesen ismert. A töltésvisszamaradási modell szerint az oldószer párologni kezd a 200–500 °C-os szárítógáz (*drying gas, desolvation gas*) hatására, a cseppek zsugorodnak, míg el nem érik azt a kritikus pontot, ahol a felületi tasztító erők legyőzik a felületi kohéziós erőket, így szétrobbannak. Ezt a jelenséget nevezik Coulomb-robbanásnak, melynek hatására ionok és kisebb töltött aeroszol cseppek keletkeznek. Az ionpárolgási elmélet szerint az iontasztítás miatt kisebb töltött cseppek egymás után hagyják el a nagyobb töltött cseppeket, végül a cseppek addig zsugorodnak, amíg az ionok vissza nem maradnak. Utóbbi modell elsősorban a kisebb molekulatömegű vegyületek ionizációjára illeszthető, addig a nagyobb molekulák ionképzésére inkább a töltésvisszamaradási modell alkalmazható. A porlasztás során visszamaradt ionok a nagyvákuum alatt lévő analizátorba juttathatók egy apró lyukon (*orifice*) és lencsesoron keresztül [4,21].

Az analizátorokat az alábbi főbb paraméterek szerint lehet jellemezni: vizsgálható tömegtartomány, tömegpontosság, felbontás és pásztázási sebesség.

A tömegpontosság (*accurate mass*, AM) a készülék megfelelő kalibrációja mellett, azt fejezi ki, hogy az analizátor mekkora eltéréssel képes mérni az adott ion tömegét a valós (elméleti) tömegéhez képest. A tömegpontosságot Daltonban (Da, abszolút tömegpontosság) vagy ppm-ben (az eltérés hány milliomod része a mért tömegnek; relatív tömegpontosság) szokták megadni. Utóbbi pontosabb értéket ad. Az ionok elválasztásának paramétere a felbontás (R , dimenziómentes szám), melyet a csúcs magasságának felénél mért szélességgel (Δm , félértékszélesség, *full width at half maximum*, FWHM) kell számolni, az **1. képlet** szerint:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{[1. képlet]}$$

Nagy felbontású tömegspektrométerrel (*high resolution mass spectrometry*: HRMS) elemösszetételre is következtethetünk [22].

Jelenleg különféle hagyományos (*single*: MS) és tandem (MS/MS) tömeganalizátorok közül választhatunk, melyek mindegyike eltérő érzékenységgel és felbontással rendelkezik. A leggyakoribb analizátorokat a **2. táblázat** foglalja össze. A kvadrupól és ioncsapda nagy érzékenységet, de korlátozott felbontást kínál, míg a TOF, FT-ICR és Orbitrap analizátorok nagy felbontásúak. Nagy érzékenységük és szelektivitásuk miatt célzott analíziseknél a hármas kvadrupól és hármas kvadrupól ioncsapda analizátorok a leggyakoribbak. Átfogó analízisre a Q-TOF, FT-ICR, LTQ-Orbitrap és Q-Orbitrap készülékek a legalkalmasabbak a nagy felbontásuknak és nagy tömegfelbontásuknak köszönhetően. Átfogó mérésekhez LC-hez kapcsoltan leggyakrabban TOF vagy Orbitrap analizátorokat használnak [5,22].

A tömegspektrométerben az analízis során képződött és elválasztott ionok intenzitásának pontos méréséhez fontos szempont a megbízható detektor. A kereskedelmi forgalomban a leggyakoribb típusok: elektronsokszorozó detektor, fotodióda detektor, mikrocsatornás lemezdetektor vagy Faraday-csésze detektor. A detektor a mérés során felvesz egy tömegspektrumot, ahol az x-tengelyen az m/z értékek, míg az y-tengelyen az intenzitások szerepelnek. A relatív intenzitás az ionionáramához (abszolút intenzitás) viszonyított, %-ban kifejezett értéke. A spektrumon látható legintenzívebb ion a bázision, a legintenzívebb csúcs pedig a báziscsúcs [20,21].

2. táblázat A leggyakoribb hagyományos (MS) és tandem (MS/MS) tömeganalizátorok.

Analizátorok	Angol rövidítések
kvadrupól (MS)	Q
lineáris ioncsapda (MS)	LIT
kvadrupól ioncsapda (MS)	QIT
repülési idő (MS)	TOF
Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia (MS)	FT-ICR
Orbitrap (MS)	Orbitrap
hármas kvadrupól (MS/MS)	TQ/QqQ
hármas kvadrupól ioncsapda (MS/MS)	Q-Trap
kvadrupól repülési idő (MS/MS)	Q-TOF
lineáris kvadrupól ioncsapda Orbitrap (MS/MS)	LTQ-Orbitrap
kvadrupól Orbitrap (MS/MS)	Q-Orbitrap

Munkánk során két készüléssel dolgoztunk: egy Thermo TSQ Fortis hármas kvadrupól és egy Thermo Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap tandem tömegspektrométerekkel, ezért a továbbiakban hármas kvadrupól és az Orbitrap tömeganalizátorokat mutatom be részletesebben. Mindkét készülék esetében a vizsgált vegyületek fragmentációs mintázata tanulmányozható.

A tandem tömegspektrometria során a tömeganalízis több lépcsőben történik, mely során az egyes lépcsők között az ionok aktiválásával fragmentációt idéznek elő. A tandem tömegspektrometriában ionátmeneteket, azaz prekursor ion–termékion kapcsolatokat vizsgálunk. A **kvadrupól tömeganalizátor** négy párhuzamos fémrúdból épül fel. A fémrudakra egyenáramot kapcsolnak, a szemben lévő rudakra azonos fázisú váltóáramot helyeznek, míg a szomszédos rudak polaritása ellentétes. A rudak polaritása folyamatosan változik, ennek következtében az ionok haladási irányukra merőleges transzverzális mozgást végeznek. A rudak közötti térben haladó pozitív töltésű ionokat a pozitív töltésű rudak taszítják, míg a negatív töltésűek vonzzák, ezáltal oszcilláló mozgásra kényszerülnek. Ha az ionok mozgásának amplitúdója kisebb a kvadrupól rudak közötti távolságánál, akkor átjutnak a kvadrupól pólusai között. Amennyiben az amplitúdó ezt meghaladja, beleütköznek a rudakba. Felbontóképessége a fémrudak hosszának növelésével nő, míg a rudak keresztmetszetének növelése az érzékenységet fokozza. A **hármas kvadrupól** (QqQ) valójában két kvadrupól analizátorból áll (Q_1 és Q_3), a második kvadrupól (q_2) egy ütközési cella, ahol a fragmentáció történik. A fragmentáció előidézéséhez aktiválásra van szükség, melyet leggyakrabban ütközéssel indukált disszociációval (*collision induced dissociation*, CID) érnek el nitrogén vagy argon ütközőgáz segítségével [4,23].

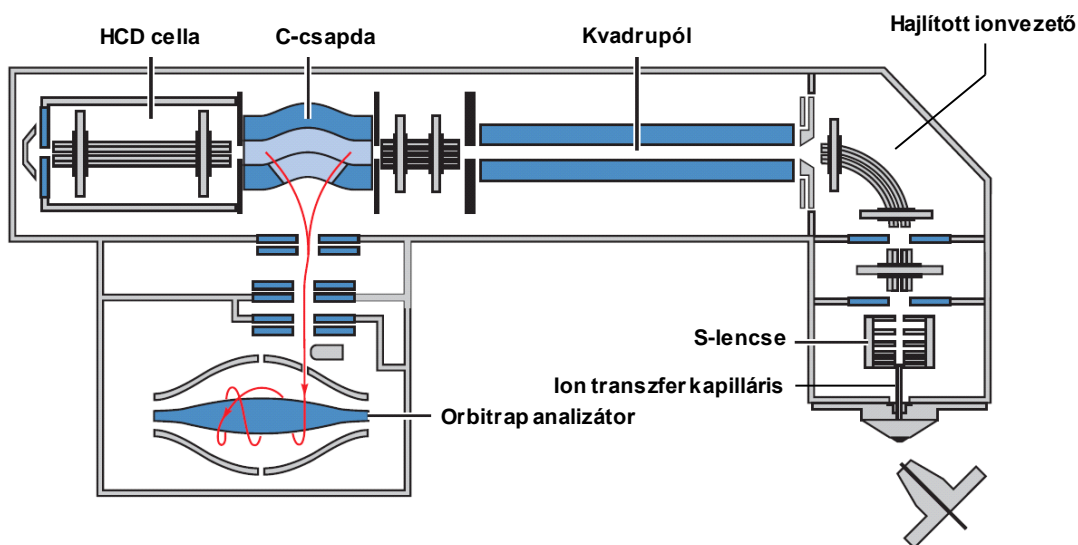
Gyártótól és készüléktől függően több pásztázási módot alkalmazhatunk hármas kvadrupólok esetében. Teljes tömegspektrum pásztázásakor a Q_1 és Q_3 is pásztázó üzemmódban (*full scan*) működik és az ütközési cellában nincs fragmentáció. Szelektív ionkövetéskor (*selected ion monitoring*, SIM) a Q_1 egy adott tömegre van beállítva, az ütközési cellában nem történik fragmentáció, a Q_3 pedig pásztázó üzemmódban van. Termékion pásztázás (*product ion scan*) esetén a Q_1 egy adott tömegre van állítva, q_2 -ben megtörténik a fragmentáció, majd a Q_3 pásztázó módban van. Ezzel a beállítással szerkezeti információ nyerhető a kiválasztott prekursor ionról, valamint mennyiségi vizsgálatokhoz az átmenetek optimalizálása is ebben a módban történik. Kiválasztott ionátmenet detektálásakor (*multiple/selected reaction monitoring*, MRM/SRM) a Q_1 a prekursor ion, a Q_3 a termékion követésére van állítva. Általánosan elfogadott szabály,

hogy tandem tömegspektrometriás mennyiségi meghatározáskor két ionátmenet detektálása szükséges: az intenzívebb ion, a célion (*quantifier*) a mennyiségi meghatározáshoz, míg a másik ion, a kísérőion (*qualifier*), valamint az ion intenzitások aránya szolgál a minőségi azonosításra. MRM/SRM beállítás esetén az érzékenység és a szelektivitás is növelhető, ha a komponens az adott elúciós ablakban vizsgáljuk a megfelelő, csak rá jellemző ionátmenet megválasztásával. Az érzékenység javulás a zajcsökkentés révén növekvő jel/zaj viszonynak is köszönhető. Prekursor ion pásztázásakor (*precursor ion scan*) a Q_1 pásztázó módban működik, miközben a Q_3 egy adott ion követésére van állítva. Így lehetőség van felderíteni, hogy az adott fragmentum, melyik prekursor ionból vagy ionokból származik. Semleges vesztes pásztázása (*neutral loss scan*) esetében a Q_1 és a Q_3 is pásztázó módban van, de a Q_3 pásztázása egy meghatározott tömeggel el van tolva [4,23].

Az **Orbitrap tömeganalizátor** egy nagyteljesítményű analizátor, amely az ionokat elektrosztatikus mezőben csapdázza, így nagy felbontást, tömegpontosságot és érzékenységet nyújt. A ThermoFisher Scientific cég kifejlesztette az Exactive családot, melynek költségeit az ioncsapda analizátor elhagyásával csökkentette. Ez szükségessé tette az AGC (automatikus erősítésszabályozás, *automatic gain control*) mechanizmus kidolgozását, melyet csak Orbitrap detektálásnál használnak. Ezenkívül a Q Exactive készülékek megkönnyítették az ismert és ismeretlen anyagok analízisét nagy felbontású és tömegpontosságú (HR/AM) méréssel, melyet nagyon magas szelektivitással értek el (kevesebb, mint 5 ppm tömegpontosság). Így a Q Exactive család az alkalmazások széles skáláját biztosítja az átfogó mérésektől, a mennyiségi meghatározáson át, egészen az elemi összetétel meghatározásáig. Az **4. ábrán** egy Q Exactive típusú kvadrupól-Orbitrap készülék szerkezeti ábrája látható [24,25].

A C-csapda (*C-trap*) előtti kvadrupól szolgál az adott m/z értékű ionok kiválasztására, mely készüléktől függően széles tömegtartományt ölel át (50–6000 m/z). (A Q Exactive készülékek hibrid tandem tömegspektrométerek, mivel kéttípusú analizátorral rendelkeznek.) A C-csapda egy rádiófrekvencia (RF) alapú iongyűjtő, mely az ionokat később a HCD cellába (*higher-energy C-trap dissociation*) vagy az analizátorba küldi. A HCD cella szolgál az ionok fragmentálására, mely a már említett ütközéssel indukált disszociációval (CID) megy végbe nitrogéngáz segítségével. A C-csapdából az ionok kis csomagokban érkeznek az Orbitrap analizátorba, ahol az ionok elválasztását nagyszámú, a m/z -től függő eltérő frekvenciájú oszcillációs mozgásuk teszi lehetővé. A készülék egy időben változó, látszólagos ionáramot rögzít és a

tömegspektrumot a mért frekvenciajel Fourier-transzformációjával kapjuk. Az Orbitrap így analizátorként és detektorként is működik [24,25].

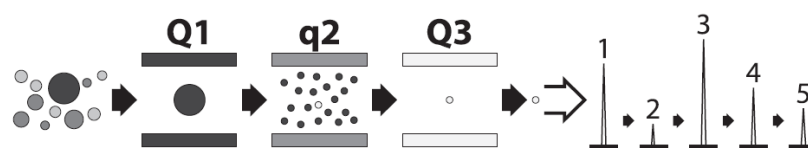


4. ábra Q Exactive-típusú tömegspektrométer szerkezeti ábrája [24].

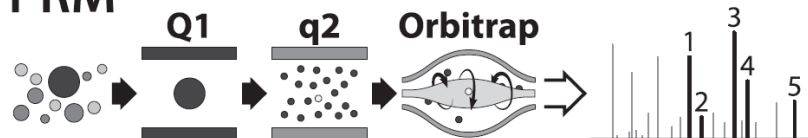
Q Exactive készüléktől függően, különböző üzemmódokat alkalmazhatunk: teljes tömegspektrum rögzítése, az összes ion fragmentációja (*all ion fragmentation*, AIF), SIM, párhuzamos reakció monitorozás (*parallel reaction monitoring*, PRM), adatfüggő (*data dependent acquisition*, DDA), adatfüggetlen mérés (*data independent acquisition*, DIA) és ezek kombinációja. Adatfüggő mérés során a teljes tömegtartomány mérése történik, majd a spektrumban található adott számú legintenzívebb prekursor iont egyenként fragmentálja, és a keletkezett fragmensionok tömegeit egy MS/MS spektrumban rögzíti. Ezzel szemben az adatfüggetlen mérés során a kiválasztott tömegtartomány összes ionját egyszerre fragmentáljuk, ennek köszönhetően több információ nyerhető az adott mintáról, ugyanakkor az információ kinyerése is nehezebb [25,26].

Az 5. ábrán látható, hogy míg a hármas kvadрупólnál alkalmazott SRM technikával csak a kiválasztott termék ionokat detektáljuk, addig PRM esetén egy cikluson belül keletkezett adott ütközési energiájú (CE) összes fragmens iont nagy felbontással és nagy tömegpontossággal mérjük [25,26].

A SRM



B PRM



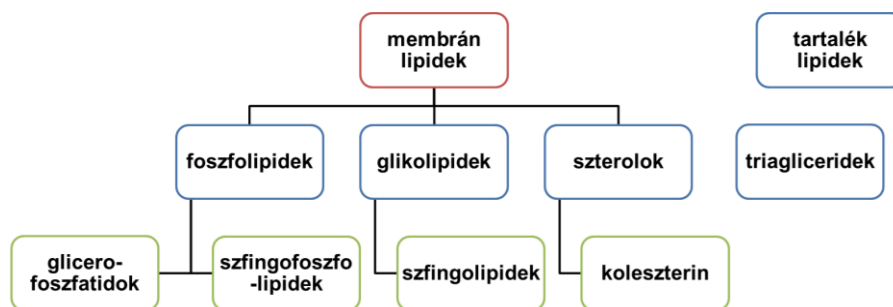
5. ábra MS/MS mérési módszerek összehasonlítása, (A) SRM módszer, (B) PRM módszer [26].

A tömegspektrometriás analízissel kapott adatok kiértékelését jelentősen befolyásolja, hogy a mérés milyen pásztázási módban történt és volt-e az MS detektálás előtt valamilyen elválasztási technika, mint például LC-ás vagy gázkromatográfiás elválasztási technika. Célzott, mennyiségi mérések kiértékelése történhet a gyártó saját szoftverével vagy szabad hozzáférésű programokkal. Átfogó méréseknél az adatkiértékelés több lépésből áll, ahhoz hogy azonosítani tudjuk a mintában található komponenseket az MS adatok szűrésére és feldolgozása szükséges. A vizsgált anyagok prekursor és fragmensionjairól (MS/MS mérés esetében) csúcslista készül, mely magába foglalja az adott ionok kromatográfiás csúcsainak simítását (*smoothing*), a retenciós idejük korrigálását, az alapvonal korrekcióját, dekonvolúcióját, az izotópcsúcsok szűrését, adott ionok kizárását és csúcsterület vagy csúcsmagasság normalizációját. A kiértékelés során kapott csúcslista elemeit adatbázisokkal és könyvtárakkal vethetjük össze azonosításuk céljából manuálisan vagy megfelelő program segítségével. Proteomikai, metabolomikai és lipidomikai LC-MS/MS mérésekhez több fizetős és ingyenes csúcslista készítő program és adatbázis/könyvtár érhető el a teljesség igénye nélkül: Compound Discoverer, TraceFinder, mzCloud, Mzmine2, Skyline, MaxQuant, XCMS Online, KEGG, HMDB, METLIN, MassBank, LIPID MAPS, LipidSearch, LipidBlast, Metaboanalyst stb. Munkánk során az átfogó mérésekkel kapott adatok kiértékelését Progenesis Q1 metabolomikai szoftverrel (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Egyesült Királyság) végeztük.

2.4. A foszfolipidek szerepe a szorongásos megbetegedésekben

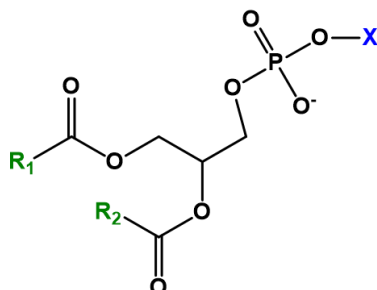
Az elmúlt évtizedekben a bioanalitika fejlődése egyre nagyobb mennyiségű biológiai adatot generált, amellyel molekuláris komponensek átfogó vizsgálata vált lehetővé. Az „omikák” (*omics*) tudományterülete a biológiai molekulák egy csoportjának együttes vizsgálatát célozza meg, annak érdekében, hogy az egyes komponensek közötti korrelációk rendszerszintű megértése lehetővé váljon. Az omikákon belül megkülönböztetünk az örökítőanyag összességével foglalkozó genomikát, az RNS-sel és a gének átírásával foglalkozó transzkriptomikát, a transláció során képződő fehérjéket vizsgáló proteomikát és az anyagcseretermékekkel, azaz metabolitokkal valamint azok útvonalával foglalkozó **metabolomikát**. A **lipidomika**, melyet gyakran a metabolomika részeként említenek, a sejtekben, szövetekben és biológiai folyadékokban található lipidek összességével foglalkozik. A szervezetbe bejutott xenobiotikumok (gyógyszerek, mérgek, kábítószeres stb.) anyagcsere vizsgálatát is metabolomikának hívják [27, 28].

A lipidek csoportjába kémiaiailag egymástól jelentősen különböző biomolekulák tartoznak, azonban egy közös sajátosságuk, hogy részlegesen vagy teljesen hidrofóbak/lipofílek, azaz vízben nem vagy rosszul oldódnak. A sejt membránok fő alkotói (**6. ábra**), a foszfolipidek amfipatikus tulajdonságúak, azaz egy molekulán belül hidrofób és hidrofil részekkel is rendelkeznek. Doktori munkám során foszfolipidek vizsgálatával foglalkoztam, ezért a továbbiakban csak erre a vegyületcsoportra térek ki. A foszfolipidek poláris hidrofil részét „fejnek”, a hosszú zsírsavláncok (12–26 szénatom) alkotta hidrofób részt pedig „faroknak” nevezzük. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően a foszfolipidek lipid kettősréteg kialakítására, tehát a biológiai membránok felépítésére képesek [29].



6. ábra A membránlipidek csoportosítása, a trigliceridek, foszfolipidek és glikolipidek vázlatos szerkezetével [30].

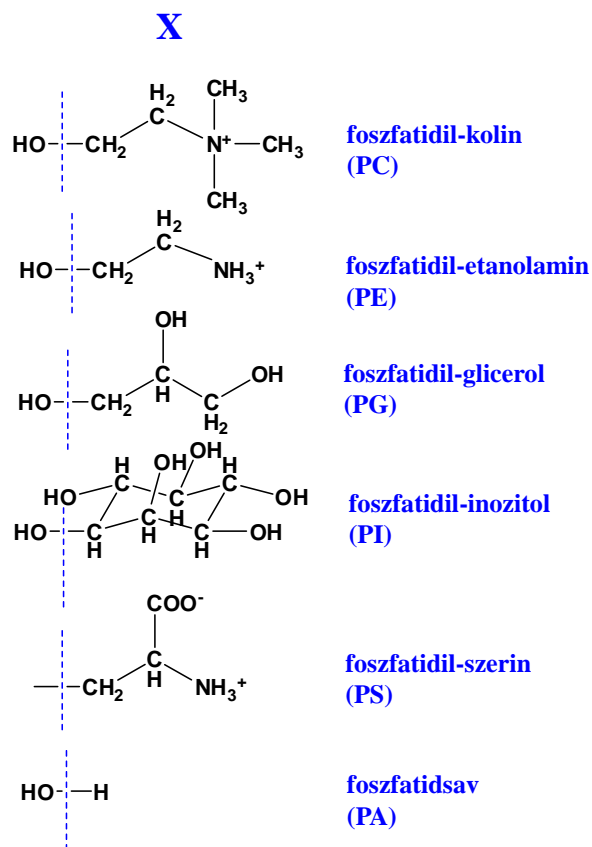
A foszfolipidek kémiai szempontból két csoportra oszthatók attól függően, hogy milyen alkohol lehet a foszforsavval és a zsírsavval észterezve. Glicerofoszfátidok (foszfogliceridek) esetében glicerín, míg szfingofoszfólipideknél szfingozin észterésítődik [31].



7. ábra A glicerofoszfátidok általános molekula szerkezete, ahol R_1 és R_2 a zsírsav lánc, X = fejcsoportot meghatározó vegyület.

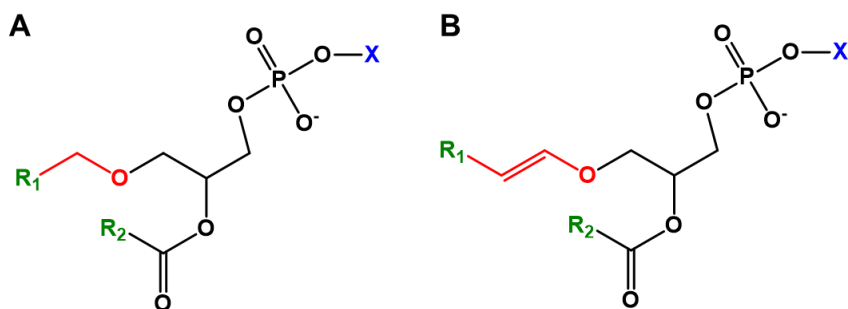
A **glicerofoszfátidok** szerkezetét egy glicerín váz adja, ahol a glicerín első két szénatomját (*sn-1* és *sn-2*, lásd később) hosszú zsírsavlánc, míg a harmadikat egy foszfát észterésíti (**7. ábra**). Ez a legegyszerűbb glicerofoszfátid, a **foszfátidsav (PA)**. A legtöbb esetben a foszfátcsoporthoz egy további hidroxilcsoportot tartalmazó vegyület kapcsolódik, kialakítva a teljes fejcsoportot. Így beszélhetünk foszfátidil-kolinról, foszfátidil-etanolaminról, foszfátidil-glicerínről, foszfátidil-inozitolról és foszfátidil-szerinről (**8. ábra**).

A **foszfátidil-kolin (PC)**, vagy más néven lecitin, a legnagyobb mennyiségben előforduló foszfolipid az állati és növényi sejtekben, mely akár a membránt alkotó foszfolipidek felét adhatja. A **foszfátidil-etanolamin (PE)**, vagyis kefalin kisebb mennyiségben fordul elő a sejtekben, mint a PC. Jelentősége a baktériumokban van. A **foszfátidil-glicerín (PG)** baktériumokban, emlős és növényi sejtekben egyaránt megtalálható. Az emlősökben nagy mennyiségben van jelen a mitokondriumok membránjában, valamint számos protein kináz aktiválásában vesz részt. A **foszfátidil-inozitol (PI)** legnagyobb koncentrációban az idegrendszerben található. Feladata a hormonok és neurotranszmitterek hatásának közvetítése. A **foszfátidil-szerin (PS)** a sejtmembránok kisebb alkotóeleme, az emlősökben gyakorlatilag az egyetlen foszfolipid, melyek aminosavat (szerin) tartalmaz [32].



8. ábra A glicerofoszfatid molekula fejcsoportjai.

A foszfolipidekből vezethetők le a **lizofoszfolipidek**, amelyek a glicerinnmolekula *sn*-2 szénatomján nem tartalmaznak zsírsavésztert. A lizofoszfolipid-monoacil származékokat a legtöbb sejt kis koncentrációban tartalmazza [31].

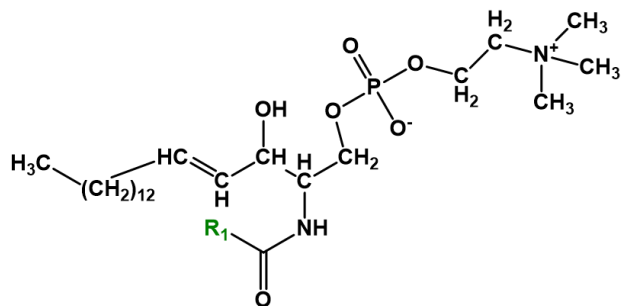


9. ábra A plazmánsav (A) és plazménsav (B) szerkezete.

A **plazmánsav** és **plazménsav** (9. ábra) a sejtekben nem fordul elő, azonban a származékaik elterjedtek. (A plazménsavak származékainak összefoglaló neve a plazmalogén). A plazmánsavak esetében a glicerinn első szénatomjának

hidroxilcsoportjához éterkötéssel kapcsolódik egy telített alifás láncú alkohol. A plazménsavak pedig éterkötés helyett enoléter kötéssel rendelkeznek, valamint kettős kötést tartalmazó telítetlen alkohol kapcsolódik hozzájuk. Elsősorban izom- és idegmembránokban fordulnak elő [32].

A szfingofoszfolipidek (szfingolipidek) közül a **szfingomielin (SM)** (10. ábra) az egyetlen foszfolipid. A szfingomielin vázát nem glicerín, hanem szfingozin adja. Az *sn*-2-höz aminocsoport csatlakozik, amelyhez ha további zsírsav kapcsolódik savamid kötéssel, akkor ceramidot kapunk. A szfingomielinben a **ceramid** primer alkohol csoportjához egy kolin-foszfát kötődik. Fontos a szerepe a membrán merevségének fenntartásában, valamint a lipid tutajokban található fehérjék stabilizálásában van [32,33].



10. ábra A szfingomielin (SM) szerkezete.

Az állati és emberi szervezetben általában 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 és 20:4 zsírsavat tartalmazó foszfolipidek fordulnak elő, de a központi idegrendszer molekulái között előfordulhatnak hosszabb szénláncú, többszörösen telített zsírsavak is, például 20:5, 22:5, 22:6 [31].

A foszfolipid osztályok nevezéktana, azaz a kétbetűs rövidítés, a molekulában helyet foglaló zsírsavlánc szénatomjainak száma és a kettős kötések száma alapján történik. A IUPAC rendszer a sztereospecifikus számozási rendszert alkalmazza (*sn*, *stereospecific numbering*), így a korábban említett és az ábrákon is látható R_1 és R_2 zsírsavláncot *sn*-1 és *sn*-2-nek nevezi. Ezt a molekula rövidített neve után zárójelben vagy anélkül tüntetjük fel. Például a **PC 36:0** esetén egy olyan foszfatidilkolin osztályba tartozó molekuláról beszélünk, amely két darab telített zsírsavláncot tartalmaz és a két zsírsavban összesen 36 szénatom található. Ha a vizsgált molekula **PC 18:0/18:1**, akkor a foszfatidil-kolinban az *sn*-1 pozícióban lévő zsírsav 18 szénatomos és telített, míg az *sn*-2 ugyanilyen hosszúságú, azonban egyszeresen telítetlen [33–35].

A lipidek mint sejt és sejtmembrán alkotók meghatározó szerepet játszhatnak több betegség kialakulásában. A pszichiátriai rendellenességek egyik leggyakoribb megbetegedése a **szorongás**. A betegség életkortól függetlenül bárkit érinthet, a páciens gyakran meg sem tudja jelölni a betegségének pontos kezdetét, mivel a tünetek legtöbbször lassan, fokozatosan fejlődnek ki. A betegséget testi és lelki tünetek kísérik és a beteg viselkedése is megváltozik. A fóbiás és szorongásos zavarokat a betegségek nemzetközi osztályozására szolgáló kódrendszer szerint több kategóriába sorolhatjuk, mint a szociális fóbia, agorafóbia, pánikzavar, generalizált szorongás stb. [36,38].

Az állatkísérleteknek köszönhetően sikerült feltérképezni a neurális pályarendszert, amely kapcsolatban állhat a szorongással. A rágcsálókön végzett vizsgálatokból kiderült, hogy az alábbi agyterületek játszanak kulcsfontosságú szerepet a fenyegetés észlelésében, a szorongás feldolgozásában és a válaszreakció kivitelezésében: az amigdala, az accumbensmag, a hippocampus, a ventromediális hipotalamusz, az agyvízvezeték körüli (*periaqueductalis*) szürkeállomány, a talamusz magvai, az insularis kéreg és néhány prefrontális régió. Az evolúció során ezek a fő alkotók a különböző állatfajokban tovább öröklődtek, így hasonló funkciókat töltenek be az ember esetében is [39].

A szorongást és félelmet szabályozó neurokeringés összeköttetésben van a stresszválaszt kiváltó neuronális körökkel, ezért néhány agyi régió mindkét folyamat irányításában szerepet játszik. Ilyen terület a hipotalamusz–hipofízis–mellékvesekéreg tengely, amely aktiválódásával kortizol hormon szabadul fel a mellékvesekéregből. A stresszválasz mellett a szorongás kialakításában is szerepet játszik. A kortikotropinfelszabadító hormon (vagy kortikoliberin) túltermelődése a hipotalamusz által szintén szorongásszerű tüneteket mutat. A hipotalamusz kortikoliberint termelő neuronjainak szabályozásában az amigdala és a hippocampus vesz részt. Ha az amigdala túlzottan aktív, nő a kortikoliberin elválasztás és a szervezet stressz hiányában is reakciót vált ki. A hippocampus feladata ezzel szemben a kortikoliberin termelés gátlása, ezért a hippocampus működésének csökkenése szintén szorongásos betegségekhez vezet. A hippocampus és az amigdala információt kapnak a prefrontális kéregből, amely agyterület többek között a személyiség irányításáért, az absztrakt gondolkodásért és az érzelmek koordinálásáért felelős [39,40].

A lipidek meghatározó szerepet játszanak a neurális folyamatokban, ezért az agy lipid összetétele jelentősen befolyásolhatja a szubjektív érzékelést, a hangulatot és a viselkedést. A plazmamembránban található foszfolipid kettősréteg határt képez az

extra- és intracelluláris tér között. A lipidek meghatározzák a fehérjék helyzetét és működését a membránon belül, befolyásolják az exo- és endocita folyamatokat, valamint másodlagos hírvivőként működhetnek. Hidrolízisük során mindkét irányban elhagyhatják a sejtmembránt, hogy jeleket továbbítsanak az intracelluláris kompartmentek vagy más sejtek felé [41].

A depresszió és szorongásos megbetegedések gyakran együtt fordulnak elő, mely betegségek kialakulása nem teljesen tisztázott. A mai ismereteink szerint különböző agyi régiókon és szabályozó mechanizmusokon keresztül állnak kapcsolatban. Mindkét betegség kialakulásában a plazmamembránt alkotó glicerofoszfátidok és szfingofosfolipidek meghatározó szerepet játszanak [41].

A foszfolipidek különböző osztályú specieszei széles koncentráció tartományban fordulnak elő a biológiai mintákban, ezért a megfelelő mintaelőkészítés alkalmazása kulcsfontosságú az analízisükhöz. A mintaelőkészítés során a foszfolipidek dúsítása mellett a komplex biológiai mátrix egyéb zavaró komponenseinek (fehérjék, szacharózok egyéb kis molekulák) eltávolítása is fontos szempont. A leggyakrabban alkalmazott módszer a *Folch* vagy *Bligh and Dyer* folyadék–folyadék extrakció. Az extraháló szer kloroform, metanol és víz keveréke, mely kiválóan alkalmas a foszfolipidek extrakciójára. További folyadék–folyadék extrakciós mintaelőkészítési módszer *Matyash és munkatársaihoz* köthető. Az extrakció során a kloroform helyett *tert*-butil metil-éter szerepel. Előnye ennek a módszernek, hogy a számunkra fontos szerves fázis felül helyezkedik el, így annak gyűjtése során nem kell átnyúlnunk a vizes fázison. A folyadék-folyadék extrakció mellett szilárd fázisú extrakciós mintaelőkészítési módszerek is elterjedtek a foszfolipidek dúsítására. A szilárd fázisú extrakció során főként ciano-, amino- és diol- csoportot tartalmazó tölteteket használnak [36,42,43].

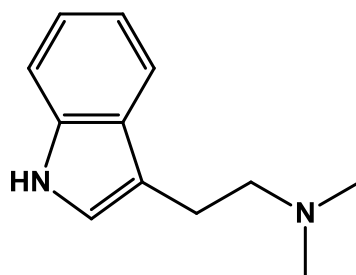
A foszfolipidek tömegspektrometriás mérése során az irodalomban számos módszer megtalálható. Korábban elterjedt módszer volt a foszfolipidek direkt infúziós tömegspektrometriás mérése, amely során nem használtak elválasztástechnikát az MS detektálás előtt. Napjainkban biológiai minták elemzésére a legelterjedtebb módszer az LC-MS kapcsolt technika [33,36,42,43]. Amíg a foszfolipidek fordított fázisú elválasztásakor az állófázison való visszatartásukat a zsírsavlánc szénatomjainak és kettőskötéseinek száma határozza meg, addig a normál fázisú és HILIC módszereknél az elválasztás alapját a poláris fejcsoport hidrofil tulajdonsága szabja meg [28,44,45]. A lipidek pontos azonosításához LC-MS mérések során nem elég a pontos tömeg és az

MS/MS spektrum, hanem a retenciós idő is fontos paraméter, melyet az ekvivalens szénatomszám modell (*equivalent carbon number model*) ír le. Fordított fázisú elválasztás esetén a lipidek retenciója nő a zsírsavláncok szénatomjainak számával, és csökken azok telítettségének mértékével. Ennek ismeretében sok fals pozitív eredmény kiszűrhető, melyeket az izobárok, szerkezeti izomerek vagy egyéb kvázi-molekulák okozhatnak [46].

A biológiai rendszerekben előforduló nagyszámú foszfolipidek hatékonyabb elválasztására megoldást jelenthet a kétdimenziós kromatográfia alkalmazása. Az első online átfogó 2D-LC-MS rendszert *Nie és munkatársai* írták le, mely során az oldószer összeférhetlenség elkerülésére oldószer elpárologtatást alkalmaztak. Ez volt az első tanulmány mely bemutatta, hogy a 2D-LC alkalmazásával csökkenhet az ionelnyomó hatás és ezáltal nőhet az érzékenység [36].

2.5. Az N,N-dimetiltriptamin terápiás céllal történő adagolása iszkémiás állatokban

Az *N,N*-dimetiltriptamin (**DMT**, **11. ábra**) egy indol alkaloid vegyület, amely természetes módon megtalálható több növényben és állatban. Dél- és Közép-Amerikában évszázadok óta fogyasztják különböző rituálékhoz növényi főzetként (ayahuasca, hoasca, yagé), spirituális és gyógyítási céllal. Ezeket a spirituális főzeteket a régióban őshonos növények gyökeréből, cserjékből és szőlőből készítették, melyeket az őslakosok az istenekkel való kommunikáció megkönnyítésének céljából használtak. A sámán rituálék beszámolóí alapján, a fogyasztók békésnek érezték magukat, főleg a növényekben található **DMT** pszichoaktív hatásának köszönhetően. *Strassmann és munkatársai* a 90-es években a **DMT** hatásait vizsgálták, melyből kiderült, hogy bizonyos dózis felett (0,2 mg/ttkg) intenzív hallucinogén hatásokat vált ki emberekben. Ezek után nem meglepő, hogy napjainkban Európába és Észak-Amerikába is eljutott élvezeti szerként [47,48].



11. ábra A dimetiltryptamin szerkezete.

Az endogén **DMT** bioszintézise egy esszenciális aminosav, a triptofán dekarboxilezésével kezdődik, mely során triptamin keletkezik. Ezt egy metilezési lépés követi, melyet egy *N*-metiltranszferáz (például indoletilamin-*N*-metiltranszferáz, INMT) enzim végez, melyhez a metil csoportot az *S*-adenozilmetionin adja. A második enzimatis metilezéssel az *N*-metiltryptaminból **DMT** képződik, amely tehát a triptofán egyik metabolikus terméke [47,48]. Az INMT számos szövetben termelődik, legnagyobb mennyiségben a tüdőben, mellékvesében és a pajzsmirigyben. Előfordul placentában, vázizomban, szívizomban, vékonybélben, gyomorban, hasnyálmirigyben és nyirokcsomókban is, valamint koncentráltabban van jelen a gerincvelő elülső szarvában. Ugyanakkor nem csak a perifériás szövetekben, hanem az agyban is megtalálható. Ebből adódóan feltételezhető, hogy ahol INMT enzim található, ott **DMT** is [47].

A szomatikus sejtek által termelt **DMT**-ről kiderült, hogy oxidatív stressz hatására vagy oxigénhiányos (hipoxia) körülmények között a koncentrációja nő. Ugyanakkor a fiziológiai szerepe még mai napig nem tisztázott [49–52]. A **DMT** feltételezett idegsejteket védő hatását agyi és vese iszkémia modellekben alkalmazták, mely során csökkentették a vérellátást. A kísérleti rágcsálókba beadott szuprafiziológiás (a fiziológiás mennyiségnél magasabb) mennyiségű **DMT** csökkentette az agyi infarktust [53], valamint humán agykérgi neuron sejttényészetben elősegítette a sejtek túlélését [54].

Az elmúlt 60 év során számos tanulmány született, amelyekben különböző állati szövetekből, emberi vizeletből, vérből, gerincvelő folyadékból LC technikával endogén **DMT**-t és annak metabolitjait mutatták ki. Napjainkban a kismolekulák mennyiségi meghatározására biológiai mintákban az LC-MS/MS kapcsolt technika az egyik legelterjedtebb bioanalitikai módszer. Nagy érzékenységének és szelektivitásának köszönhetően, megbízhatóbb adatokat tud szolgáltatni, mint önmagában a

folyadékkromatográfia UV vagy fluoreszcens detektálással, ami igaz a **DMT** esetében is [55]. Csupán néhány közlemény számolt be az endogén **DMT** jelenlétéről emlősökben, például patkány tobozmirigy mikrodializátumában [50], patkány vesében, tüdőben, májban, agyban, nyúl májban és humán tüdőben [56]. Bizonyos nézetek szerint, ha külsőleg juttatjuk be a **DMT**-t a szervezetbe, az endogén szint kimutatása nem releváns a jelentős koncentráció különbség miatt [57]. Manapság a **DMT** mennyiségi meghatározását plazmából és agyból fordított fázisú kromatográfiához kapcsolt tandem tömegspektrometriás módszerrel határozzák meg.

A méréshez szükséges minta mennyisége kritikus pont, főleg farmakokinetikai vizsgálatoknál, vagy rágsálók idősoros vérvételénél, ahol kevés minta áll rendelkezésre. A másik kulcsfontosságú tényező a teljes futási idő, melyet a lehető legalacsonyabban érdemes tartani. A **DMT** szint meghatározásához olyan komplex biológiai mintákban, mint az agy és a vérplazma, a gradiens elúció alkalmazása elengedhetetlen. Emiatt a mérés teljes futási ideje megnő az oszlopmosás és az oszlop kiegyensúlyozásának idejével. A szakirodalomban a **DMT** kimutatására szolgáló, gradiens elúciót alkalmazó LC–MS/MS módszerek teljes futási ideje 11,5–25 perc közé tehető agy- és vérplazma minták esetében [58–61].

2.6. Szintetikus kannabinoidok és metabolitjaik

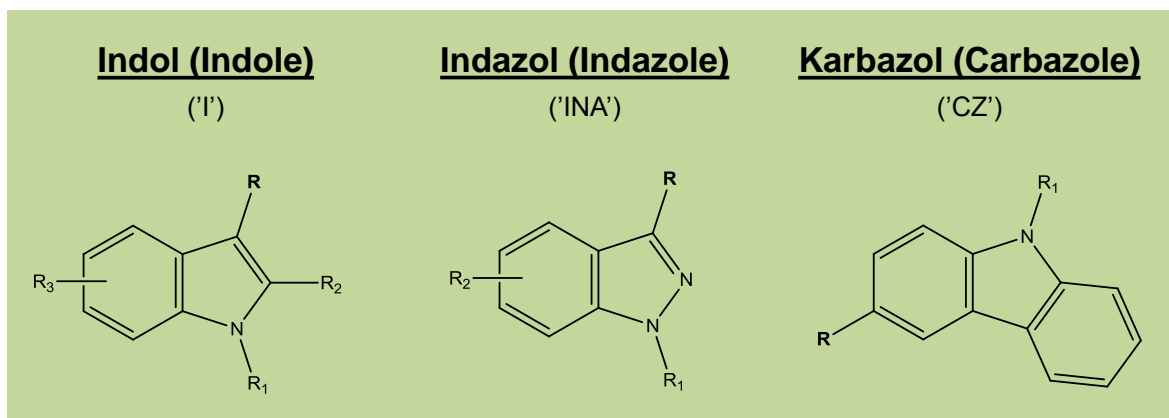
Az első szintetikus kannabinoidok cigarettaként elszívott növényi törmelékek voltak, melyek *Spice*, *Spice Gold* és *Spice Diamond* fantázianéven kerültek forgalomba a 2000-es évek közepén. A THC-hoz (tetrahidrokannabinol, a marihuána fő pszichoaktív hatóanyaga) hasonló hatásuk és legális mivoltuk miatt egyre népszerűbbé váltak, így több országban is tudósított a média a termékek internetes és bolti terjesztéséről. A hazai 2008. decemberi híradások visszhangja után az egyes boltok a *Spice* forgalmazását beszüntették, de rövidesen új néven és összetétellel (*Smoke*, *Aroma*, *Sence*) váltak ismét elérhetővé [62]. (A hétköznapi nyelvben gyakran használják a „biofű”, „herbál”, „fűszer”, „zsálya”, „varázsfű”, „legális fű”, „szinti-fű”, „füstölő” elnevezéseket, melyek szintén ezeket a termékeket jelölik.) A németországi analitikai vizsgálatokat követően a termékekben egy, a szakirodalomban már 1994-ben leírt szintetikus kannabinoidot mutattak ki, a JWH-018 vegyületet [63].

Nem csak a laikusok számára rendelkeznek nehezen értelmezhető nevezéktannal, hanem sokszor a vegyészek is könnyen elvesznek a szintetikus kannabinoidok rövidített vagy pár betűkombinációt tartalmazó neveiben. Eleinte az eladók a sikeres marketing céljából figyelemfelkeltő, a drog csábítására utaló neveket adtak a termékeknek, mint például AKB-48 (japán lányzenekar) vagy XLR-11 (az Egyesült Államokban repülőgépekhez kifejlesztett rakéta üzemanyag). Továbbá léteznek legitím tudományos célokra létrehozott szintetikus kannabinoid receptor agonisták, melyek elnevezése vagy az intézményre vagy az alkotó nevére utal. Ilyen vegyületek például a JWH (John William Huffman, vegyész), AM (AAlexandros Makiryannis, vegyész), WIN (Sterling-Winthrop, gyógyszeripari vállalat), HU (Hebrew University, jeruzsálemi egyetem) vagy a CP (Carl Pfizer, a Pfizer gyógyszergyár alapítója) [64].

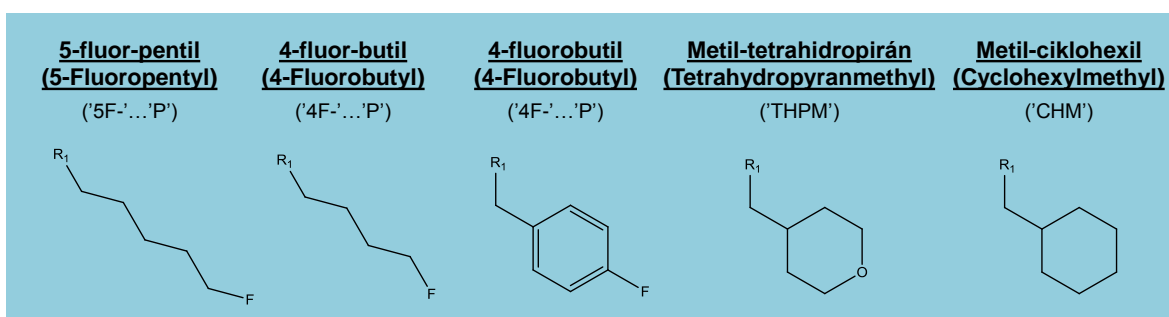
Ezek után belátható, hogy a terméknevek nem felelnek meg semmilyen kémiai osztályozásnak, ezért 2011-ben a Kábítószer és a Kábítószer-függőség Európai Megfigyelőközpontja (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) olyan szisztematikus elnevezést vezetett be, amely az egyes vegyületeket a négy csoportos farmakofór modell felhasználásával írja le (**12–16. ábra**):

- magcsoport (indol, indazol, karbazol)
- farok csoport (pentil, 5-fluoropentil, 4-fluorobutil, 4-fluorobenzil, tetrahidropiranyl-metil, ciklohexil-metil)
- kapcsoló csoport (metanon, etanon, karboxamid, karboxilát)
- és kapcsolt csoport, mely lehet ciklikus (adamantil, naftil, kumil, quinolinil) vagy nem ciklikus csoport (butanoát vagy aminobutanoát típusú).

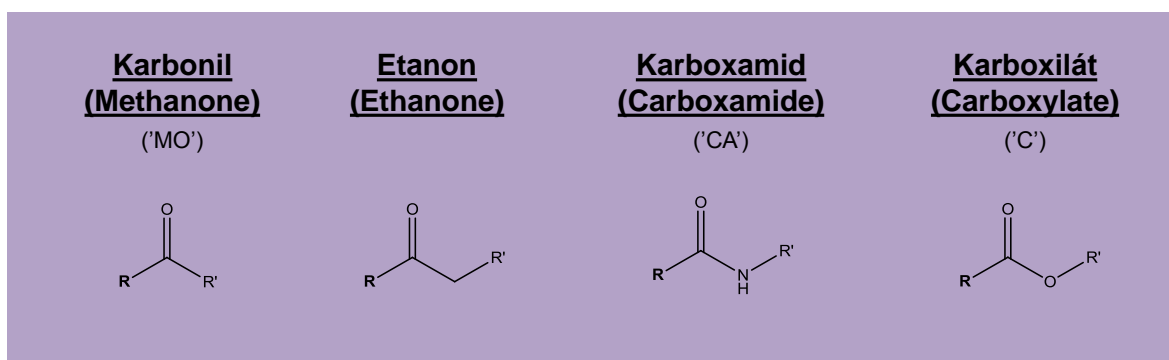
Az egyes csoportokban szereplő szerkezeti egységekhez ezután egyedi kódbetűt rendelnek, amely a „(Farok-)Kapcsolt csoport - FarokMagKapcsoló” formátumban adja meg az adott szintetikus kannabinoidot [65].



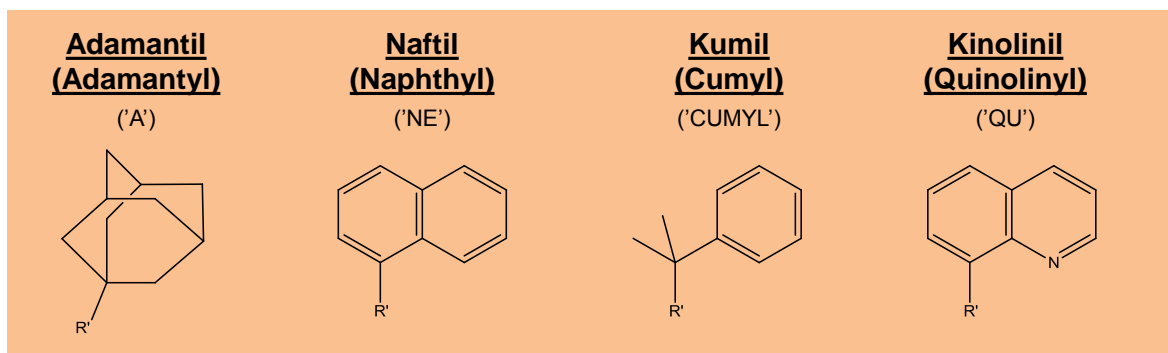
12. ábra A szintetikus kannabinoidok különböző mag típusai, zárójelben az angol és a rövidített megfelelőik [65].



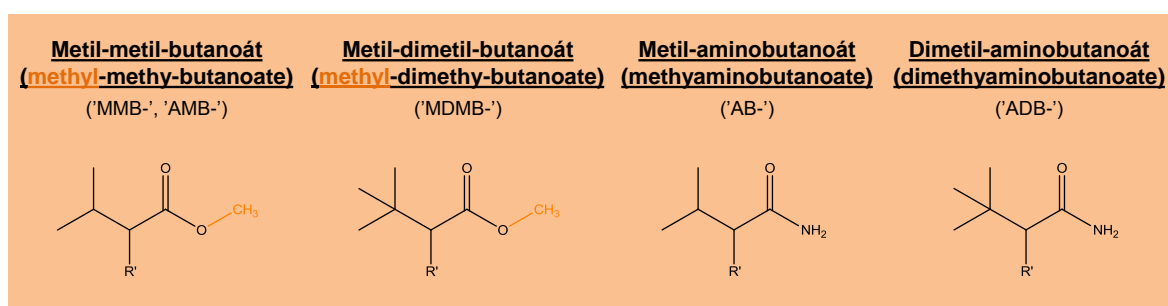
13. ábra A szintetikus kannabinoidok különböző fark típusai, zárójelben az angol és a rövidített megfelelőik [65].



14. ábra A szintetikus kannabinoidok különböző kapcsoló csoportjai, zárójelben az angol és a rövidített megfelelőik [65].



15. ábra A szintetikus kannabinoidok ciklikus kapcsolt csoportai, zárójelben az angol és a rövidített megfelelőik [65].



16. ábra A szintetikus kannabinoidok nem-ciklikus kapcsolt csoportai, zárójelben az angol és a rövidített megfelelőik [65].

A szerkezet változtatásával a vegyület receptor kötődése is változik [65]. Az elmúlt pár évben olyan anyagok jelentek meg a piacon, melyek használata során súlyosabb klinikai tüneteket tapasztaltak, mint a kannabisz fogyasztását követően. Számos *in vivo* és *in vitro* tanulmány mutatott rá, hogy a THC gyenge parciális agonista a CB₁ receptorokon, míg a szintetikus kannabinoidok teljes agonistaként viselkednek a CB₁ és CB₂ kannabinoid receptorokon. Ez a tény szolgálhat válaszul a híradásokban és a szakirodalomban is fellelhető számos esetre, melyek szintetikus kannabinoid fogyasztást követően akut mérgezést vagy túladagolás általi halált állapítottak meg [66].

A marihuána ismert hatásain kívül (jókedv, feldobottság, lassú reakcióidő, álmoság, torzult érzékelés) számos kellemetlen mellékhatással is bír. Ezek közül a leggyakrabban a megváltozott hangulat, zavart tudatállapot, szorongás, paranoia, agresszió, vörös vagy véreres szem, émelygés, hányás, verejtékezés, szájszárazság és láz figyelhető meg. Súlyosabb esetben akut vesekárosodás, mellkasi fájdalom, növekvő pulzusszám (tachikardia), vérnyomás növekedés vagy csökkenés is előfordulhat. A

halálos kimenetelű túladagolás leggyakrabban a kardiovaszkuláris hatásokhoz köthető [67].

Ezen kívül állatkísérletek és sejtvizsgálatok kimutatták, hogy számos **szintetikus kannabinoid metabolit** is képes nagy affinitással kötődni a CB₁ és CB₂ kannabinoid receptorokhoz, miközben a semleges agonistáktól, a parciális agonistákon át a teljes agonistákig terjedő tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezeket az anyagcsere termékeket aktív metabolitoknak hívjuk. Az eddigiek ismeretében kijelenthetjük, hogy a szintetikus kannabinoidok fogyasztása nem biztonságos, ezért nem szabad a marihuána alternatív formájának tekinteni. Nagyobb toxicitást fejtenek ki a kannabiszhoz képest, mely a szintetikus kannabinoidok és metabolitjaik együttes hatásának tulajdonítható. Az eredmények alátámasztják, hogy a szintetikus kannabinoidok farmakológiai és toxikológiai tulajdonságai súlyos egészségügyi kockázatot jelentenek [66].

Az új pszichoaktív anyagok, így a szintetikus kannabinoidok legnagyobb mennyiségben Kínából származnak, ahol a vegyipari és gyógyszeripari vállalatok nyíltan értékesítik ezeket a szereket. Az európai fogyasztó könnyedén, internetes webáruházakon keresztül tudja olcsón, közvetlenül a gyártótól beszerezni a termékeket. Egy új anyag lefoglalását az Európai Unió tagállamai az EMCDDA felé jelzik. Ennek köszönhetően az elmúlt években stabilizálódott az új pszichoaktív anyagok feketepiaci megjelenése. Mindazonáltal továbbra is évi 50-nél több új pszichoaktív anyagról érkezik bejelentés [68,69]. Ennek ellenére néhány anyag akár évekig is a piacon marad. Erre jó példa az 5F-MDMB-PICA, mely Magyarországon 2015. július 11. óta számít új pszichoaktív anyagnak (a jegyzék szerkezeti leírásának megfelelően), az európai és hazai lefoglalásokban, valamint a biológiai mintákban 2016 óta szerepel. Szegeden 2019-ben ez a vegyület szerepelt a legtöbbet a pozitív vizelet és vérminták között [70], sőt a 2020-as év első felében is azonosítottuk az anyamolekula jelenlétét a humán vér és vizeletmintákban.

A 2020-as év végéig közel 830 új pszichoaktív anyagot követtek figyelemmel, melyek közül 46-ot első alkalommal 2020-ban jelentettek az EU Korai Jelzőrendszere felé. Európában az új pszichoaktív szerek lefoglalásait jellemzően a szintetikus kannabinoidok és katinonok uralják, amelyek együttesen a 2020-ban jelentett lefoglalások 60%-át tették ki. [69]. Tehát a számok is azt mutatják, hogy a piac gyorsan nő és változik, ezért a rendőrség munkáját segítve, az újonnan megjelent vegyületeket minél hamarabb be kell építeni a már alkalmazott rutin analitikai módszerbe. A szintetikus kannabinoidok mennyiségi és minőségi analízise egy referenciaanyaggal

történő azonosításon alapul. Az új dizájner drogok feketeipiaci megjelenéséhez képest akár 4–6 hónap is eltelhet, mire a gyártó cégek forgalmazni kezdik a referencia standardokat. Ezt az időt a hatóság által lefoglalt szerek tisztításával le lehet rövidíteni, így a több mint 90%-os tisztított anyag szolgálhat standardként a biológiai minták méréséhez [71].

A szintetikus kannabinoidok kimutatása az igazságügyi és klinikai gyakorlatban elsősorban vizelet és vérmintából történik. A detektálás során a fogyasztó által bevitt anyagot, az anyamolekulát mutatják ki. A szintetikus kannabinoidok gyors metabolizációjának eredményeként sok esetben a fogyasztásuk beismerése ellenére sem sikerült azonosítani az anyamolekulát a biológiai mintából. Ezért az anyamolekula mellett szükséges annak karakterisztikus, fő metabolitjait is vizsgálni [72]. A legtöbb szintetikus kannabinoid II. fázisú glükuronid vagy szulfát metabolitként választódik ki. A törvényszéki és klinikai gyakorlatban a vizelet mintákat β -glükuronidáz enzimmel kezelik, ezzel növelve a I. fázisú metabolitok és az anyamolekula mennyiségét, amelyek a II. fázisú metabolitok enzimatisz hidrolízise során képződnek. Mivel a II. fázisú metabolitok nem stabilak, spontán elvesztik a cukor egységeiket, ezért a gyakorlatban, ha az I. fázisú metabolitok közül kerül kiválasztásra a karakterisztikus anyagcseretermék [73].

Amikor egy új szintetikus kannabinoid megjelenik a feketeipiacon, az igazságügyi szakértők számára még nem áll rendelkezésre referencia anyag vagy pozitív vizelet- és vérminta. Annak érdekében, hogy az új szert és annak metabolitjait hatékonyan ki lehessen mutatni, megelőző metabolit vizsgálatok szükségesek. Erre több lehetőség is rendelkezésre áll, melyek előnyeit és hátrányait összehasonlítva a leginkább megfelelő eljárást lehet kiválasztani.

A leggyakrabban alkalmazott *in vitro* metabolomikai modellek a humán májmikroszóma és a humán májsejt. A humán májmikroszóma legnagyobb előnye, hogy az inkubáció egyszerű, könnyen elvégezhető és alacsony költségvetésű, a több donortól származó májmikroszómával. A humán májsejtek lehetőséget nyújtanak az I. és II. fázisú metabolitok képzésére is, ellentétben a májmikroszómával. A májsejtes kezelések legnagyobb hátrányát a magas költségek jelentik. További hátrányuk, hogy citotoxicitás és gyógyszer-anyagcsere vizsgálatokra csak rövid ideig használhatóak (kevesebb, mint 8 óra), így több órás vagy napos kezelésre általában nem alkalmasak [74–79].

Az eddigiek ismeretében belátható, hogy a szintetikus kannabinoidok gyors metabolizációja miatt az anyamolekulák mellett azok karakterisztikus metabolitjait is vizsgálnunk kell, hogy bizonyítani tudjuk a fogyasztás tényét ezzel segítve az igazságügyi szervek munkáját.

A szintetikus kannabinoidok fogyasztásának igazolását vizeletből, teljes vérből, szérumból, plazmából, ritkábban nyálból és hajból végzik. A vizsgált vegyületeknek megfelelően mindegyik mátrix speciális mintaelőkészítési eljárást igényel. A mintaelőkészítéssel a mátrixban lévő zavaró komponensek (fehérjék, lipidek, sók stb.) eltávolíthatók, csökkentve a háttérzajt; a vizsgált komponensek dúsulnak, ami növeli az érzékenységet, csökkenti a kimutatási határt, ezáltal jobb eredményt adva. Általánosságban elmondható, hogy a jól megválasztott mintaelőkészítés pozitív hatással van az analitikai módszer pontosságára, torzítatlanságára és szelektivitására nézve. Mivel a biológiai mintákban található komponensek nagy része bomlékony, ezért a stabilitás vizsgálatoknak fontos szerepe van a módszerfejlesztés során [80,81].

Az igazságügyi gyakorlat szintetikus kannabinoid jelenlétének igazolása során a minták előkezelésére leggyakrabban használt eljárások a fehérjekicsapás, a folyadék-folyadék extrakció és a szilárd fázisú extrakció. Fehérjekicsapásra teljes vér, szérum, vérplazma és nyálminták esetén van szükség, melyre leggyakrabban acetonitrilt, perklórsavat vagy triklórecetsavat használnak. A vizeletminták elemzésekor általában – a már említett – enzimikus kezelésre van szükség. Biológiai mintától függetlenül a leggyakrabban alkalmazott eljárás a folyadék-folyadék extrakció. A mintaelőkészítés során a biológiai mintához egy vele szelektíven elegyedő szerves oldószer hozzáadásával, a vizes fázisból a szerves fázisba juttatható a mérendő komponens. Extrakciós oldószerként leggyakrabban metil *terc*-butil étert, kloroformot, dietil-étert, vagy oldószer keveréket, például hexán/etilacetátot vagy klórbután/2-propanolt alkalmaznak. A folyadék-folyadék extrakciót kisózással is lehet segíteni, például ammónium-acetát használatával. Az utóbbi években a szilárd fázisú extrakció egyre népszerűbb lett a dizájner drogok mintaelőkészítésekor. Leggyakrabban fordított fázisú (C₈, C₁₈) tölteteket alkalmaznak. Mintaelőkészítés során első lépésként a töltetet aktiválni kell, ezt követi a minta felvitele, majd a nemkívánatos szennyezők oldószeres lemosása, végül a megfelelő oldószerrel az oszlopon visszatartott komponens leoldása történik. A szilárdfázisú extrakció alkalmazásával a mátrixszennyezők hatékonyabban eltávolíthatók, ugyanakkora a módszer hátránya, hogy idő- és munkaigényes, valamint magasabb költségekkel jár [80,81].

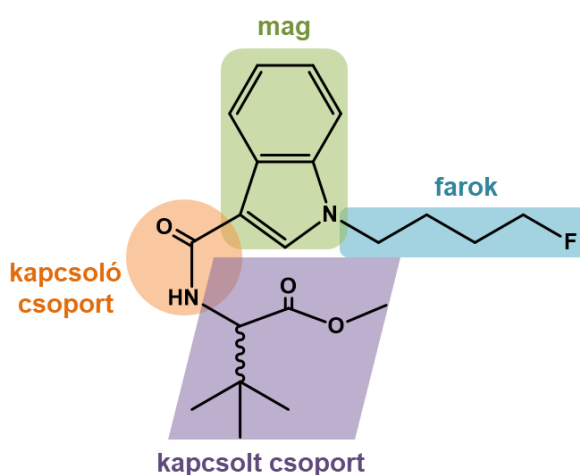
A szintetikus kannabinoidokat lehet vizsgálni immunpróbával, gáz- vagy folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás technikával. Az enzimhez kötött immunoszorbens próbát (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) a pozitív minták szűrésére alkalmazzák. Az ELISA gyors analitikai módszer, de alacsony specifikussága miatt használata nem terjedt el a szintetikus kannabinoidok azonosításánál. A gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) szintén elterjedt analitikai módszer, azonban a szintetikus kannabinoidok semleges vagy enyhén savas karakterű vegyületek, melyek poláris amino vagy hidroxil csoportjukkal kölcsönhatásba léphetnek a kolonna felületével. A megfelelő derivatizációs reagenssel növelhető a detektálhatóság és a stabilitás, így az előbb említett probléma kiküszöbölhető, azonban a derivatizáció további műveletet jelent az analízisben, ezért a módszer idő- és munkaigényes lesz, valamint további költségekkel jár. További problémaként merülhet fel, hogy a gázkromatográfiás injektálás során a magas hőmérséklet a vizsgált vegyületek bomlásához vezet, ezért összességében a GC-MS nem terjedt el a szintetikus kannabinoidok analízisére. A szintetikus kannabinoidok kimutatására a mai napig az LC-MS a legnépszerűbb technika. A kromatográfiás elválasztáshoz leginkább fordított fázisú, C18 oszlopokat használnak. A szintetikus kannabinoidok és metabolitjaik ionizációjához ESI vagy APCI módszert használnak. Mennyiségi meghatározáshoz leggyakrabban MRM/SRM módot alkalmaznak. A hasonló szerkezetű és fragmentációjú szintetikus kannabinoidok téves azonosításának elkerülése és az ismeretlen vegyületek azonosítására napjainkban a HRMS készülékek használata kerül előtérbe [80,81].

2.6.1. 4F-MDMB-BICA, mint új szintetikus kannabinoid

2020. augusztus 11-én a rendőrség egy új, életveszélyes dizájnér drog megjelenéséről adott hírt, melyet addig 51 különböző lefoglalásban azonosítottak. Az Országos Rendőr-főkapitányság, a Nemzeti Szakértői és Kutató Központ (NSZKK), valamint az EMMI Nemzeti Drog Fókuszpont képviselői a sajtótájékoztatón egy új szintetikus kannabinoid, a **4F-MDMB-BICA** ((metil-2-(1-(4-fluorobutil)-1H-indol-3-karboxamido)-3,3-dimetilbutanoát) megjelenéséről számoltak be. A veszélyes, új pszichoaktív anyag a jelenlegi ismeretek szerint 2020. május végén jelent meg a hazai drogpiacon. A rendőrség „varázsdohány” néven ismert, szintetikus hatóanyaggal átítatott dohánymintából, zöld gyógynövény-törmeléből vagy barnás-narancssárga

színű porból mutatta ki az új hatóanyagot. Az NSZKK egy miskolci halálesetben igazolta az új szintetikus kannabinoid jelenlétét. A bejelentésig összesen 11 haláleset volt köthető az új dizájner droghoz [82,83]. Azóta ez a szám csak növekedett [69].

Az EMCDDA 2020. decemberi beszámolójában összesen 111 gyanús növényi törmelék, por, itatóspapír és e-folyadék lefoglalást jelentettek, melyek mindegyike **4F-MDMB-BICA**-hoz volt köthető. Az európai országok különböző jogi besorolás alá helyezték az új szintetikus kannabinoidot, mint kábítószer (Horvátország, Ciprus, Franciaország, Olaszország, Lettország, Luxemburg, Lengyelország, Egyesül Királyság, Törökország), új pszichoaktív anyag (Magyarország, Ausztria, Belgium, Németország), gyógyszer (Norvégia, Litvánia) vagy legális szer [84].



17. ábra 4F-MDMB-BICA szerkezete.

A **17. ábrán** látható, hogy a **4F-MDMB-BICA** szerkezetileg egy indol magból, egy 4-fluorbutil farkból, egy karboxamid kapcsolócsoporthoz és egy metil-dimetil-butanoát nem-ciklikus kapcsolt csoportból áll. Szerkezetileg hasonlít a 2019-es év leggyakrabban fogyasztott szeréhez, az 5F-MDMB-PICA-hoz, mely egy plusz metilén csoportban különbözik a fark részén, a 4F-MDMB-BINACA pedig az indazol magban tér el.

A receptorkötődési vizsgálatok azt mutatták, hogy a **4F-MDMB-BICA** teljes agonista a CB₁ kannabinoid receptoron, melynek erőssége: EC₅₀=121 nM. Az EC₅₀ az a koncentráció, amely a maximális hatás 50%-át váltja ki. Ez az érték minél kisebb, annál erősebb a hatás. A 4F-MDMB-BICA EC₅₀ értékeit összevetve a szerkezetileg hasonló

5F-MDMB-PICA-val és 4F-MDMB-BINACA-val azt tapasztalták, hogy előbbi 12–57-szer, utóbbi 5–44-szer erősebb hatást vált ki a CB₁ receptorokon [85].

3. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki egy- és kétdimenziós folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás bioanalitikai módszerek kifejlesztését és alkalmazását orvos-biológiai kérdések megválaszolására analitikai megközelítéssel.

A lipidek meghatározó szerepet játszanak a neurális folyamatokban, ezért az agy lipid összetétele jelentősen befolyásolja a szubjektív érzékelést, a hangulatot és a viselkedést. Célul tűztük ki a szorongó és nem-szorongó egértörzsek vérplazma és agymintáinak **foszfolipid** (glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid) szintjének vizsgálatát. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid összetételét hidrofil kölcsönhatási folyadékkromatográfiával kapcsolt nagy felbontású tömegspektrometriás (**HILIC-HRMS**) módszerrel határoztuk meg. A korábbi kutatási eredmények bizonyították, hogy a prefrontális kéreg, a dorzális és a ventrális hippocampusz agyterületek érintettek a szorongásos megbetegedések kialakulásában. Ezért vizsgálataink erre a három agyterületre terjedtek ki. Az agy komplex összetétele miatt, egy új, **online átfogó 2D-UHPLC-HRMS** módszer kidolgozásával terveztük a szorongó és nem szorongó egerek különböző agyi régióinak glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid összetételének tanulmányozását.

A szomatikus sejtek által termelt dimetiltriptaminról (**DMT**) kiderült, hogy oxidatív stressz hatására vagy oxigénhiányos körülmények között a koncentrációja megnő. A kísérleti állatokba beadott nagyobb mennyiségű **DMT** csökkentette az agyi infarktus kialakulását. Céljaink között szerepelt az endogén illetve az intravénás infúzióval bejutatott exogén **DMT** iszkémiás körülmények során bekövetkező koncentrációjának nyomon követése patkány agy- és vérplazmamintákban. A mennyiségi meghatározáshoz egy gyors, **célzott** kétdimenziós folyadékkromatográfiával kapcsolt, nagy felbontású tandem tömegspektrometriás (**2D-UHPLC-HRMS/MS**) módszert dolgoztunk ki.

Napjainkban fontos törekvés, hogy a szintetikus kannabinoidok gyors metabolizációja miatt az anyamolekulák mellett azok karakterisztikus metabolitjait is vizsgáljuk. A **4F-MDMB-BICA** az egyik legújabb szintetikus kannabinoid, melynek fogyasztásához több haláleset is köthető. Munkánk során célul tűztük ki a **4F-MDMB-BICA** I. fázisú metabolitjainak azonosítását az anyamolekula humán májmikroszómás kezelését követően (*in vitro*), valamint a rendőrség által lefoglalt vizelet- és

vérmintákból (*in vivo*). További célunk között szerepelt, a meglévő célzott rutin igazságügyi analitikai LC-MS/MS módszer kibővítése a kiválasztott karakterisztikus I. fázisú metabolitokkal, abból a célból, hogy a **4F-MDMB-BICA** használatát igazolni tudjuk akkor is, ha az anyamolekula szintje mind a vérben, mind a vizeletben a kimutatási határ alá csökkent.

4. Kísérleti rész

A kísérleti rész bemutatása a jobb és egyszerűbb áttekinthetőség érdekében, több részre tagolódik az irodalmi áttekintésben tárgyalt témaköröket és a hozzájuk kapcsolódó analitikai módszereket követve. Az LC és UHPLC rendszerek elkülönítése során UHPLC módszernek tekintetem a 2 μm részecskeméret alatti állófázissal történő elválasztást UHPLC rendszerrel.

4.1. Vizsgált anyagok

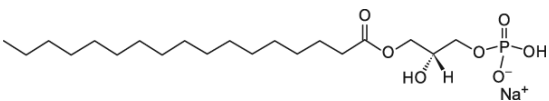
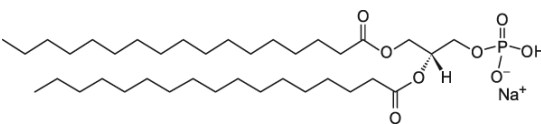
4.1.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel

A módszerfejlesztéshez és a mennyiségi mérésekhez használt belső standardokat az Avanti Polar Lipids-től (Alabaster, USA) szereztük be (**3. táblázat**). A továbbiakban a LIPID MAPS szerinti nevezéktant és rövidítéseit fogom alkalmazni az egyes lipidekre [86,87].

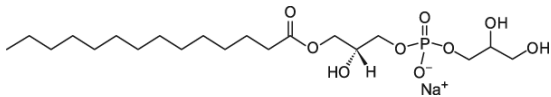
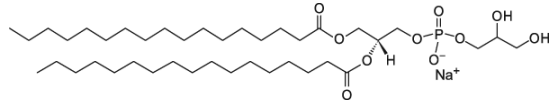
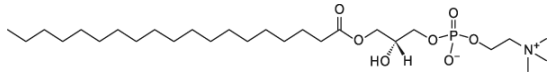
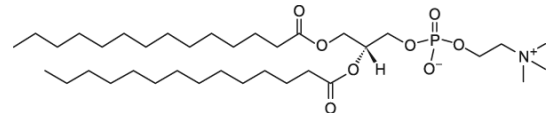
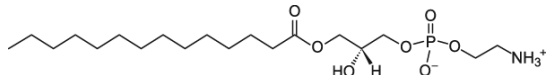
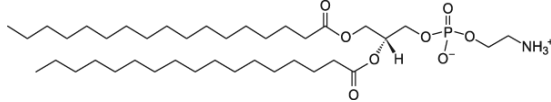
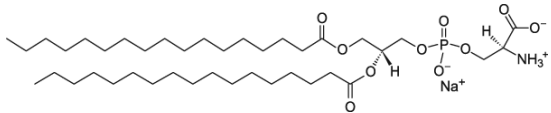
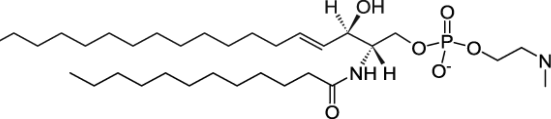
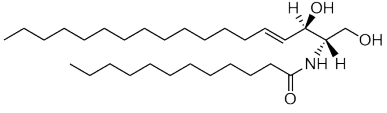
4.1.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfolid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel

A szorongó és nem szorongó egerek agyi glicerofoszfátid és szfingomielin összetételének összehasonlításához a **CER d18:1/12:0** kívül, ugyanazokat a belső standardokat alkalmaztuk, mint a HILIC-HRMS módszernél.

3. táblázat A mérés során alkalmazott belső standardok szerkezete és rövidítéseik.

 <p>LPA 17:0 1-heptadekanoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3-foszfát (nátrium só)</p>	 <p>PA 17:0/17:0 1,2-diheptadekanoil-<i>sn</i>-glicero-3-foszfát (nátrium só)</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

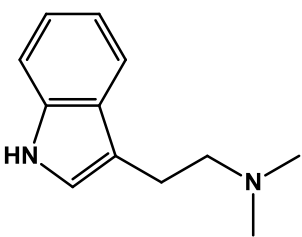
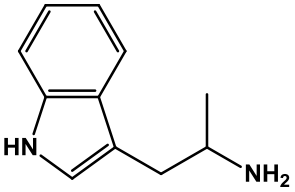
3. táblázat folytatása A mérés során alkalmazott belső standardok szerkezete és rövidítései.

 <p>LPG 14:0 1-miristoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3-foszfo- (1'-rac-glicerin) (nátrium só)</p>	 <p>PG 17:0/17:0 1,2-diheptadekanoil-<i>sn</i>-glicero-3-foszfo-(1'- rac-glicerin) (nátrium só)</p>
 <p>LPC 19:0 1-nonadekanoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3- foszfokolin</p>	 <p>PC 14:0/14:0 1,2-dimirisztoil-<i>sn</i>-glicero-3-foszfokolin</p>
 <p>LPE 14:0 1-mirisztoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3- foszfoetanolamin</p>	 <p>PE 17:0/17:0 1,2-diheptadekanoil-<i>sn</i>-glicero-3- foszfoetanolamin</p>
 <p>PS 17:0/17:0 1,2-diheptadekanoil-<i>sn</i>-glicero-3-foszfo-L- szerin (nátrium só)</p>	 <p>SM d18:1/12:0 <i>N</i>-(dodekanoil)-szfing-4-enin-1-foszfokolin</p>
 <p>CER d18:1/12:0 <i>N</i>-lauroil-D-eritroszfingozin</p>	

4.1.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására

A >98,5% tisztaságú *N,N*-dimetiltriptamin (**DMT**) standardot a Lipomed AG-től (Arlésheim, Svájc) szereztük be. A belső standardként (IS) használt, 99%-nál nagyobb tisztaságú alfa-metiltriptamint (**AMT**) a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Karának Igazságügyi Orvostani Intézete biztosította számunkra, melyet ezúton is köszönünk. A **DMT** és az **AMT** szerkezete a **4. táblázat**ban látható.

4. táblázat A mérés során alkalmazott anyagok szerkezete, és rövidítése.

	
DMT	AMT (belső standard)
<i>N,N</i> -dimetiltriptamin	α -metiltriptamin

4.1.4. 4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata

A **4F-MDMB-BICA** (metil-2-(1-(4-fluorobutil)-1H-indol-3-karboxamido)-3,3-dimetilbutanoát, további nevei: MDMB-4F-BICA, 4F-MDMB-BUTICA, MDMB-4F-BUTICA, 4-Fluoro MDMB-BICA, 4-Fluoro MDMB-BUTICA, 4F-MDMB-2201, 4FBC, 4FBCA, MDMB-073-F) szintetikus kannabinoidot az NSZKK biztosította számunkra. A standard oldatot (1 mg/ml metanolban) a lefoglalt minták metanolos extrakciójával nyerték ki. A belső standardként használt **AB-FUBINACA-D4** ((*S*)-*N*-(1-amino-3-metil-1-oxobután-2-il)-1-(4-fluorobenzil)-1H-indazol-4,5,6,7-d4-3-karboxamid) szintetikus kannabinoidot a Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) gyártótól szereztük be.

4.2. Felhasznált vegyszerek

A kísérletek során alkalmazott LC-MS tisztaságú oldószerek, víz (H₂O), metanol (MeOH), acetonitril (ACN), etil-acetát (EtOAc), ammónium-formiát VWR (Radnor, USA), propán-2-ol Fluka (Buchs, Svájc), hangyasav (FA), 35%-os ammónia oldat Fisher Scientific (Hampton, USA), a HPLC tisztaságú hexán, kloroform VWR (Radnor, USA), valamint a GC-MS tisztaságú aceton Merck (Darmstadt, Németország) gyártmányúak voltak. A reagens tisztaságú 70%-os perklórsavat a VWR-től (Radnor, USA) szereztük be.

A **DMT** patkánykísérletek során alkalmazott vegyszerek Medikus Partner (Biatorbágy, Magyarország, az *in vivo* kísérletekhez) és CP-Pharma (Németország, érzéstelenítőként) gyártmányúak voltak. Az antropin, lidokain Egis (Budapest, Magyarország), etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), pargilin Sigma-Aldrich (St Louis, USA), klorálhidrát Molar Chemicals (Budapest, Magyarország) és a steril fiziológiás sóoldat B. Braun (Melsungen, Németország) gyártmányú volt.

A **szintetikus kannabinoidok** metabolomikai kísérletéhez a humán májmikroszómát és az inkubációhoz szükséges tápközeget, enzimeket, NADPH-regeneráló rendszer oldatait a Corning Gentest (Tewksbury, USA) gyártótól szereztük be. A vizelet minták enzimatisz hidrolíziséhez *Helix pomatia* éti csigából nyert β -glükuronidáz enzimet használtunk, mely Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) gyártmányú volt.

4.3. Állatkísérletek

4.3.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel

Az állatkísérletek a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén zajlottak Dr. Szegedi Viktor irányításával. A szorongó és nem szorongó egér törzsek eredetileg az EGIS Gyógyszergyár Zrt.-től (Budapest, Magyarország) származtak, melyeket direkt kétirányú beltenyésztéssel hoztak létre a szorongás modellezésére. A 2,5–3 hónapos hím egereket 24 ± 1 °C hőmérsékleten, 12 óra világos és 12 óra sötét ciklusban (világítás 8:00-kor kapcsol be), *ad libitum* etetéssel és itatással tartották. A kísérletekbe 80–85. generációs egyedek kerültek bevonásra. A

vérplazma gyűjtéséhez 3 ml térfogatú K3 EDTA-tartalmú csöveket (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) használtunk, hogy elkerüljük a vér alvadását [88]. A kísérlet megfelelt az Európai Unió 2010/63/EU irányelvnek, valamint a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) is jóváhagyta (engedély szám: XXXI/2012).

4.3.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel

Az állatkísérletek a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén zajlottak, mely során az előző pontban tárgyalt 80–85. generációs egereket használtunk. Az egerek agyát elaltatásuk után egyből kivették, majd 3 agyterületet, a prefrontális kérget (PFC), a dorzális hippokampuszt (DHPC) és a ventrális hippokampuszt (VHPC) eltávolították a lipidomikai mérésekhez. Miután frissen lemérték, folyékony nitrogénben gyorsfagyasztották és a mintaelőkészítésig –80 °C-on tárolták. A tanulmány megfelelt az Európai Unió 2010/63/EU irányelvnek, valamint a NÉBIH is jóváhagyta (engedély szám: XXXI/2012).

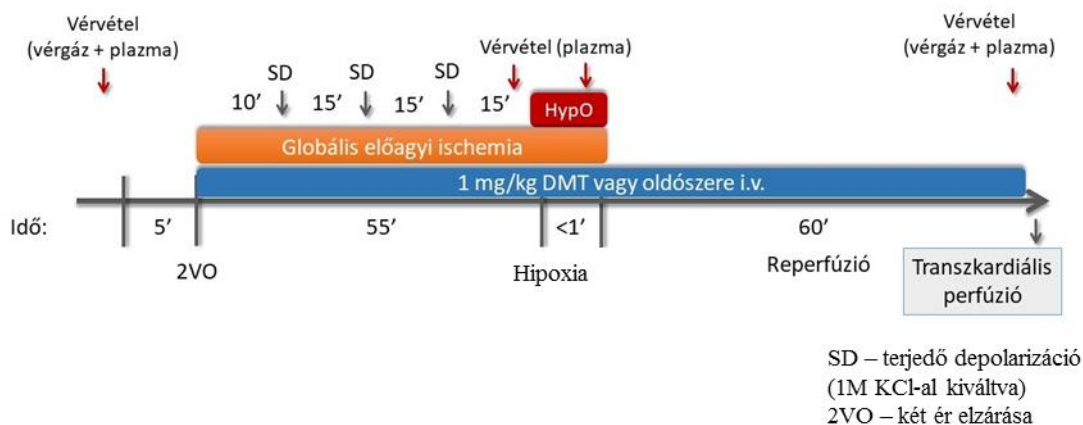
4.3.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására

A patkány kísérletek a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Fizikai és Orvosi Informatikai Intézetében történtek Dr. Farkas Eszter vezetésével. Az eljárást a NÉBIH (engedélyszám: XXXII/2013) valamint a Magyar Tudományos Akadémia Állatkísérleti Osztályközi Tudományos Bizottsága hagyta jóvá a 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet és az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének megfelelően.

A kísérlet során négy 3 hónapos fiatal, hím Sprague-Dawley patkányokat (Charles River Laboratories, 328 ± 18 g) használtunk. A szokásos ételmet és vizet *ad libitum* adagolták. Az állatokat 23 °C-os hőmérsékleten, állandó páratartalom mellett, 12 óra világos és 12 óra sötét ciklus fényviszonyok (a világítás 7:00-kor kapcsol be) között tartották.

A kísérlet sematikus rajza a **18. ábrán** látható. A 2 órás kísérlet során 4 időpontban történt a vérminta gyűjtése: a kísérlet kezdetén, hipoxia előtt, hipoxia után, valamint a kísérlet végén. Az endogén kísérlet során 1 mg/ttkg/óra **DMT** mennyiséget

adtak be intravénásan. Az 1 ml teljes vér centrifugálását követően 200 µl felső fázis, azaz vérplazma lett gyűjtve EDTA tartalmú centrifuga csőbe. A kísérlet végén az agyat eltávolították az állatból, majd folyékony nitrogénnel fagyasztották és a mintaelőkészítésig a vérplazma mintával együtt –80 °C-on tároltuk. Az endogén **DMT** kimutatásához a kísérlet során nem adtunk **DMT**-t intravénásan a kísérleti patkányokba.



18. ábra A kísérlet sematikus ábrája, jelezve a 4 vérvételi időpontot.

4.4. Mintaelőkészítési módszerek

4.4.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel

Az **egér vérplazma** mintaelőkészítés alapját a *Folch* extrakció [89] adta, melyet módosítottunk. A 10 µl plazmához 10 µl belső standardot adtunk, amely a következőket tartalmazta: 125 pmol/µl **PC 14:0/14:0**, 125 pmol/µl **LPC 19:0**, 50 pmol/µl **PE 17:0/17:0**, 30 pmol/µl **LPE 14:0**, 2 pmol/µl **PG 17:0/17:0**, 5 pmol/µl **LPG 14:0**, 50 pmol/µl **PA 17:0/17:0**, 50 pmol/µl **LPA 17:0**, 50 pmol/µl **PS 17:0/17:0**, 125 pmol/µl **SM d18:1/12** és 15 pmol/µl **CER d18:1/12:0**. Intenzív rázatás (vortex) után 5 µl *tert*-butil-hidroxi-toluolt (2 mg/ml etanolban) és 450 µl kloroform:metanol 2:1 (v/v%) térfogat arányú oldatot adtunk a mintához, majd 15 percig szobahőmérsékleten rázattuk. Ezután 115 µl 50 mM ammónium-formiát oldatot adtunk hozzá és 20 másodpercig intenzíven rázattuk. 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd centrifugáltuk 10 percig (10.000 g). Ezt követően a minta alsó szerves fázisából 200 µl-t gyűjtöttünk, és a felső fázist újra extraháltuk 200 µl kloroformmal. A centrifugálást követően a 300 µl

alsó fázist hozzáadtuk a korábban begyűjtött 200 µl-hez és szobahőmérsékleten bepároltuk. A mintákat a méréshez 100 µl 2:1 (v/v%) térfogat arányú kloroform:metanol oldatban vettük vissza.

A visszanyerés, mátrixhatás és teljes folyamathatékonyság vizsgálatokat *Matuszewski* és *Cappiello* munkája alapján végeztük el [90,91]. Mindhárom paramétert három párhuzamos mintaelőkészítéssel és méréssel értékeltük ki az alábbi képletek szerint (**2–4. képlet**):

$$\text{visszanyerés (\%)} = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{[2. képlet]}$$

$$\text{mátrixhatás (\%)} = \frac{B}{C} \times 100 \quad \text{[3. képlet]}$$

$$\text{teljes folyamathatékonyság (\%)} = \frac{A}{C} \times 100 \quad \text{[4. képlet]}$$

ahol az *A* az átlag csúcsterület azon mintaelőkészítés során, ahol a standard keverék az extrakció előtt lett a vérplazmához adva. *B* azon csúcsterületek átlaga, amikor a mintaelőkészítés után adtuk a standard oldatokat a vérplazmához és végül a *C*, amely a mátrix nélküli standard oldat csúcsterületét mutatja.

4.4.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel

Az **egéragy** mintákat 1,7 ml-es mikro centrifuga csövekbe gyűjtöttük, tömegüket pontosan lemértük, majd 50 mM ammónium-formiát oldatot adtunk hozzá annak megfelelően, hogy 5 µg/µl-es koncentrációjú homogenizátumot kapjunk. A homogenizálást 1 percig, maximális erősséggel, 50%-os pulzálással egy BioLogics Model 150VT (Biologics, Manassas, USA) gyártmányú ultrahangos homogenizálóval végeztük.

A folyadék–folyadék extrakciót a vérplazma mintákhoz hasonlóan hajtottuk végre. 10 µl agy homogenizátumhoz 10 µl belső standard oldatot adtunk, amely a következőket tartalmazta: 100 pmol/µl **PC 14:0/14:0**, 100 pmol/µl **LPC 19:0**, 50 pmol/µl **PE 17:0/17:0**, 30 pmol/µl **LPE 14:0**, 5 pmol/µl **PG 17:0/17:0**, 5 pmol/µl **LPG 14:0**, 50 pmol/µl **PA 17:0/17:0**, 50 pmol/µl **LPA 17:0**, 50 pmol/µl **PS 17:0/17:0** és 125 pmol/µl **SM d18:1/12**. A mintaelőkészítés további mennyiségei megegyeznek az egér vérplazma mintaelőkészítésnél (*4.4.1. fejezet*) alkalmazottakkal. Az extrakció visszanyerésének hatékonyságát a **2. képlettel**, a mátrixhatást a **3. képlet** alapján számoltuk ki.

4.4.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására

Az extrakció előtt 50 µl **patkány vérplazmához** 5 µl belső standardot (200 ng/ml metanolos oldat) és 5 µl metanolt adtunk. Ezt követően 50 µl 5,3 % (v/v %) ammónia oldatot és 300 µl etil-acetátot adtunk a mintához, 30 másodpercig intenzíven rázattuk, majd 10 percig szobahőmérsékleten, rázógépen rázattuk (250 rpm, körkörös mozgás, Dual-Action Shaker KL 2 rázó gép, Edmund Bühler, Bodelshausen, Németország). A mintát ezután 5 percig jégen pihentettük, majd 4 °C-on, 12 percig 21.000 g-vel centrifugáltuk (Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Németország). 250 µl felső fázist gyűjtöttünk, majd a maradék alsó fázist 300 µl etil-acetáttal újra extraháltuk. Az második centrifugálást követően a 300 µl felső fázist egyesítettük az előzővel, majd szobahőmérsékleten bepároltuk. Az analízishez a mintát 100 µl metanolban visszaoldottuk.

A **patkány** minták homogenizálása *Kärkkäinen munkáján* [56] alapul, melyet a továbbiakban módosítottunk. A mintaelőkészítéshez fél patkánygyagot használtunk fel, melyet 12 ml-es centrifuga csövekben pontosan lemértünk, majd jéghideg 0,1 M perklórsavat adtunk hozzá (1 g agyhoz 7 ml perklórsav). A mintákat jégen BioLogics Model 150VT ultrahangos homogenizátorral (Manassas, USA) homogenizáltuk, 3 × 1 percig, közepes erősséggel, 80%-os pulzálással. A centrifugálást követően (9000 g, 12 perc, 4 °C, Universal 320 Rm Hettich, Tuttlingen, Németország) 400 µl agy homogenizátumhoz 5 µl belső standardot (200 ng/ml metanolos oldat), 5 µl metanolt és 200 µl 8%-os ammónia oldatot adtunk, majd intenzíven rázattuk. A mintához ezután 500 µl etil-acetátot adtunk, 30 másodpercig vortexeltük, majd 10 percig szobahőmérsékleten, rázógépen rázattuk (250 rpm, körkörös mozgás, Dual-Action Shaker KL 2, Edmund Bühler, Bodelshausen, Németország). A vérplazma mintákhoz hasonlóan 5 percig jégen pihentettük, majd 4 °C-on 12 percig centrifugáltuk (21.000 g, Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Németország). A felső fázis 350 µl-ét gyűjtöttük, majd az alsó fázist 500 µl etil-acetáttal újra extraháltuk. A centrifugálást követően 500 µl felső fázist a korábban gyűjtött mintához adtuk, majd bepároltuk és a plazmához hasonlóan, 100 µl metanolban oldottuk vissza.

A külső kalibráció készítése során 5 µl metanol helyett az adott koncentrációjú **DMT** metanolos oldatát adtuk a kezeletlen vérplazma- és agymintához. Így a végső koncentráció megegyezett a kezelt mintákkal. A külső kalibrációs egyenesek az alábbi koncentrációk voltak: 0; 0,2; 2; 10; 20; 40; 100 és 200 ng/ml plazmára nézve illetve 0;

0,175; 1,75; 8,75; 17,5; 35; 87,5; 175 és 350 ng/g agyra nézve. A kimutatási határt (*limit of detection*, LOD, **5. képlet**) és meghatározási határ (*limit of quantification*, LOQ, **6. képlet**) az alábbi képletek szerint számoltuk ki, ahol az SD a szórás míg az S a kalibrációs egyenes meredeksége:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{S} \quad [5. \text{ képlet}]$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{S} \quad [6. \text{ képlet}]$$

A validáláshoz a torzítatlanságot, pontosságot, visszanyerést (**2. képlet**), mátrixhatást (**3. képlet**) és a teljes folyamathatékonyságot (**4. képlet**) 3 különböző koncentrációban vizsgáltuk, plazmában 10 ng/ml („Low”), 40 ng/ml („Mid”) és 200 ng/ml („High”), agyban 17,5 ng/ml („Low”), 35 ng/ml („Mid”) és 350 ng/ml („High”). A torzítatlanság a módszer rendszeres hibájára utal, azaz a mért érték mennyire tér el a valós értéktől (**7. képlet**):

$$\text{torzítatlanság } (\%) c_x = \left(\frac{\text{a mért } c_x \text{ átlag} - \text{névleges } c_x}{\text{névleges } c_x} \right) \times 100 \quad [7. \text{ képlet}]$$

A pontosság a módszer véletlenszerű hibájára utal, amit egy rövid időtartamban azonos mérési körülmények közötti végzünk. A pontosságot a variációs együtthatóval (CV%) fejezzük ki, és a **8. képlet** alapján számoljuk ki.

$$\text{pontosság } CV\% = \frac{S}{\text{érték}_{\text{átlag}}} \quad [8. \text{ képlet}]$$

ahol S a szórás, az $\text{érték}_{\text{átlag}}$ pedig az adott érték (koncentráció, csúcsterület, arányszám stb.) átlaga. Ezen kívül vizsgáltuk a minták stabilitását 16 °C-on, mely során a kalibrációs oldatokat 24 óra elteltével újra megmértük. A keresztszennyezés vizsgálatnál vak (kezeletlen állatkísérletből származó, standard oldat nélküli mátrix) mintát injektáltunk a legmagasabb kalibrációs pontok után.

4.4.4. 4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata

Az *in vivo* metabolitok azonosításához 5 vizelet- és 2 vérminta állt rendelkezésünkre, melyeket a Szegedi Tudományegyetem Igazságügyi Orvostani Intézete biztosította számunkra a rendőrség által hozott mintákból.

A májmikroszómás kísérlet során a **4F-MDMB-BICA** (1 mg/ml etanolos oldat) szintetikus kannabinoidot 50 µl májmikroszóma szuszpenzióban inkubáltuk 37 °C-on, 30 percig. A szuszpenzió 50 mM kálium-foszfát pufferből (pH 7,4), 10 mM szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimből és NADPH regeneráló oldatokból (A és B oldat)

állt. A reakciót 160 µl 5% (v/v%) ammónia oldattal és 300 µl etil-acetáttal állítottuk meg, majd 10 percig centrifugáltuk (1750 g, MLW K-26 D, Engelsdorf, Németország). 250 µl felülúszót pároltunk be, majd 200 µl 1:1 térfogat arányú (A:B) eluensben oldottuk vissza. A méréshez 10 µl-t injektáltunk. A kontroll minta nem tartalmazott szintetikus kannabinoidot csak a reakcióelegyet.

A **vizeletminták** előkészítése a Szegedi Tudományegyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében zajlott, az általunk kidolgozott módszer szerint. A vizeletminták enzimatis hidrolíziséhez 2,7 µl β-glükuronidáz enzimet, 395 µl nátrium-acetát puffert (pH 5), valamint 5 µl belső standardot (2 µg/ml etanolos oldat) adtunk 2 ml vizelethez, majd egy éjszakán át inkubáltuk. Az inkubációt követően 60 µl 5%-os (v/v%) ammónia oldatot, majd 4 ml etil-acetátot adtunk az elegyhez. Az extrakciós elegyet 1 percig intenzíven rázattuk (Multi-Pulse Vortexer, Glas-Col, Terre Haute, USA), majd 8 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten (1750 g, MLW K-26 D, Engelsdorf, Németország). Ezt követően 3 ml felső szerves fázist pároltunk be 50 °C-on (Turbovap bepárló, Zymark, Hopkinton, USA). A bepárlást követően 200 µl 1:1 v/v arányú A:B eluensben vettük vissza, majd 10 µl térfogatot injektáltunk átfogó és félig célzott méréshez és 15 µl-t a célzott rutin analízishez.

A **vérminták** előkészítése során a következőképpen jártunk el: 1 ml teljes vérhez 10 µl belső standard oldatot (2 µg/ml etanolos oldat), 1,2 g ammónium-szulfátot és 1,5 ml acetonitrilt adtunk. 1 perces intenzív rázatást követően 10 percig centrifugáltuk a mintát a vizeletminták előkészítésénél alkalmazott laboratóriumi berendezésekkel. Ezután 1 ml felső fázist pároltunk be és 200 µl 1:1 térfogat arányú A:B eluensben oldottuk vissza. Annak érdekében, hogy az analitikai nagyműszereket és azok szűk kapillárisait védjük, a mintákat még egyszer centrifugáltuk (21.000 g, 10 perc, szobahőmérséklet, Universal 320 R, Hettich, Németország) és 10 µl-t injektáltunk az átfogó és félig célzott méréshez, valamint 15 µl-t a célzott rutin analízishez.

A **célzott LC-MS/MS** módszer validálásához a 4.5.3 fejezetben bemutatott paraméterek vizsgálatát végeztük el. Az LOD és LOQ értékeket az előző fejezetben ismertetett módon számoltuk ki (**5. képlet**), melyhez az alábbi kalibrációs pontokat készítettük el: 0; 0,02; 0,2; 1; 2 és 5 ng/ml vizeletben és 0; 0,04; 0,4; 2; 4 és 10 ng/ml vérben. A torzítatlanságot (**7. képlet**), pontosságot (**8. képlet**), visszanyerést (**2. képlet**), mátrixhatást (**3. képlet**) és teljes folyamathatékonyt (**4. képlet**) három különböző koncentrációban vizsgáltuk, melyek a következők: 0,02 ng/ml („Low”), 1 ng/ml („Mid”) és 5 ng/mL („High”) vizeletben, valamint 0,4 ng/ml („Low”), 2 ng/ml („Mid”)

és 4 ng/ml („High”) vérben. Ezen kívül vizsgáltuk a minták stabilitását szobahőmérsékleten, mely során a „Low”, „Mid” és „High” oldatokat 24 óra elteltével újra megmértük. A keresztzennyezés vizsgálatánál vak vizelet- és vérmintát injektáltunk a legmagasabb kalibrációs pontok után.

4.5. Alkalmazott műszerek, kromatográfiás oszlopok, módszerek és szoftverek

4.5.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel

Az LC-HRMS analízishez Waters Acquity I-Class UPLC (Waters, Milford, USA) ultra nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás készüléket (UHPLC) használtunk, mely egy bináris pumpából, automata mintaadagoló egységből és oszloptermosztátból állt. Az UHPLC rendszer egy Thermo Scientific Q Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) nagyfelbontású tömegspektrométerrel volt összekapcsolva.

A végső módszer kromatográfiás elválasztása egy Kinetex HILIC oszlopon (150 × 2,1 mm, 2,6 μm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) történt, miközben az oszlophőmérséklet 50 °C-on volt tartva. Az injektált térfogat 10 μL volt. Az *A* eluens 50 mM ammónium-formiát vizes oldata, míg a *B* eluens aceton volt. Az elválasztás során a következő gradiens programot alkalmaztuk: 0 perc, 97% *B*; 7 perc, 70% *B*; 8 perc, 50% *B*; 10 perc, 50% *B*; 11 perc, 97% *B*; és 15 perc, 97% *B*. Az áramlás sebessége az analízis során 0,4 ml/perc volt. Az injektor túje az injektálást követően hexán:propán-2-ol:víz (2:2:0,1, v/v/v%) oldattal volt mosva.

A tömegspektrométert negatív módban, fűtött ESI forrás alkalmazásával használtuk, a következő beállításokkal: kapilláris hőmérséklet 250 °C; S-Lencse RF szint 50; spray feszültség 2,5 kV; porlasztó gázáram 45 önkényes egység (a.u., *arbitrary unit*) (*sheath gas flow*); köpeny gázáram 2 a.u. (*sweep gas flow*); szárító gázáram 10 a.u. (*auxiliary gas flow*). A teljes tömegspektrum rögzítését 100–1000 *m/z* tömegtartományban végeztük 35.000-es felbontás (FWHM) mellett. Az AGC 3×10^6 töltés, míg a maximális gyűjtési időt (IT) 100 ms-ra állítottuk be.

Az UHPLC rendszert MassLynx 4.1 SCN 901 szoftverrel (Waters, Milford, USA), a tömegspektrométert és az adatgyűjtését Xcalibur 4.0 szoftverrel (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, USA) vezéreltük. Az LC-HRMS analízis során kapott adatok bioinformatikai feldolgozását a Progenesis QI 2.1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Egyesült Királyság) programmal végeztük el. A nyers adatfájlokat közvetlenül a Progenesis QI-ba importáltuk, ahol csúcslista (deizotopálás, dekonvolúció, retenciós idő igazítás, kromatográfiás csúcsok simítása) készítményt követően a LipidBlast adatbázis segítségével a foszfolipidek előzetes azonosítása történt [92]. A Progenesis QI-ból származó feldolgozott adatokat (amelyek magukba foglalják a csúcsterületet, az m/z értéket és a retenciós időt) Microsoft Excel szoftverbe exportáltuk. Ezután elvégeztük a csúcsterületek normalizálását, amely az adott vegyület és a belső standard csúcsterület arányának kiszámításán alapult. A lipid specieszek azonosítását a LIPID MAPS pontos tömegméréseken alapuló (≤ 5 ppm tömegpontosság) adatbázis-keresésével, saját méréseinkből (LC-HRMS és LC-HRMS/MS) készült adatbázis és irodalmi források [93–98] alapján határoztuk meg. Az így kapott normalizált adatokat a SIMCA 14.1 szoftverbe (Umetrics, Umeå, Svédország) importáltuk, ahol elvégeztük az ortogonális részleges legkisebb négyzetek diszkriminációs analízisét (OPLS-DA) és a főkomponens analízist (*principal component analysis*, PCA). Az S ábrák eredményei a potenciális biomarkereket adják a szorongó egér modellekben. Az adatok ábrázolásához oszlop- és dobozdiagramokat alkalmaztunk, melyeken jelöltük a standard hibát (*standard error*, SE). A szorongó és nem szorongó egerek közötti különbségekhez a t-próbát a GraphPad Prism 5 statisztikai szoftverrel (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) végeztük el. A statisztika szignifikancia p -értékei * $\leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ és *** $p \leq 0,001$.

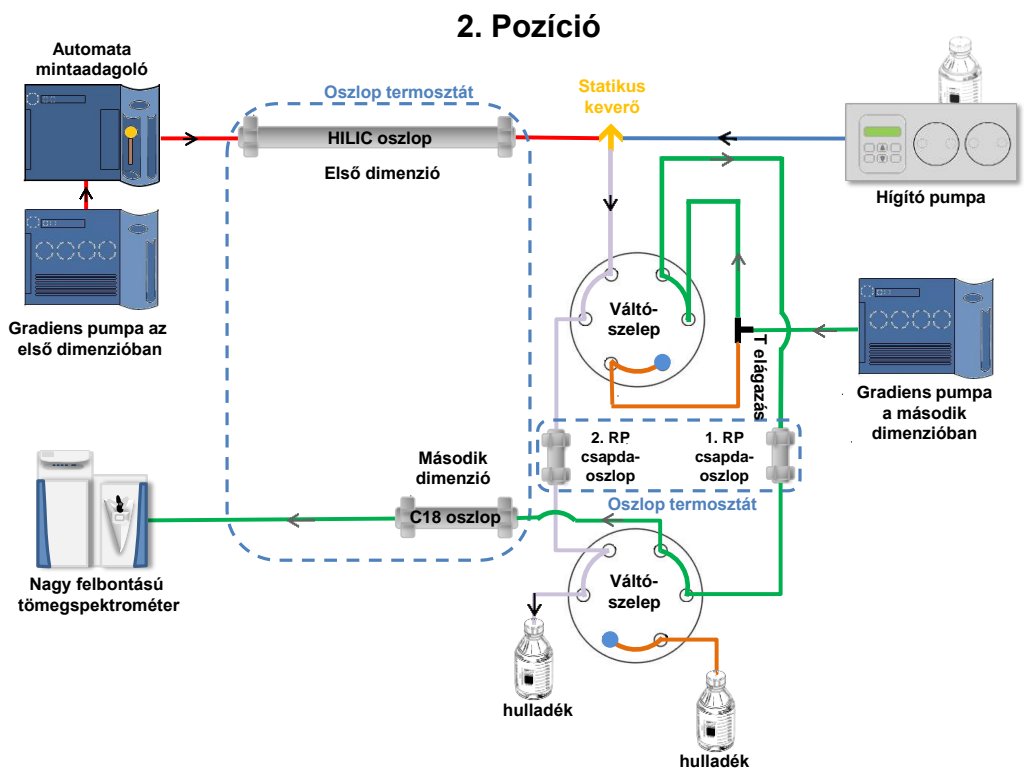
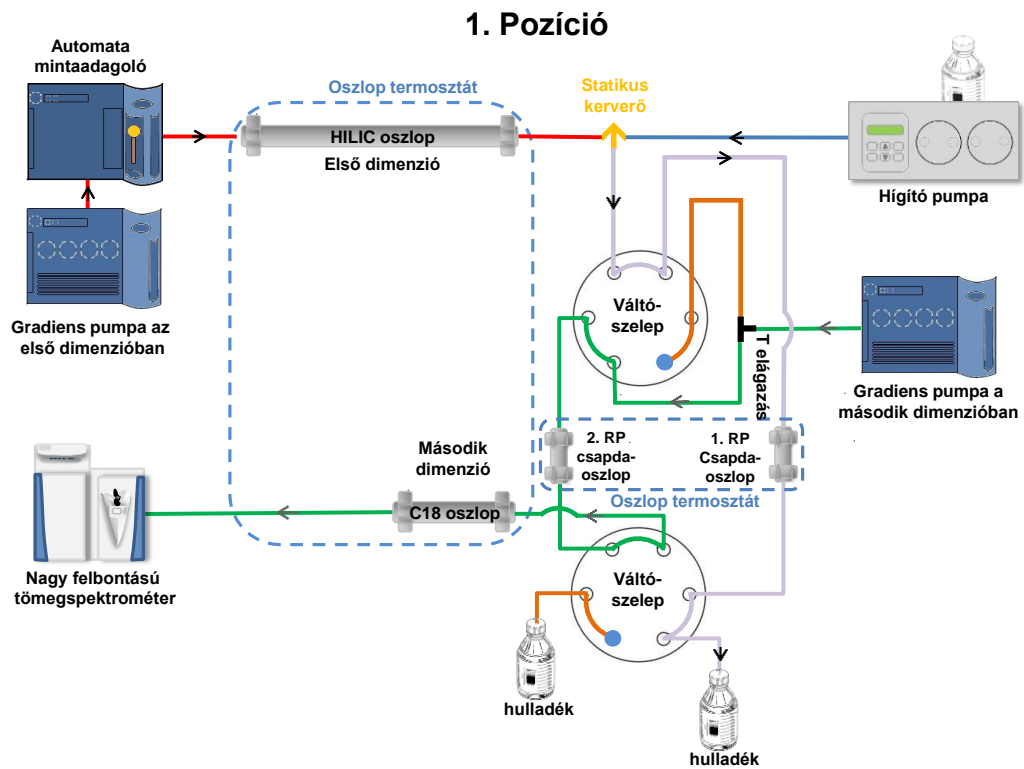
4.5.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata online, átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel

Az online átfogó 2D-UHPLC-HRMS analízist egy Waters Acquity I-Class UPLC kromatográfiás rendszer (Waters, Milford, USA) segítségével végeztük, amely két bináris pumpával, automata mintaadagolóval és két hat utas, kétállású váltószeleppel volt felszerelve. Az első dimenziós HILIC oszlop eluensét egy HITACHI L-7100 pumpával (Hitachi, Tokió, Japán) és nagynyomású statikus T-keverő segítségével (IDEX, Oak Harbor, USA) hígítottuk. Az első és második dimenziós analitikai oszlopokat az UHPLC rendszer oszloptermostátjában tartottuk állandó 50 °C-os hőmérsékleten, míg a csapdaoszlopokhoz az L-7350 LaChrom oszloptermostátot

(Merck, Darmstadt, Németország) használtuk. Az UHPLC rendszert egy Thermo Scientific Q Exactive Plus Hybrid-Quadrupol-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) tömegspektrométerhez kapcsoltuk. Az online 2D-UHPLC-HRMS rendszerünk elrendezését a **19. ábra** szemlélteti.

A 2D-UHPLC-HRMS rendszerben az első és a második dimenziós oszlopokat két hat utas váltószelepen, valamint két Luna C18 (20 × 2,0 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) csapdaoszlopon keresztül kapcsoltuk össze. A hat utas szelepek váltása ütemezetten történt, amíg a HILIC oszlopról az eluátum lipid komponensei az egyik C18 csapdaoszlopon dúsulnak, addig a másik C18 csapdaoszlopon és analitikai oszlopon az előző ciklusban már csapdázott vegyületek második dimenziós elválasztása és HRMS detektálása történik. A foszfolipidek hatékony csapdázásának érdekében, a csapdázási folyamat során a HILIC effluent 5 mM ammónium-formiáttal hígítottuk egy statikus T keverőn keresztül 0,6 ml/perces áramlási sebességgel, így csökkentve a mozgófázis eluenserősségét. A csapdaoszlopokat hasonlóan az analitikai oszlopokhoz 50 °C-on tartottuk a teljes futási idő alatt.

A **19. ábra** mutatja be a 40 perces teljes futás két szeleppozícióját. Az 1. Pozícióban az első dimenzió HILIC oszlopának hígított eluátuma az 1. csapdaoszlopon dúsul, mely 8 percig tart. Ezután szelepváltás történik, melyet a 2. Pozíció szemléltet. Ekkor az első dimenzió hígított eluátuma a 2. csapdaoszlopon dúsul miközben az 1. csapdaoszlopon már dúsult foszfolipidek eluálódnak a második dimenzió fordított fázisú oszlopára. A teljes analízis gradiens programját a szelepváltásokkal a *Függelék F1 táblázata* mutatja be. A szelepváltások száma páratlan (5) volt, melyre azért volt szükség, hogy az előző mérés utolsó frakciója és a következő mérés első frakciója ne ugyanazon a csapdaoszlopon dúsuljon. Ezért két módszert dolgoztunk ki, melyek csak a szelepváltásokban különböztek, a kromatográfiás és tömegspektrometriás paraméterek azonosak voltak. Tehát a két módszer egymást váltotta a szekvenciában. Az első dimenziós HILIC oszlop mosási és oszlopegyensúlyozási szakaszában (32–40 perc) csapdázódott komponenseket a következő injektálás első fordított fázisú futása (0–8 perc) során detektáltuk, de a kiértékelés során figyelmen kívül hagytuk. (Az 5.2 fejezetben található **26. ábra** szemlélteti, a fehér háttérű frakciók nem szerepelnek a kiértékelésben.)



19. ábra Az online átfogó 2D-UHPLC-HRMS rendszer felépítése a kétféle szelepállással (1. Pozíció és 2. Pozíció).

A lipid osztályok elválasztása az első dimenzióban egy Kinetex HILIC oszlopon (150 × 2,1 mm, 2,6 μm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) történt. Az *A* eluens 50 mM ammónium-formiát vizes oldata, a *B* eluens pedig aceton volt. A gradiens programot a *Függelékben* található **F1 táblázat** mutatja be. Az áramlási sebesség az analízis ideje alatt 0,4 ml/perc volt. 10 μl mintát injektáltunk, a tüt minden injektálást követően hexán:propán-2-ol:víz 2:2:0.1 (v/v/v%) arányú keverékével mostuk le.

A második dimenzióban a mozgófázis 5 mM ammónium-formiátot tartalmazott. Az *A* eluens 50:50 (v/v%) arányú víz és aceton keveréke, a *B* eluens pedig 5% vizet tartalmazó aceton volt. A második dimenziós fordított fázisú elválasztást 0,4 ml/perc áramlási sebességgel, egy Acquity BEH C18 oszlopon (50 × 2,1 mm, 1,7 μm, 130 Å, Waters, Milford, USA) történt. A gradiens program a *Függelékben* található **F1 táblázatban** van részletezve.

A tömegspektrometriás mérést negatív ionizációs módban végeztük egy fűtött ESI forrással, mely a következők szerint volt beállítva: kapilláris hőmérséklet 250 °C; S-Lencse RF szint 50; spray feszültség 2,5 kV; porlasztó gázáram 45 a.u., köpeny gázáram 2 a.u.; szárító gázáram 10 a.u. A teljes tömegspektrum rögzítését 100–1000 *m/z* tömegtartományban végeztük 35.000-es felbontás (FWHM) mellett. Az AGC 3 × 10⁶ töltés, míg IT-t 100 ms-ra állítottuk be.

A folyadékromatográfiás rendszert MassLynx 4.1 SCN 901 szoftverrel (Waters, Milford, USA), a tömegspektrométert Xcalibur 4.0 programmal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) vezérteltük.

A nyers mérési adatok kiértékelését, a csúcslista készítést (dekonvolúció, deizotopálás, retenciós idő igazítás) és az előzetes azonosítást a LipidBlast adatbázis kereséssel a Progenesis QI programban (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Egyesült Királyság) végeztük el. A feldolgozott adatokat ezután Microsoft Excel programba exportáltuk, melyek az azonosított vegyületek csúcsterületét, az *m/z* értékekét és a retenciós időket tartalmazták. Az Excelben végeztük el a csúcsterületek normalizálását, mely a mért foszfolipid speciesz és a belső standard csúcsterületeinek arányán alapult. A foszfolipidek azonosítását, hasonlóan a 4.3.1 fejezetben tárgyalt módon pontos tömeg (<5 ppm tömegpontosság), LIPID MAPS adatbázis és a saját adatbázisunk alapján végeztük. A saját adatbázisunk az előzetes mérések adataiból, irodalmi adatokból és a foszfolipid osztályok, illetve foszfolipid specieszek retenciós viselkedésén alapuló retenciós időkből álltak mindkét dimenzióban [98–104].

A normalizált csúcsterületek többváltozós statisztikai elemzését a SIMCA 14.1 szoftverrel (Umetrics, Umeå, Svédország) végeztük el. Az OPLS-DA és S diagram eredményeivel a potenciális biomarkerek azonosíthatók a szorongó egerekben. Az adatok ábrázolásához oszlop- és dobozdiagramokat alkalmaztunk, melyeken jelöltük a standard hibát (*standard error*, SEM). A szorongó és nem szorongó egerek közötti különbségekhez a t-próbát a GraphPad Prism 5 statisztikai szoftverrel (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) végeztük el. A statisztika szignifikancia p-értékei * $\leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ és *** $p \leq 0,001$.

4.5.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására

A célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS mérések során Thermo Scientific Q Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) tömegspektrométert kapcsoltunk össze egy Waters Acquity I-Class UPLC (Waters, Milford, USA) ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiás berendezéssel. Az UHPLC rendszer két bináris pumpából, egy automata mintaadagoló egységből, egy oszloptermostátból állt, melyhez két hat utas, kétállású kapcsolószelep csatlakozott. A csapdaoszlop mozgófázisát egy Knauer 64 HPLC-pumpával (Knauer, Berlin, Németország) és nagynyomású, rozsdamentes acél T keverő segítségével (IDEX, Oak Harbor, USA) hígítottuk. Az első és második dimenziós kromatográfiás oszlopokat az UHPLC oszloptermostát egységében fűtöttük, míg a csapdaoszlopot egy L-7350 LaChrom oszloptermostátban (Merck, Darmstadt, Németország) tartottuk állandó hőmérsékleten.

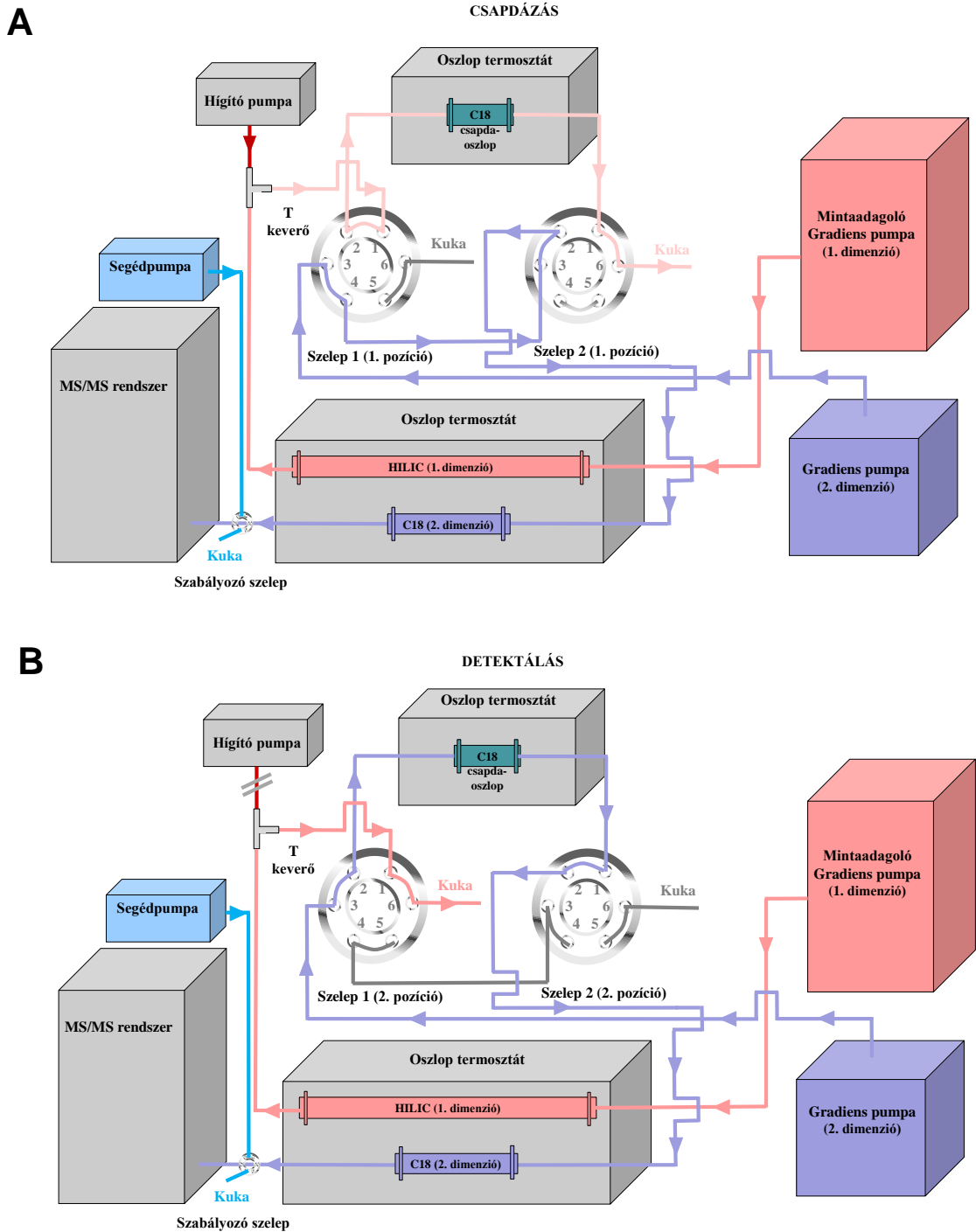
A végső célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS analízis során az első dimenziós kromatográfiás elválasztást egy Kinetex HILIC oszlopon ($150 \times 2,1$ mm, $2,6 \mu\text{m}$, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) végeztük, melyet egy HILIC védőoszloppal (4×3 mm, $2,6 \mu\text{m}$, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) láttunk el. A második dimenziós elválasztást egy Luna Omega Polar C18 oszlopon ($50 \times 2,1$ mm, $1,6 \mu\text{m}$, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) végeztük. A vegyületek dúsításához egy Luna C18 csapdaoszlopot (20×2 mm, $5 \mu\text{m}$, 100 Å, Phenomenex) alkalmaztunk, és két hat utas váltószelepen keresztül csatlakoztattuk az első és második dimenziós oszlophoz (**20. ábra**).

A módszer fejlesztése során a következő kromatográfiai oszlopokat is teszteltük első dimenzióban: Luna HILIC (150 × 3 mm, 3 µm, 200 Å, Phenomenex, Torrance, USA), Luna Omega Sugar (100 × 2,1 mm, 3 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA) és Luna NH₂ (150 × 2 mm, 3 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA). A második dimenzióban kipróbált további állófázisok a következők voltak: Kinetex C18 (50 × 2,1 mm, 2,6 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA), Luna Omega PS C18 (50 × 2,1 mm, 1,6 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA), Acquity UPLC BEH C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 µm, 130 Å, Waters, Milford, USA) és CORTECS UPLC C18+ (50 × 2,1 mm, 1,6 µm, 90 Å, Waters, Milford, USA). A hat utas váltószelepek ütemezett átkapcsolásával az első dimenzió HILIC oszlopának hígított mozgófázisa a Luna C18 csapdaoszlopra került (**20. ábra**). Annak érdekében, hogy a célzott vegyületek a csapdaoszlopról történő idő előtti elúcióját megakadályozzuk, a csapdázási folyamat során a hígító pumpa segítségével vizes ammóniaoldatot (pH 10,2) 3 ml/perc áramlási sebességgel a csapdaoszlopra vezettük. A hígító pumpa ammóniás mozgófázisa egy statikus T keverővel a HILIC oszlophoz és a hat utas szelephez csatlakoztattuk. Az első és második dimenzió kromatográfiai oszlopai, valamint a csapdaoszlop 50 °C-on voltak temperálva az oszloptermosztátokban.

A mérés során 10 µl mintát injektáltunk az első dimenziós Kinetex HILIC oszlopra. Az első dimenzió esetében: az *A* eluens 50 mM ammónium-formiát oldat, a *B* eluens 0,1% hangyasav acetonitrilben. A második dimenzióban az *A* eluens 0,1% hangyasavas oldat volt, míg a *B* eluens esetében 0,1% FA acetonitrilben. A Luna C18 csapdaoszlopon dúsult komponensek a második dimenzió Luna Omega Polar C18 oszlopára eluálódtak. Mindkét dimenzióban gradiens elúciós elválasztást alkalmaztunk két hat utas váltószelep segítségével, melynek a szeleppozícióit és a gradiens programját a *Függelékben* található **F5. táblázat** foglalja össze.

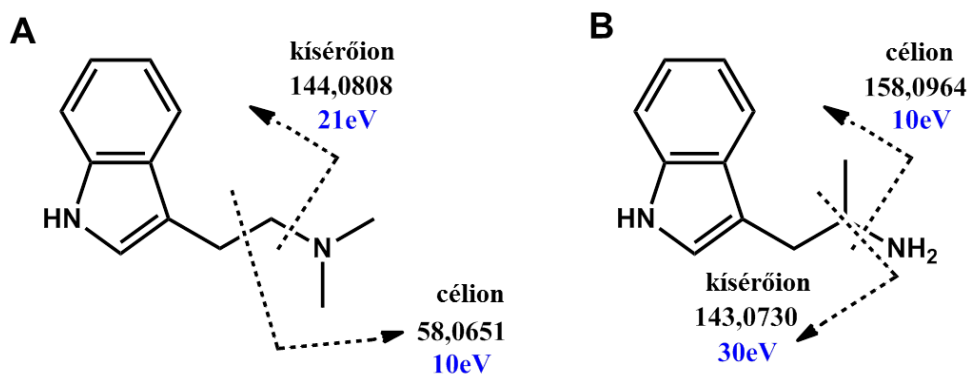
A **20. ábra** mutatja be a 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer két szeleppozíciójához tartozó sematikus ábráját. Csapdázáskor mindkét váltószelep 1-es pozícióban van. A csapdázás 1,80 és 3,49 perc közé esik, ekkor a HILIC elválasztás gradiens programja izokratikus szakaszban van, mely a *Függelék F5. táblázatában* látható. Ezt követően 3,50 percnél mindkét váltószelep 2-es pozícióba fordul, azaz a csapdaoszlopon dúsult komponensek a második dimenzió Omega Polar C18 oszlopára eluálódnak, megtörténik a második dimenziós elválasztás és HRMS/MS detektálás. A teljes 10 perces futási időt úgy értjük el hogy, miután az első dimenziós elválasztás és csapdázás megtörtént, 3,5–10 perc között az első dimenziós HILIC oszlopot mostuk és a kezdeti mozgófázis

összetételre egyensúlyoztuk. 3,5 perctől kezdődött a második dimenziós elválasztás, és a következő futás 3,5 percéig tartott a második dimenzió Omega Polar C18 oszlopának mosása és egyensúlyozása, miközben az első dimenziós HILIC elválasztás és csapdázás zajlott.



20. ábra A célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS rendszer felépítése a kétféle szelepállással, (A) csapdázás és (B) detektálás.

Ahhoz hogy csökkentsük a tömegspektrométer keresztzennyezését, az eluátumot csak 4,5–5,5 perc között engedjük be az ESI forrásba. Az analízis fennmaradó idejében a forrást egy Knauer 64 HPLC-pumpa (Knauer, Berlin, Németország) segítségével, ACN:H₂O (90:10, v/v%) oldattal 0,1 ml/perc áramlási sebességgel mostuk.



21. ábra A DMT (A) és az AMT (B) szerkezete a feltételezett fragmentációval, a célionok és a kíséőionok (alattuk az angol szakkifejezés) pontos tömegével, valamint az optimalizált ütközési energiájukkal.

A tömegspektrométert pozitív módban, fűtött ESI forrás alkalmazásával működtettük, a következő beállításokkal: kapilláris hőmérséklet 250 °C, S-Lencse RF szint 50, spray feszültség 3,5 kV, porlasztó gázáram 45 a.u., köpeny gázáram 2 a.u. és szárító gázáram 10 a.u.. A méréseket PRM módban, 17.500 felbontással (FWHM), 1×10^6 AGC töltéssel, valamint 50 ms IT-vel végeztük. A prekursor ionok ablakszélességének 2 Da-t adtunk meg. Az ütközési energiákat (CE) optimalizáltuk az egyes vegyületek átmeneteire, melyek feltételezett fragmentációját a **21. ábra** mutatja. A fő HRMS/MS paramétereket a kromatográfiás retenciós idővel a **5. táblázat** foglalja össze.

5. táblázat A főbb HRMS/MS paraméterek valamint a retenciós idők az egyes vegyületekre.

Vegyület	Szerkezeti képlet	[M+H] ⁺	Leány ion (célion) m/z	Ütközési energia (eV)	Leány ion (kiséőion) m/z	Ütközési energia (eV)	Retenciós idő (perc)
DMT	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	189,1386	58,0651	10	144,0808	21	4,99
AMT	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	175,1230	158,0964	10	143,0730	30	4,99

Az UHPLC rendszert a MassLynx 4.1 SCN 901 szoftver (Waters, Milford, USA) vezérelte, míg az MS adatgyűjtését Xcalibur 4.1 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) végeztük. A GraphPad Prism 5 statisztikai szoftvert (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) oszlopdiagramok, dobozdiagramok és pontdiagramok rajzolásához, valamint a páros t-teszt elvégzéséhez használtuk.

4.5.4. 4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata

A **4F-MDMB-BICA** vizsgálatát különböző műszereken és analitikai módszerekkel végeztük. Első lépésként a lehetséges metabolitok azonosításához egy **átfogó LC-HRMS** módszert alkalmaztunk, majd a szerkezeti azonosítást **félig célzott LC-HRMS/MS** technikával végeztük. Miután azonosítottuk a karakterisztikus metabolitokat a rutin **célzott LC-MS/MS** analitikai módszerbe ültettük át. Így a 3 módszerhez tartozó kromatográfiás és tömegspektrometriás műszereket és körülményeket egymás után mutatom be.

A májmikroszóma, vizelet és vérminták analízise **átfogó LC-HRMS** és **félig célzott LC-HRMS/MS** módszerekkel egy Waters Acquity I-Class UPLC kromatográfiás rendszerrel (Milford, USA) kapcsolt nagy felbontású Q Exactive Plus Hybrid-Quadrupole Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) történt. A kromatográfiás elválasztáshoz Accucore C30 oszlopot (150 × 2.1 mm, 2.6 μm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) egy Accucore C30 (10 × 2.1 mm, 2.6 μm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) előtétoszlopot használtunk. Az UHPLC A eluens 0,1% hangyasav vizes oldata, a B eluens pedig 0,1% hangyasav acetonitrilben volt. Az analízis során alkalmazott gradiens a következő volt: az analízis ideje, azaz 15 perc alatt 20%-ról 60% B eluensre változik az összetétel 0,4 ml/perc áramlási sebességgel. Ezután az áramlási sebesség 0,4 ml/percről 0,7 ml/percre, és 100% B mozgófázisra módosul fél perc alatt. Ezt a kondíciót 2 percig tartjuk, míg az oszlop mosódik, majd 2,5 perc alatt a rendszer visszaáll a kezdeti összetételre és áramlási sebességre. A teljes futási idő 20 perc. Az oszlopot 50 °C-on, a mintákat 15 °C hőmérsékleten tartottuk és 10 μl-t injektáltunk.

A tömegspektrométert pozitív módban, fűtött ESI forrással használtuk az alábbi beállításokkal: kapilláris hőmérséklet 262,5 °C, ion spray feszültség 3,5 kV, porlasztó gázáram 50 a.u., köpeny gázáram 2,5 a.u. és szárító gázáram 12,5 a.u. Teljes

tömegspektrum rögzítését **átfogó LC-HRMS** módszernél 150–600 m/z tartományban, 100 ms maximális IT, 70.000 felbontást (FWHM) és 3×10^6 AGC-t alkalmaztunk, míg PRM módban, azaz **LC-HRMS/MS** módszernél ezek az értékek, 30 ms maximum IT, 17.500 felbontás (FWHM) és 3×10^6 AGC. Az ablakszélességnek 1 Da értéket állítottunk be, ütközési energiáknak pedig 20, 30 és 45 eV-ot. A kiértékelés során tömegpontosság 5 ppm volt.

A Waters UHPLC rendszert MassLynx 4.1 SCN 901 szoftverrel (Waters, Milford, USA) vezéreltük, míg a nagy felbontású tömegspektrométer vezérlését és az adatok kiértékelést Xcalibur 4.3 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) végeztük. Az *in vitro* májmikroszóma kezelt és kontroll minták **LC-HRMS** nyers adatfájljait a Progenesis QI szoftverbe importáltuk, ahol csúcslistát készítettünk. Az azonosítás során a $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+ACN+H]^+$ és $[M-H_2O+H]^+$ kvázimolekulai ionokat zártuk ki. Egyutas ANOVA statisztikai próbát végeztünk el, ahol a p érték $\leq 0,05$, a maximális változás ≥ 20 értéknek állítottuk be a kezelt mintákban. Az **LC-HRMS/MS** mérések során a lehetséges szerkezeteket úgy határoztuk meg, hogy a HRMS/MS spektrumokat manuálisan összehasonlítottuk a lehetséges fragmentációs mintázatokkal, amely az anyamolekula fragmentációján, valamint az irodalomban már leírt, hasonló magot, kapcsoló és kapcsolt csoportot tartalmazó szintetikus kannabinoidok fragmentációs mechanizmusán alapult [105–108].

A szintetikus kannabinoidok fogyasztásának kimutatása intézetünkben egy Shimadzu Nexera (Kiotó, Japán) UHPLC rendszerrel és egy hozzá kapcsolt TSQ Fortis hármaskvadrupóllal (Thermo Scientific, Waltham, USA) történt. A kromatográfiás elválasztáshoz egy Kinetex C18 oszlopot (100 \times 2.1 mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Torrance, USA) és előtét oszlopot (4 \times 2 mm, 5 μ m, Phenomenex, Torrance, USA) alkalmaztunk.

A **célzott LC-MS/MS** mérés során A eluens 0,1% hangyasav vizes oldatát B eluensként pedig 0,1% hangyasavat acetonitrilben alkalmaztunk. Az analízis 0,4 ml/perc áramlási sebességgel és 40% B eluenssel indult, mely 5 perc alatt érte el a 80%-ot, majd további 1 perc alatt a 100% B-t. 1 percig így tartottuk, miközben az áramlási sebességet 0,9 ml/perc-re emeltük, majd 2,5 perc alatt a rendszer visszaállt a kezdeti kondícióra. Az analízis során az oszlopot 50 °C-os állandó hőmérsékleten tartottuk és 15 μ l mintát injektáltunk.

A tömegspektrométert pozitív módban, ESI forrással használtuk az alábbi beállításokkal: kapilláris hőmérséklet 300 °C, porlasztási hőmérséklet 350 °C, ion spray

feszültség 4,5 kV, porlasztó gázáram 50 a.u., köpeny gázáram 1 a.u. és szárító gázáram 5 a.u. Az adatgyűjtés SRM módban történt. A Q_1 és Q_3 kvadrupólok 0,7 felbontásra (FWHM), az ütközési gáz pedig 1,5 mTorr-ra volt beállítva. Az ESI forrás optimalizálását az egyes vegyületekre áramló injektációs (*flow injection analysis*: FIA) módszerrel végeztük, mely során kiválasztottuk a célionokat és kísérőionokat, illetve a hozzájuk tartozó ütközési energiákat és lencsákat optimalizáltuk.

Az Shimadzu UHPLC rendszert LabSolution szoftverrel (Shimadzu, Kiotó, Japán) vezéreltük, míg a hármas kvadrupól tömegspektrométer vezérlését és az adatok kiértékelését Xcalibur 4.2 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) végeztük. Az **LC-MS/MS** mérések mennyiségi értékelését az Xcalibur programmal végeztük külső kalibráció alkalmazásával.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

A kísérleti eredmények bemutatása négy részre tagolódik az irodalmi összefoglalóban tárgyalt témáknak és a kísérleti részben bemutatott módszereknek megfelelően. A könnyebb áttekinthetőség érdekében, a kísérleti részben bevezetett rövidítéseket használom, illetve csak a magyarázatok értelmezéséhez szükséges adatok közlésére szorítokozom. A részletes mérési eredmények az értekezés alapjául szolgáló közleményekben (9.1 fejezet) megtalálhatók.

5.1. A vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolid vizsgálata HILIC-HRMS módszerrel

Célul tűztük ki egy gyors analitikai módszer kidolgozását, amely alkalmas foszfolipid osztályok nagy hatékonyságú elválasztására. A kidolgozott módszert szorongásos megbetegedéssel egér modelljében, a vérplazma glicerofoszfátid és szfingofoszfolid molekula specieszek azonosítására és mennyiségi meghatározására alkalmaztuk. A HILIC-HRMS körülmények optimalizálása során a 4.1.1. fejezetben bemutatott, 11 foszfolipid molekula speciesz standardot használtuk. Az analízist és az adatkiértékelést is optimalizáltuk, különös figyelmet fordítva a foszfolipid specieszek elválasztására, a szelektivitásra, azonosításra és mennyiségi meghatározásra.

A héjszerkezetű részecskékkel töltött, HILIC oszlopok megfelelő kromatográfiás felbontást biztosítanak a foszfolipid osztályok elválasztására, ezért munkánk során Kinetex HILIC oszlopra esett a választásunk [109,110]. A foszfolipid osztályok hatékonyabb elválasztása érdekében 150 mm hosszúságú kromatográfiás oszlopot használtunk.

A HILIC elválasztás egyik kritikus pontja a megfelelő mozgófázis kiválasztása, ezért három különböző szerves eluent próbáltunk ki: metanolt, acetonitrilt és acetont. A foszfolipid standardok vizsgálatakor metanol szerves eluens használatakor alacsony retenciós időket kaptunk. A legnagyobb retenciós és ionizációs hatékonyságot **PC**, **LPC** és **SM** molekuláknál aceton alkalmazásával érték el. HILIC elválasztás során a mozgófázisnak kis mennyiségű vizet (minimum 3%) mindig tartalmaznia kell [111–113], mivel az állófázis felületén kialakult vízréteg és a kevésbé poláris mozgófázis közötti eltérő megoszlás eredményezi a komponensek eltérő vándorlási sebességét.

Ahhoz, hogy a minimum 3% vizet tartalmazó mozgófázist biztosítsuk, a gradiens elúció 97% szerves fázisról indult és a 4.5.1. fejezetben leírtaknak megfelelően változott. Ez az induló összetétel elegendőnek bizonyult a foszfolipid osztályok elválasztásához és a retenciók reprodukálhatóságához. A mozgófázishoz kevert adalékokkal befolyásolni lehet a vizsgált vegyületek kromatográfiás elválasztásának hatékonyságát, valamint az MS detektálhatóságukat [114]. A módszer optimalizálása során vizsgáltuk az ammónium-acetát illetve az ammónium-formiát hatását, azonban jelentős különbséget a két puffer között nem tapasztaltunk a foszfolipidek visszatartásának és elválasztásának tekintetében. MS detektálásnál fontos szempont, hogy a mozgófázis adalék illékony legyen, így a választásunk az ammónium-formiát sóra esett [110]. 50 mM ammónium-formiát koncentrációja biztosította számunkra a foszfolipidek hatékony elválasztását, elfogadható ionelnyomó hatás mellett.

Az oszlop hőmérsékletének 40–60 °C hőmérséklet közötti változtatása elhanyagolható hatással volt az elválasztásra és csúcsalakra nézve. Figyelembe véve a rendszer nyomását és az oszlop élettartamát, az 50 °C-os oszloptermosztát hőmérséklet megfelelő kompromisszumnak bizonyult.

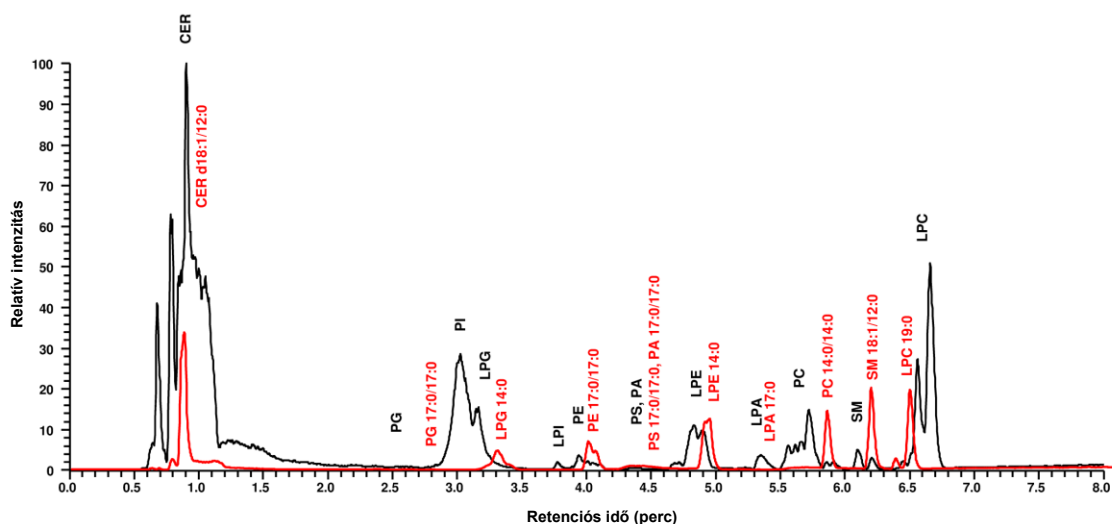
Az áramlási sebesség növelésével csökkentek a retenciós idők és a csúcshélességek, azonban a tömegspektrometriás detektálás során kisebb csúcsterületeket eredményezett. A végleges módszerben 0,4 ml/perc áramlási sebességet alkalmaztunk, amellyel rövid analízis időt és magas szelektivitást értünk el a vizsgált foszfolipidekre. Általánosan elmondható, hogy a gradiens meredeksége kismértékben befolyásolja a szfingofoszfolipid és glicerofoszfátid osztályok kromatográfiás felbontását HILIC módban [110]. Vizsgálataink során a gradiens meredekségét 0,5-ről 3,86-ra változtattuk, amelynek hatására kb. 20%-kal csökkent a foszfolipid osztályok kromatográfiás felbontása, viszont jelentősen növelte a jel/zaj viszony arányát és csökkentette a kromatográfiás csúcs szélességét, így a főbb foszfolipid osztályokat 7 percen belül el tudtuk választani.

A kidolgozott módszerrel előzetes egér vérplazmaméréseket végeztünk, hogy megvizsgáljuk a mátrixhatását az egyes foszfolipid osztályok kromatográfiás viselkedésére. A **22. ábrán** fekete színnel összesített („poolozott”) egér vérplazma bázision kromatogramja látható az azonosított foszfolipid osztályokkal, pirossal pedig a belső standardok extrahált ionkromatogramja látható. A mérés során negatív ESI módot alkalmaztunk és a molekula fejcsoportjától függően az adott foszfolipideket $[M-H]^-$ illetve $[M+COO]^-$ kvázi molekulaionként detektáltuk (**6. táblázat**).

6. táblázat Adott foszfolipid osztályok retenciós időtartománya és a vizsgált kvázi molekulaionok típusai az egér vérplazmában a végleges HILIC-HRMS módszerben.

Foszfolipid osztály	Retenciós idő tartomány (perc)	Megfigyelt ionok, ESI ⁻
PG	2,78 – 2,84	[M–H] ⁻
PI	2,99 – 3,18	[M–H] ⁻
LPG	3,24 – 3,36	[M–H] ⁻
LPI	3,77 – 3,84	[M–H] ⁻
PE	3,89 – 4,08	[M–H] ⁻
PS	4,35 – 4,48	[M–H] ⁻
LPE	4,74 – 5,06	[M–H] ⁻
PC	5,49 – 5,86	[M+HCOO] ⁻
SM	5,86 – 6,21	[M+HCOO] ⁻
LPC	6,47 – 6,81	[M+HCOO] ⁻

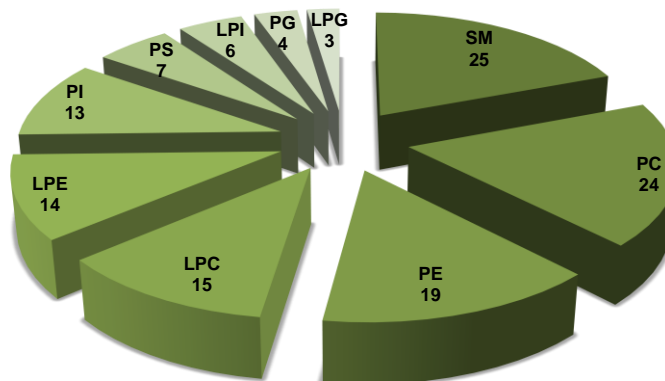
A **CER d18:1/12:0** standardot a kevésbé poláris lipid specieszek kromatográfiás viselkedésének tanulmányozásaként adtuk a foszfolipid standard keverékhez. Érdekes módon a **LPC 19:0** két kromatográfiás csúcsban eluálódott (**22. ábra**), melyek alapvonalban is elváltak (6,37 perc és 6,48 percnél, utóbbi sokkal intenzívebb). A két csúcs fragmentációja megegyezett, azonban az acil fragmentumok aránya eltért. Ez a fajta izomerizáció a glicerín vázon a nonadekanoilcsoport 1,2 migrációjával indokolható [115]. Hasonló izomerizációt figyeltünk meg a **LPE 14:0** esetében is, ahol az *sn*-1 izomernek nagyobb volt a visszatartása. Ha retenciós szempontjából összehasonlítjuk a vegyületeket, akkor látható, hogy a glicerín vázhoz kapcsolódó zsírsavláncok száma befolyásolja az elválasztást, így az adott lipid osztályon belül általában a lizovegyületek eluálódnak később. Például a **LPE 14:0** és **PE 17:0/17:0** retenciós ideje 4,94 illetve 4,03 perc volt. **PS 17:0/17:0**, **PA 17:0/17:0** és **LPA 17:0** esetében a kromatográfiás csúcsoknál torzulást, azaz aszimmetrikus elhúzódot („tailing”) tapasztaltunk, mely a **PS** esetén a foszforilezett szerin csoport ikerionos (zwitterion) alakjának, foszfátidsavak esetén pedig a foszfátcsoport különböző deprotonálódási állapotának tulajdonítható [116].



22. ábra Egér vérplazma HILIC-HRMS bázison kromatogramja, ahol a foszfolipid osztályok feketével, a belső standardok pirossal vannak jelölve.

A kidolgozott HILIC-HRMS módszert egerek vérplazma foszfolipid összetételének meghatározására használtuk, ahol az alábbi 10 foszfolipid osztályt vizsgáltunk: **PG**, **PI**, **LPG**, **LPI**, **PE**, **PS**, **LPE**, **PC**, **SM** és **LPC** (**22. ábra**). Módszerünkkel összesen 130 foszfolipidet azonosítottunk, melyek a *Függelék F2 táblázatában* találhatóak. Az azonosítást a 4.5.1. fejezetben említett módon, saját HILIC-HRMS és HILIC-HRMS/MS méréseinkből készült adatbázisból (mely tartalmazza a retenciósi időket, pontos tömegeket és fragmens ionok tömegét), a LIPID MAPS pontos tömegméréseken alapuló (tömegpontosság ≤ 5 ppm) adatbázis-keresésével, valamint irodalmi források [93–98] alapján végeztük el. Az azonosított szfingofoszfolipid és glicerofoszfátid molekula specieszek számát a foszfolipid osztályokon belül és azok eloszlását a **23. ábra** mutatja be. A **LPI**, **LPE** és **LPC** egyes eseteiben sikerült az *sn*-1 és *sn*-2 izomerek elválasztása. A legtöbb molekula specieszt a **SM**, **PC** és **PE** osztályok esetén azonosítottuk. Az alkil-étert és vinil-étert tartalmazó foszfolipidek meghatározóan a **PE** és **PC** osztályokban voltak jelen. A **LPC** és **LPE** nagyobb mennyiségben volt jelen a többi lizofoszfolipiddel szemben. Sajnos a kidolgozott módszerünk nem volt megfelelő a **PA** és **LPA** mennyiségi meghatározására a már említett kromatográfiai csúcstorzulás miatt.

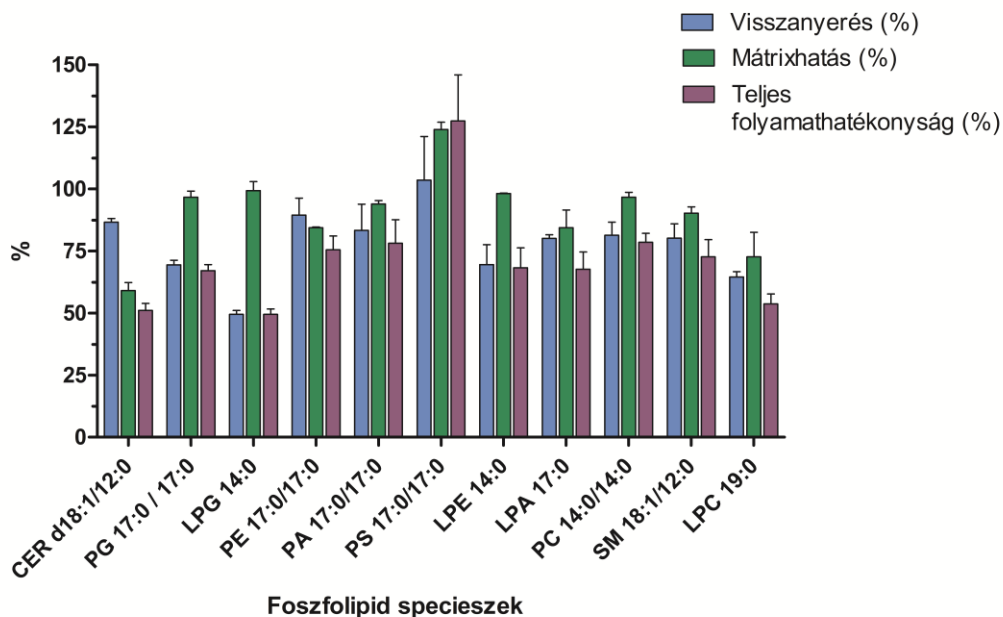
A kiértékelés során az egyes foszfolipid molekula specieszek relatív mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy a foszfolipid molekula specieszek normalizált csúcsterületét elosztottuk az osztályon belüli foszfolipid molekula specieszek normalizált csúcsterületének összegével, és az eredményt megszoroztuk százal.



23. ábra Az egér vérplazma foszfolipid molekula specieszek számának eloszlása a foszfolipid osztályokon belül.

Az összetett biológiai minták esetében, mint a vérplazma, különös figyelemmel kell a mintaelőkészítés során eljárunk, mivel a mátrixban lévő egyéb endogén komponensek, illetve a mintaelőkészítés során bekerült további anyagok befolyásolják a mérendő vegyületek kromatográfiás viselkedését, visszanyerését, ionizálhatóságát és így detektálhatóságát. Ez különösen igaz az ESI mérések esetében [117]. Így a munkánk során a 4.1.1. fejezetben bemutatott összes foszfolipid standardra megvizsgáltuk a visszanyerést, mátrixhatást és a két paraméter eredőjét, a teljes folyamathatékonyaságot. A kapott eredményeket a 24. ábra foglalja össze, melyeket a 2–4. képlet szerint számoltunk ki [90,91].

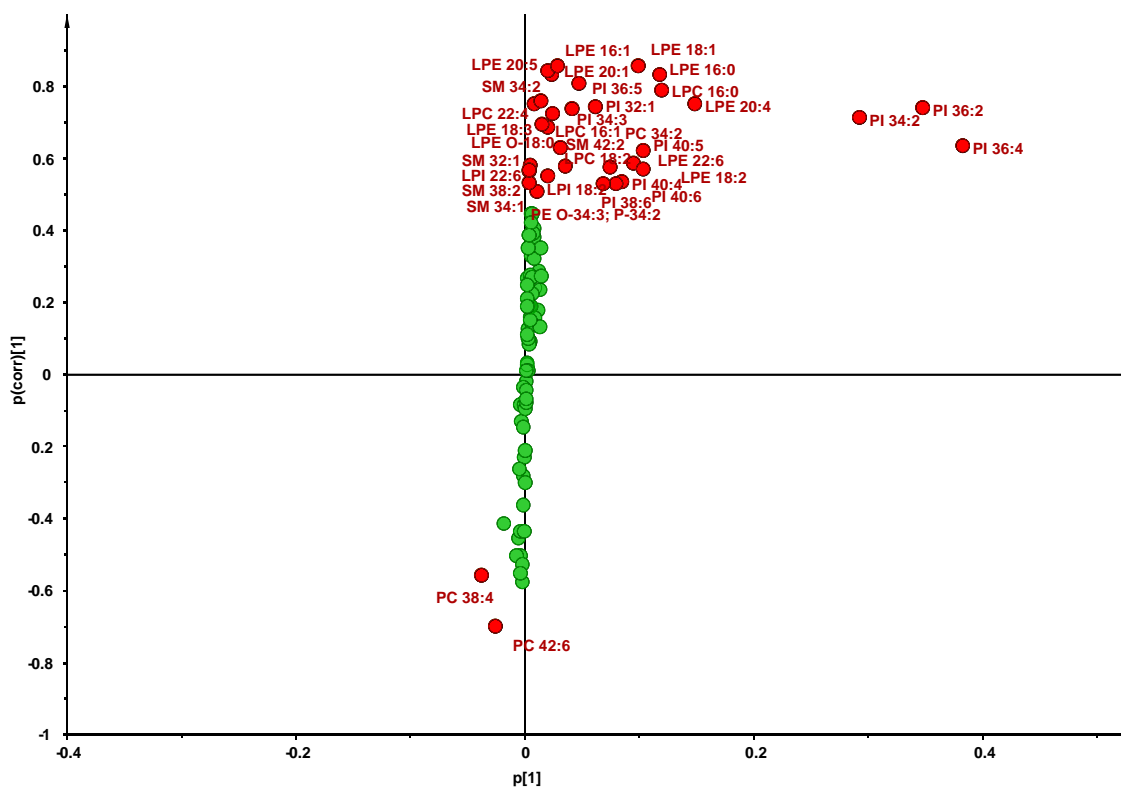
A visszanyerés átlagosan 78% volt a vizsgált foszfolipid és ceramid standardokra, kivéve a **LPG 14:0**, ahol a visszanyerés 49,5% volt. Érdekességképpen az egyes lipid osztályok lizofoszfolipidjei esetében alacsonyabb visszanyerést kaptunk. A vizsgált foszfolipid standardok mátrixhatása 84,3–99,4% tartományba esett. A **PS 17:0/17:0** esetében a mátrixban lévő egyéb komponensek segítették a vegyület ionizálódását, míg a **CER d18:1/12:0** (59%) és a **LPA 17:0** (72,6%) esetében csökkentették az ionizáció hatásfokát. Ez azzal magyarázható, hogy a mátrixban lévő nagy koncentrációjú, jól ionizálódó egyéb komponensek ionelnyomó hatást eredményeznek az ionizáció során. Az összes foszfolipid standardra az átlagos teljes folyamathatékonyaság 71,8% volt, kivéve **CER d18:1/12:0** (51,1%) és **LPA 17:0** (53,7%) esetében. **PS 17:0/17:0** esetében 100%-nál magasabb teljes folyamathatékonyaság értéket kaptunk.



24. ábra A foszfolipid standardok visszanyerése, mátrixhatása és teljes folyamathatékonyossága.

A kidolgozott HILIC-HRMS módszerünket végül 8 szorongó és 8 nem szorongó egér vérplazma foszfolipid tartalmának összehasonlító vizsgálatára alkalmaztuk. A méréseink során 10 foszfolipid osztály 130 endogén specieszét azonosítottuk, melyek szám szerint a következők: 4 **PG**, 3 **LPG**, 13 **PI**, 6 **LPI**, 19 **PE**, 14 **LPE**, 24 **PC**, 15 **LPC**, 7 **PS** és 25 **SM** (23. ábra). Az egyes foszfolipid osztályok összmennyiségének meghatározásához összeadtuk az adott osztályokba tartozó specieszek csúcsterületeinek arányát. A szorongó és nem szorongó egereknél kapott értékeket összehasonlítottuk. Mindegyik foszfolipid osztályra elmondható, hogy a szorongó egerekben alulszabályozottak, azaz kisebb mennyiségben fordultak elő a nem szorongó egyedekhez képest. A **SM**, **PI**, **LPC** és **LPE** foszfolipid osztályok esetében szignifikáns különbség volt megfigyelhető.

A kapott normalizált csúcsterületeket statisztikai elemzését SIMCA és GraphPad 5 programokkal végeztük. A főkomponens analízissel igazoltan elkülönül a szorongó és nem szorongó egerek csoportja, míg az OPLS-DA eredményekkel alátámasztottuk, hogy a különbségeket a két csoportban szignifikánsan eltérő foszfolipid specieszek adják. Az S-diagram segít értelmezni az OPLS-DA eredményeit, valamint előre jelzi a lehetséges biomarkereket [118]. Az S-diagram a nevéből adódóan gyakran az S betű alakját veszi fel, és az S két végén azok a változók helyezkednek el, melyeknek magas a megbízhatósága, valamint mutatja a lehetséges alul- és felülszabályozott biomarkereket.



25. ábra A szorongó és nem szorongó egerek vérplazma foszfolipidjeinek S diagramja. Pirossal a szignifikáns különbséget mutató foszfolipid specieszek vannak jelölve.

A statisztikai programok segítségével kimutatott 130 foszfolipid speciesz közül 35 volt szignifikánsan eltérő a két egércsoport vérplazmájában ($p \leq 0,05$), melyet a 25. ábra mutat piros színnel. Ezek közül csupán két komponens, a **PC 38:4** és a **PC 42:6** volt szignifikánsan alacsonyabb koncentrációjú a szorongó egerekben. A legnagyobb változást a **PI 32:1**-nél figyeltük meg, mely 4,55-szörös volt. A kétszeresnél nagyobb változást a **PI 36:5**, **LPE 16:1** és **LPE 20:5** komponenseknél mutattuk ki. 11 speciesznél tapasztaltunk 50 és 100% közötti változást, melyek az következők: **PI 34:3**, **PI 40:4**, **PI 40:5**, **LPI 22:6**, **LPE 16:0**, **LPE 18:1**, **LPE 18:3**, **LPE 20:1**, **PC 42:6**, **LPC 16:1** és **LPC 22:4**. A 35 azonosított komponens között a telítetlen zsírsavakat tartalmazó foszfolipidek voltak túlsúlyban (összesen 31 db), melyekből 16 többszörösen telítetlen. A leginkább felülszabályozott a **LPE** és **PI** glicerofoszfamid osztályok voltak. Emellett megfigyeltük, hogy a statisztikailag eltérő ($p \leq 0,05$) **LPE**-k normalizált csúcsterületeinek összege a vérplazmában található **LPE**-k 98%-át tette ki, míg ez az érték **PI** esetén ez az érték 34% volt. Ennek oka, hogy a **PI 38:4** a vérplazmában a legnagyobb mennyiségben előforduló foszfatidil-ionozitol (62%-a a teljes **PI**-nek), amely nem mutatott szignifikáns eltérést. A szfingomielinek esetében az **SM 32:1**, **SM**

34:1, **SM 34:2**, **SM 38:2** és **SM 42:2** mutatott jelentős eltérést a két csoport közt. Érdekesképpen, a két egércsoport között jelentős változást mutató éter és plazmalogéneket is sikerült azonosítani (**LPE O-18**; **LPC P-18:0**; **PE O-34:3**, **P-34:2**).

Munkánk során a vérplazma foszfolipid összetételére összpontosítottunk, mely jelezheti a szorongásos betegségek kialakulását. Korábban leírták, hogy a vérplazmában az n-6 zsírsavak, glicerofoszfátidek és szfingofoszfolipideinek korrelációt mutatnak a depressziós kórképekkel, melyek további vizsgálatával biomarkereket azonosíthatunk a betegség előrejelzésére és kimutatására [119,120]. *Wei és munkatársai* hasonlóan a glicerofoszfátidokban találtak különbséget a szorongásos zavarokat vizsgálva [121]. *Tian és munkatársai* által közölt kutatás is alátámasztja, hogy a szorongó egerek szérum és hippokampusz összlipid szintjeiben a fő változások a glicerofoszfátidekhez köthetők [122]. A munkánk során kifejlesztett HILIC-HRMS módszer és az alkalmazott bioinformatikai szoftverek gyors és átfogó eszközt biztosítanak a vérplazma foszfolipid mennyiségi meghatározására és minőségi vizsgálatára. Összesen 10 osztályt lefedő, 130 vérplazma foszfolipidet sikerült mennyiségileg meghatározni. A végső módszerünket 8 szorongó és 8 nem szorongó egér vérplazmájának foszfolipid összetételének elemzésére használtuk. A **PI**, **LPE**, **SM** és **PC** osztályok összkoncentrációjában jelentős növekedést tapasztaltunk a szorongó csoportban. 35 foszfolipid speciesz esetében szignifikáns eltérést figyeltünk meg a szorongó egerekben a nem szorongó egyedekhez képest. Kiemelendő, hogy 33 foszfolipid speciesz a szorongó egérmodellben felülszabályozott, míg a **PC 38:4** és **PC 42:6** esetében alulszabályozottságot figyeltünk meg. *Tian és munkatársai* [122] által bemutatott eredményekhez hasonlóan nálunk is a **LPE** osztály mutatta a legjelentősebb változást. A legnagyobb eltéréseket (> 2-szeres változás) a két csoport között a **PI 32:1**, **PI 36:5**, **LPE 16:1** és **LPE 20:5** esetében figyeltük meg.

5.2. Az agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid vizsgálata online 2D-UHPLC-HRMS módszerrel

Az irodalmi eredmények alátámasztják azt a nézetet, miszerint az agy membránképző lipidjei döntő szerepet játszhatnak a depresszióban és a szorongásos rendellenességekben. A szorongásos betegségek biológiai hátterében jelenlegi feltevések szerint az ingerületátvivő anyagok és a peptidek működési zavara áll. A

lipidek azonban, mint sejtmembrán komponensek, alapvető szerepet játszanak a különféle receptorok lokalizációjában és működésében. Ezáltal az agyban található lipidek diszregulációja hozzájárulhat a súlyos depressziós és szorongásos kórképhez [41]. A munkánk során komplex egéragy foszfolipid összetételének meghatározására egy online 2D-UHPLC-HRMS módszert fejlesztettünk ki. Az első dimenzióban a főbb foszfolipid osztályok HILIC elválasztását követően az adott frakciók foszfolipid komponenseinek online dúsítása egy fordított fázisú csapdaoszlopon történt. A fordított fázisú C18 állófázis alkalmazásával, az azonos osztályhoz tartozó foszfolipidek kromatográfiás visszatartását befolyásolja a zsírsavláncok száma és hossza, valamint a kettős kötések száma és azok elhelyezkedése [28], ezért a második dimenzióban az adott osztály foszfolipid specieszeinek elválasztása történt, melyet HRMS detektálás követett. A módszerfejlesztés során számos kromatográfiás paramétert vizsgáltunk és optimalizáltunk.

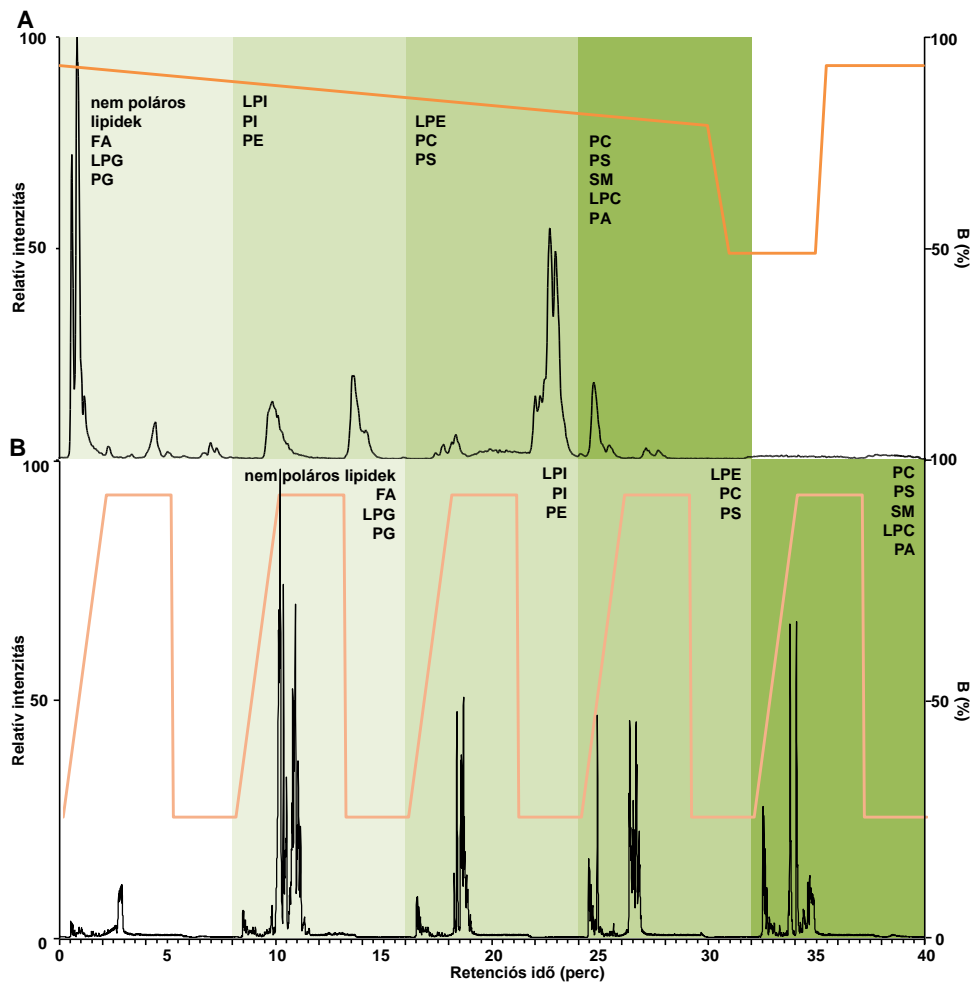
Hasonlóan az 5.1 fejezetben leírtakhoz 11 foszfolipid osztályt lefedő 11 foszfolipid specieszt alkalmaztunk a foszfolipidek vizsgálatára. Az első dimenzió optimalizálásakor 2,1 mm belső átmérőjű, porózus töltetű, Kinetex HILIC 100 mm és 150 mm hosszú oszlopokat vizsgáltunk, és az utóbbi esetében hatékonyabb elválasztást kaptunk a foszfolipid osztályokra, így ezzel végeztük a további kromatográfiás paraméterek optimalizálását. A mozgófázis szerves komponenseként metanol, acetonitrilt és acetont vizsgáltunk, melyek közül a legnagyobb retenciót és a legjobb elválasztást a **PC**-k és **SM**-ek esetében aceton alkalmazásával értük el, így a végső módszerhez ezt választottuk ki. HILIC módban a mozgófázis vízkoncentrációja jelentősen befolyásolja a retenciós idő reprodukálhatóságát és a retenciós mechanizmust [111,112], ezért az előző fejezetben leírtakhoz hasonlóan, a vizet minimum 3%-on tartottuk a mozgófázisban. Az *A* eluensben 50 mM ammónium-formiátot használtunk mozgófázis adalékként, a *B* eluens pedig aceton volt. A 40 perces analízis során 11 foszfolipid osztályt választottunk el, melyek a következők voltak: **PG, PI, LPG, LPI, PE, PS, LPE, PC, PA, SM** és **LPC**. A foszfolipid specisek második dimenzióban történő elválasztásához az első dimenzió eluátumát 5 frakcióra osztottuk egységes 8 perces retenciós időablakkal.

Már a 2.2 fejezetben is említésre került, hogy egy 2D-LC rendszerben az első dimenzió eluátumának csapdázására, illetve gyűjtésére általában csapdaoszlopot vagy hurkot alkalmaznak. Csapdaoszlop használata esetén, különös tekintettel az ortogonális rendszerekre (például NP×RP, HILIC×RP), az első dimenzió eluátumának erősségét

úgy kell beállítani, hogy a mérendő anyagok a csapdaoszlopon megfelelő hatékonysággal dúsuljanak. A HILIC×RP módszerünk kidolgozása során nem kellett az oldószer-összeférhetetlenséggel számolnunk, hiszen az alkalmazott oldószerek egymással korlátlanul elegyednek. A HILIC elválasztás mozgófázisa nagy elúciós erősséggel rendelkezik a második dimenziós fordított fázisú elválasztás során. Ezért a módszerfejlesztés során az első dimenziós eluátumot alacsony eluens erősségű 5 mM ammónium-formiát vizes oldatával hígítottuk ki, a vizsgált foszfolipid specieszek hatékony csapdázása érdekében. A HILIC eluátum elúciós erősségének csökkentése céljából vizsgáltuk a hígító oldat áramlási sebességének hatását a foszfolipid specieszek csapdázási hatékonyságára 0,2–1 ml/perc tartományban. A foszfolipid specieszek csapdázási hatékonyságának és a csapdázás során fellépő nyomásnövekedést figyelembe vételével, a 0,6 ml/perces áramlási sebesség megfelelő kompromisszumnak bizonyult.

A foszfolipid specieszek fordított fázisú elválasztására Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm részecskeméretű oszlopot választottunk ki. Foszfolipidek fordított fázisú mérése során fontos szempont, hogy a nagy visszatartással rendelkező foszfolipidek eluálásához megfelelő szerves oldószert kell a mozgófázishoz választani. Az analitikai módszer kidolgozása során nagy elúciós erősségű, vízzel elegyedő acetont választottuk szerves oldószerként a *B* eluensben. 5 mM ammónium-formiát mozgófázis adalék mellett, az *A* eluens összetétele 50:50 (v/v%) arányú víz és acetonitril elegye volt, a *B* eluens pedig 5%-ban (v/v%) vizet tartalmazó aceton volt. Az UHPLC-HRMS módszer második dimenziójának optimalizálása során vizsgáltuk az oszlop hőmérsékletét, a mozgófázis áramlási sebességét és a gradiens meredekségét. Szinkronban az első dimenziós HILIC elválasztással és a megfelelő második dimenziós retenció és kromatográfiás felbontás elérésének érdekében 8 perces futási időt állítottunk be a második dimenziós elválasztáshoz, amely magába foglalta az oszloposítást és egyensúlyozást is. Mind az öt HILIC frakció esetében egységes gradiens programot alkalmaztunk a második dimenzióban annak érdekében, hogy az egymást követő második dimenziós elválasztás során azonos retencióval eluálódjanak azok a foszfolipid specieszek, amelyek két HILIC frakcióban is jelen voltak (mint például egyes **PC** és **PS** komponensek). Így tudtuk tartani a közel azonos kromatográfiás és ionizációs körülményeket a több HILIC frakcióban jelenlévő specieszek esetében, amely fontos szempont a mennyiségi analízis során. A **26. ábra** szemlélteti a végleges módszerhez tartozó első és második dimenziós gradiens programot (narancssárga

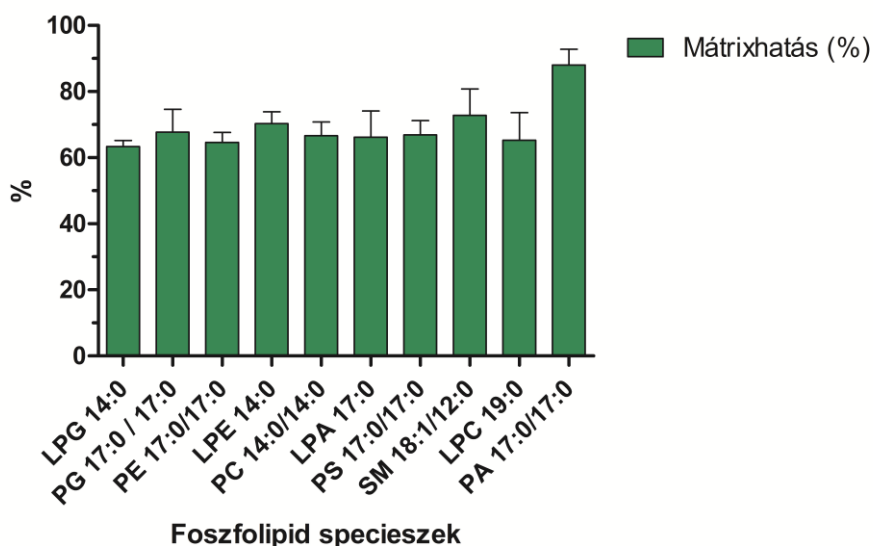
vonala), és az első és második dimenziós bázison kromatogramokat egy nem szorongó egér **VHPC** agymintáján keresztül. Az alkalmazott kromatográfiai paraméterek megfelelő kompromisszumnak bizonyultak a rendszer nyomása, a vizsgált vegyületek retenciója, szelektivitása, valamint az ionizációs hatékonyságuk szempontjából.



26. ábra Nem szorongó egér VHPC agymintájának bázison kromatogramja az első (A) és második (B) dimenzióban feltüntetve az adott frakcióban lévő lipidosztályokat. A narancssárga vonal jelöli a gradiens programot.

Egy analitikai módszer kidolgozásakor fontos szempont az alkalmazott mintaelőkészítés hatékonyságának vizsgálata. A munkánk során az agyi foszfolipidek dúsítására módosított *Folch* extrakciót [89] alkalmaztunk, amelynek hatékonyságát az 4.4.1 fejezetben részletezett módszert követve meghatároztuk a vizsgált foszfolipid standardok visszanyerését (**2. képlet**) és mátrixhatását (**3. képlet**). A kapott eredményeket összegezve elmondhatjuk, hogy az átlagos visszanyerés 85% feletti értéke egy hatékony extrakciós módszerre utal. A **27. ábrán** látható mátrixhatás átlagos

értékei 63,0 és 88,0% között mozogtak, ami elfogadható ionelnyomó hatás tekintettel az agyszövet összetettségére.

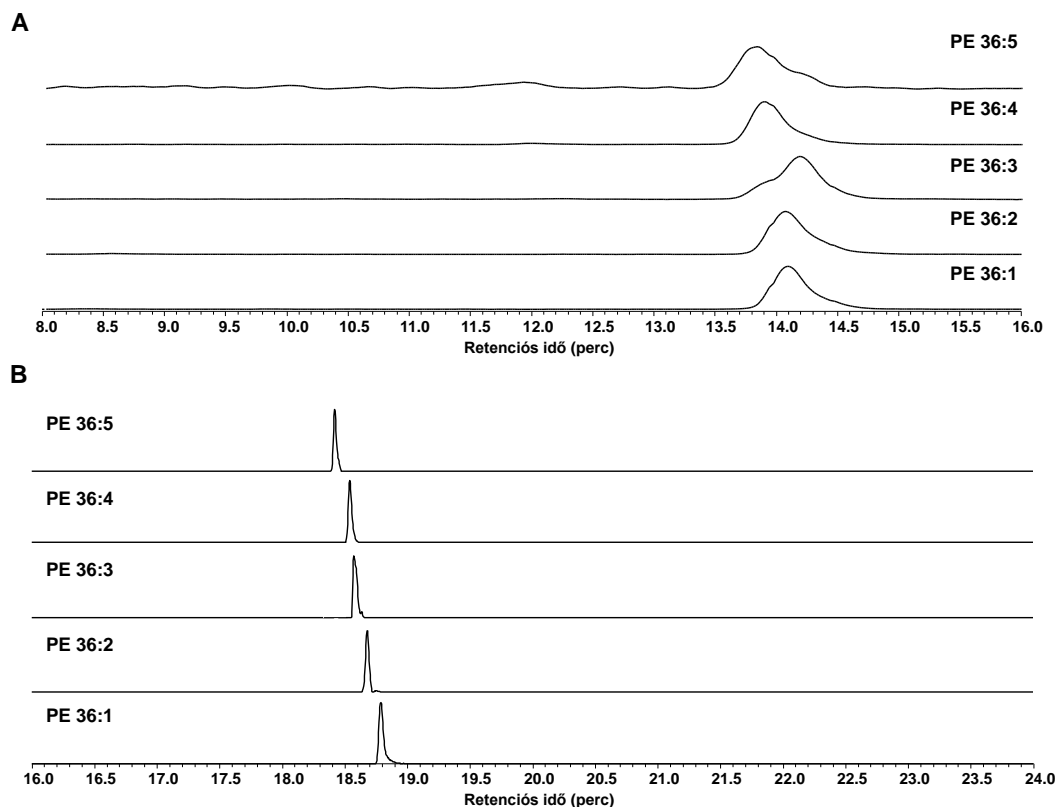


27 ábra A vizsgált foszfolipid standardok átlagos mátrixhatása.

Az alkalmazott 2D-UHPLC-HRMS módszer előnyét öt endogén **PE** speciesz első és második dimenziós elválasztása során kapott extrahált ionkromatogramokon keresztül szeretném szemléltetni (28 ábra). Az öt vizsgált vegyületnél négy esetben kaptunk alapvonalra történő elválasztást ($R_S \geq 1,5$), részletezve: a **PE 36:5-PE 36:4** ($R_S=2,64$); **PE 36:4-PE 36:3** ($R_S=0,67$), **PE 36:3-PE 36:2** ($R_S=2,14$) és **PE 36:2-PE 36:1** ($R_S=1,94$). A módszerünkkel az **LPI**, **LPE** és **LPC** osztályokban több esetben sikerült az *sn*-1 és *sn*-2 izomereket is elválasztani (F3. táblázat). A kromatográfias felbontást (R_S) a 9. képlet alapján számoltuk ki:

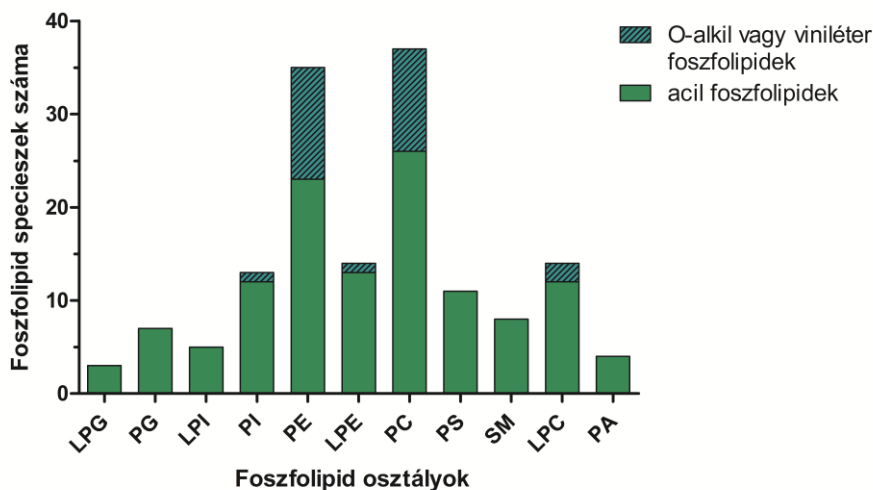
$$R_S = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad [9. \text{ képlet}]$$

ahol t_{R1} a korábban eluálódott csúcs retenciós ideje, t_{R2} a később eluálódott csúcs retenciós ideje, w_1 a korábban eluálódott csúcs alapvonalnál mért csúcshélessége és w_2 a később eluálódott csúcs alapvonalnál mért csúcshélessége.



28. ábra Öt kiválasztott PE speciesz egydimenziós HILIC-HRMS (A) és 2D-UHPLC-HRMS (B) módszerrel kapott extrahált ionkromatogramjai.

Feltételezésünk szerint a szorongó és nem szorongó egerek agyi foszfolipid összetételében különbség lehet, ennek igazolására az új 2D analitikai módszerünket alkalmaztuk 8 szorongó és 9 nem szorongó egér összehasonlításának vizsgálatára. Mennyiségi méréseket megelőzően kibővítettük a már meglévő adatbázisunkat az új 2D-UHPLC-HRMS módszer egéragyra kapott eredményeivel (**F3. táblázat**). A mérések során 151 endogén glicerofoszfamid és szfingomielin specieszt azonosítottunk, melyek osztályonként számszerűsítve a következők voltak: 3 **LPG**, 7 **PG**, 5 **LPI**, 13 **PI**, 35 **PE**, 14 **LPE**, 37 **PC**, 11 **PS**, 8 **SM**, 14 **LPC** és 4 **PA**. A kapott eredményeink alátámasztják azt a megállapítást, hogy az idegszövetek nagy számban tartalmaznak plazmánsavat és plazménsavat [123]. A **29. ábra** az acil-, alkil-éter- és vinil-éter oldalláncokat tartalmazó agyi foszfolipid osztályok szerinti eloszlását szemlélteti. Az ábrán jól látható, hogy a legtöbb plazmalogén és az éter analóg döntően a **PE** és **PC** osztályokhoz rendelhető.



29. ábra Az egeragyban azonosított foszfolipid specieszek.

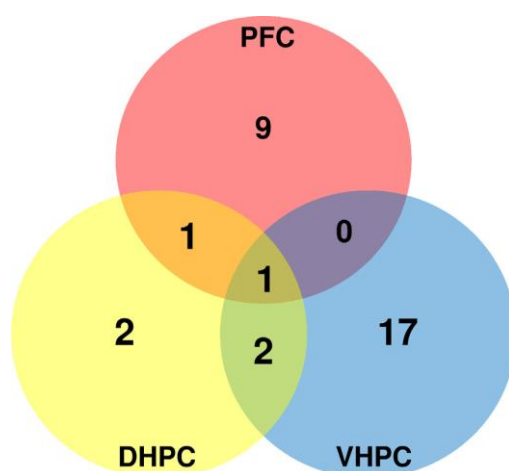
A mennyiségi vizsgálataink kiterjedtek a szorongó és nem szorongó egerek **VHPC**, **DHPC** és **FPC** agyrégióinak foszfolipid összetételének meghatározására. Az azonosított foszfolipidek mennyiségi meghatározásához az egyes foszfolipid specieszek csúcslista készítését követően, a kapott csúcsterületeket a megfelelő osztályhoz tartozó belső standarddal normalizáltuk. Az azonos foszfolipid osztályba tartozó specieszek normalizált csúcsterületeinek összegzését követően megkaptuk az egyes specieszek osztályon belüli százalékos eloszlását (**F3 táblázat**). A két egértörzs **DHPC**, **VHPC** és **PFC** agyrégióiban azonosított adott osztályhoz tartozó összes foszfolipid normalizált csúcsterületeinek statisztikai kiértékelését követően elmondhatjuk, hogy a **VHPC** és **PFC** agyrégiókban 4 foszfolipid osztály esetén jelentős különbséget figyeltünk meg. A **LPG** és **PA** normalizált csúcsterületei a **PFC**-ben növekedést mutattak a nem szorongó egyedekhez képest, míg a **PS** szignifikáns csökkenést mutatott. Hasonló csökkenő tendenciát figyeltünk meg a **VHPC PE** összetételében.

A három agyrégió 151 vizsgált foszfolipid speciesze közül 37 foszfolipid esetében szignifikáns különbség volt megfigyelhető. Az eredményeket a *Függelékben* található **F4. táblázat** foglalja össze. A két egértörzs egyes agyrégióinak összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a szorongó egerek **DHPC** agyterületében csak a **SM 36:1** esetében volt emelkedés megfigyelhető, szemben az öt alulszabályozott **PE** speciesszel.

A **VHPC** régiók foszfolipid összetételének vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a **PE**, **PC**, **PI** és **PG** osztályokból származó 20 szignifikánsan különböző speciesz alacsonyabb koncentrációban volt jelen a szorongó egyedekben.

A **PFC** vizsgálatokor 11 speciesz esetében azonosítottunk szignifikáns különbséget, amelyek közül a **PE 38:0**, **PS 36:1**, **PS 40:6**, **LPE 20:1** és a **PE O-38**; **PE P-38:2** volt alulszabályozott a szorongó csoportban. Érdekességképpel elmondható, hogy ellentétben a **DHPC** és **VHPC** agyi régiókkal, a **PE 40:5** nagyobb mennyiségben volt jelen a szorongó egerek **PFC**-ében.

Az egyes foszfolipid specieszek mennyiségi változásának vizsgálatokor a legnagyobb mértékű növekedést a **PE 40:5**, **PA 36:2** és a **PC 42:9**-nél, míg csökkenést a **PE 38:0**, **LPE 20:1 (sn-2)** és **PS 36:1** esetében tapasztaltunk.



30. ábra A szignifikánsan különböző foszfolipid specieszek száma agyrégiók szerinti eloszlása.

Végezetül megvizsgáltuk a szignifikáns különbséget mutató specieszek agyterület szerinti eloszlását. A 37 foszfolipid speciesz közül csak a **PE 40:5** mutatott szignifikáns különbséget, azonban eltérő irányú változást a három vizsgált agyrégióban (**30. ábra**).

Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk kidolgozott átfogó, online 2D-UHPLC-HRMS módszer alkalmas agyi glicerofoszfátid és szfingofoszfolipid specieszek azonosítására és mennyiségi meghatározására. Az újszerű rendszerünkben a HILIC és a fordított fázisú elválasztás összekapcsolását úgy terveztük meg, hogy két fordított fázisú csapdaoszlop segítségével párhuzamosan, online módon történt a különböző foszfolipid osztályhoz tartozó specieszek csapdázása és fordított fázisú elválasztása valamint detektálása. Az új 2D analitikai módszer alkalmazása során összehasonlítottuk a szorongó és nem szorongó egerek agyi foszfolipid összetételét. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy 37 foszfolipid speciesz esetében

szignifikáns különbség volt megfigyelhető, amelyek közül 20-at azonosítottunk **VHPC**-ban, 6-ot **DHPC**-ban és 11-et **PFC**-ben. Fontos megjegyezni, hogy a szorongó csoport **VHPC** agyterületében a foszfolipid specieszek koncentrációban egyirányú változást mutattunk ki. Összességében elmondható, hogy az általunk kifejlesztett, teljesen automatizált, online 2D-UHPLC-HRMS módszert sikeresen alkalmaztuk az agyi foszfolipidek jellemzésére a szorongásos betegségeket egér modelljének vizsgálatakor.

5.3. Célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer a dimetiltriptamin kimutatására

Napjainkban a **DMT** célzott mennyiségi meghatározására biológiai mintákból az LC-MS/MS kapcsolt technika az egyik legelterjedtebb bioanalitikai módszer. A nagyfelbontású tandem tömegspektrometriás (HRMS/MS) módszert kombinálva egy ortogonális 2D-LC elválasztással megbízhatóbb adatokkal szolgálhat biológiai minták vizsgálatakor. A 2D-LC-HRMS/MS technikával kisebb mintatérfogat esetében is hasonló, vagy akár jobb kimutatási határt lehet elérni. Elsődleges célunk volt egy új, gyors célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS analitikai módszer kidolgozása, amely alkalmas iszkémiát előidéző patkány kísérletekben alkalmazott **DMT** mennyiségi változásának nyomon követésére agy és vérplazma mintákban. További céljaink között szerepelt a 2.5 fejezetben tárgyalt elméletek szerinti endogén **DMT** jelenlétének igazolása.

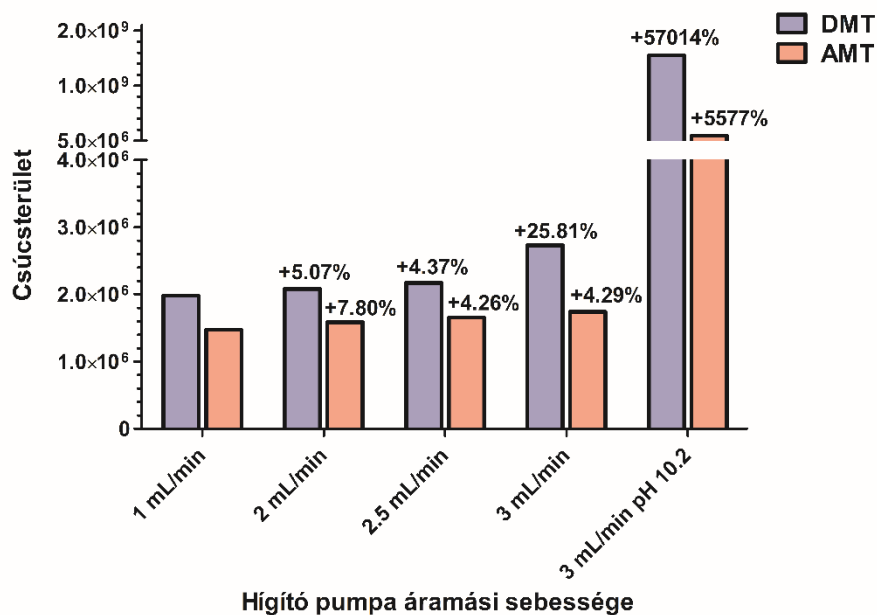
A módszerfejlesztés első lépésében meghatároztuk a **DMT** és belső standardként használt **AMT** megfelelő ionátmeneteit és az ahhoz tartozó főbb tömegspektrometriás paramétereket, amelyeket a 4.5.3. fejezetben található **21. ábrán** és **5. táblázatban** foglaltam össze.

Az új analitikai módszerrel kapcsolatos fontos kritériumként fogalmaztuk meg, hogy a teljes kromatográfiás futási idő ne haladja meg a 10 percet. Az első dimenzióban HILIC elválasztást alkalmaztunk, melyhez 2,1 és 3 mm belső átmérőjű, különböző állófázisú, teljesen porózus vagy héjszerkezetű töltettel rendelkező, 100 és 150 mm hosszú oszlopokat teszteltünk. Az első dimenziós oszlop kiválasztásához egységesen 6 perces, 0,3 ml/perces áramlási sebességű izokratikus elválasztást alkalmaztunk, mely során a mozgófázis 90:10 (v/v%) arányú 50 mM ammónium-formiát vizes oldata és 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril volt. A Luna Omega Sugar oszlop vizsgálatakor a **DMT** ($t_R=1,35$ perc) és az **AMT** ($t_R=1,40$ perc) kis retenciós idővel

eluálódott aszimmetrikus csúcsalakkal. Hasonló eredményt kaptunk a Luna NH₂ oszlop esetében is, a **DMT** ($t_R=1,23$ perc) viszonylag alacsony visszatartása mellett az **AMT** esetében extrém nagy csúcshélességet figyeltünk meg. Nagyobb visszatartást sikerült elérni 1 perces csúcshélesség mellett a vizsgált két komponensre (**DMT** $t_R=3,89$ perc, **AMT** $t_R=4,84$ perc) Luna HILIC oszlop vizsgálatokor. A Kinetex HILIC állófázis esetében tapasztalt nagy visszatartás szükségessé tette a mozgófázis szerves tartalmának 15%-ra történő emelését, hogy a vizsgált komponensek 6 perc alatt eluálódjanak. Érdekesképpen megemlíteném, hogy az állófázison fellépő retenciós mechanizmus a nagyobb visszatartás és szimmetrikus csúcsalak mellett elúciós sorrendváltozást (**AMT** $t_R=2,72$ perc, **DMT** $t_R=3,09$ perc) is okozott. A vizsgált két vegyületre kapott kedvező kromatográfiás viselkedés miatt a Kinetex HILIC oszlopot választottuk ki az első dimenziós elválasztáshoz. Tekintettel a vizsgált biológiai minták összetettségére és a gyors analízisre a HILIC elválasztás során oldószer és áramlási sebesség gradienst alkalmaztunk (**F5. táblázat**).

A második dimenzió optimalizálása során fontos szempont volt az alacsony kimutatási határ elérésének érdekében, hogy az **AMT** és a **DMT** megfelelő visszatartás mellett keskeny és szimmetrikus kromatográfiás csúcsalakkal eluálódjanak. A módszerfejlesztés során öt különböző C18 állófázist vizsgáltunk. Az összehasonlítás során egységesen a mozgófázis 0,1% hangyasav tartalma mellett az *A* eluens víz, a *B* eluens pedig metanol volt. Az alkalmazott oldószer gradiens program a következő volt: 0–1 perc 10% *B*, 1–4 perc 40% *B*, majd 6 perc alatt az oszlop mosása és egyensúlyozása történt. A CORTECS C18, az Omega PS C18 és a Kinetex C18 állófázisok alkalmazásakor viszonylag széles kromatográfiás csúcsokat figyeltünk meg (kb. 0,5 perc a **DMT** és 0,3 perc az **AMT** esetében). A BEH C18 és az Omega Polar C18 oszlopoknál nagyobb visszatartást és keskenyebb csúcshélességet kaptunk a két vegyületre. A kedvezőbb csúcshélesség miatt a 1,6 μm részecskemérettel rendelkező Omega Polar C18 oszlopot választottuk ki további vizsgálatokhoz a második dimenzióban. A mozgófázis szerves oldószer típusa befolyásolhatja a kromatográfiás csúcshélességét és a retenciós mechanizmust. Metanol acetonitrilre történő cseréje keskenyebb csúcshélességeket eredményezett a retenciós idők kismértékű csökkenése mellett a vizsgált két vegyületnél. A második dimenziós gradiens program optimalizálása során további szempont volt az első dimenziós gradiens programmal történő szinkronizálás.

Az első dimenziós HILIC oszlop eluátumában lévő **DMT** és **AMT** csapdázását egy C18 csapdaoszlop segítségével hajtottuk végre. A vizsgált komponensek hatékony csapdázásának érdekében csökkentenünk kellett az első dimenzió eluátumának eluens erősségét. A 4.5.3. fejezet **20. ábrája** mutatja be a 2D-UHPLC-HRMS/MS rendszer felépítését és működését. Az első és második dimenzióban lévő kromatográfiás oszlopokat két programozható kétállású hat utas szelepen és egy C18 csapdaoszlopon keresztül kapcsoltuk össze. Az első dimenziós HILIC eluátum hígítását az oszlop után egy statikus T-keverőn keresztül csatlakoztatott hígító pumpa segítségével végeztük. A hígító eluens összetétele és annak áramlási sebessége befolyásolja a vizsgált vegyületek első dimenziós elválasztás eluátumából a csapdaoszlopon történő dúsításának hatékonyságát. A hígító eluens áramlási sebességének a **DMT** és **AMT** csapdázási hatékonyságára gyakorolt hatásának vizsgálatokor a fordított fázisú elválasztás során kis eluens erősséggel rendelkező 0,1% hangyasav vizes oldatát használtunk. Kezdetben az 1 ml/perc áramlási sebesség alacsony csapdázási hatékonyságot eredményezett (**31. ábra**). A hígító eluens áramlási sebességének további növelése (1; 2; 2,5 illetve 3 ml/perc) csak kis mértékben segítette a két vegyület visszatartását a csapdaoszlopon. A magas vizes oldószertartalom mellett tapasztalt alacsony csapdázási hatékonyság a **DMT** (pK_s : 8,68) [124] és az **AMT** (pK_s : 9,96) [125] savi disszociációs állandójával magyarázható. Az alkalmazott 0,1% hangyasav vizes hígító eluens 2,7-es pH-ja mellett a **DMT** és az **AMT** protonált formái dominálnak, amelyek fordított fázisú elválasztás során alacsony visszatartással rendelkeznek. Ezért a protonált forma visszaszorításával a csapdázási hatékonyság javítható a hígító eluens pH-jának növelésével. A hígító eluens vizes ammóniaoldatra (pH=10,2) történő cseréje elfogadható kompromisszumnak bizonyult, ha figyelembe vesszük a vizsgált vegyületek protonáltsági állapotát valamint a csapdaoszlop és a második dimenziós oszlop pH-stabilitását. A **31. ábra** jól szemlélteti a csapdázási hatékonyság drámai javulását a hígítószer pH-jának növelésével. A **DMT** csúcsterületének nagyobb mértékű emelkedése az **AMT**-hez képest, az alacsonyabb pK_s értékével magyarázható (~1,3 egység eltérés).



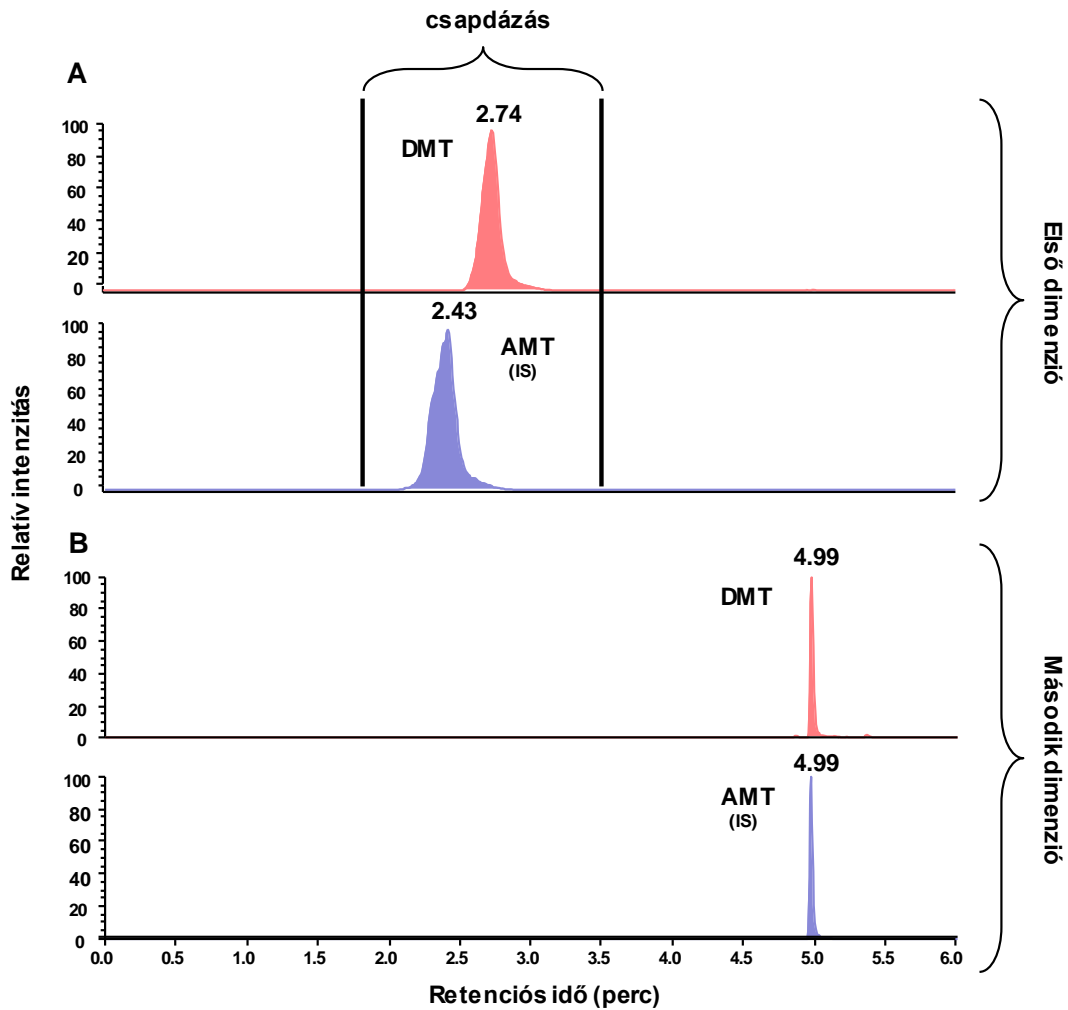
31. ábra A hígító pumpa áramlási sebességének hatása a csapdázási hatékonyságra, ahol az eluens 1–3 ml/perc áramlási sebességnél 0.1% FA és 3 ml/perc áramlási sebességnél a pH 10,2. Az egymást követő kísérletek során kapott csúcsterületek százalékos növekedésének értékei az oszlopokon feltüntetve.

A módszerfejlesztés utolsó lépésében összehangoltuk az első dimenziós és második dimenziós elválasztások valamint a csapdaoszlopon történő dúsítás kromatográfiai paramétereit. A végleges 2D-UHPLC-HRMS/MS rendszer kapcsolási rajza (**20. ábra**), kromatográfiai paramétereit (**F5. táblázat**) és működési elve a 4.5.3. fejezetben található.

A **DMT** és az **AMT** standardok 1D-LC-HRMS/MS és 2D-UHPLC-HRMS/MS mérése során kapott extrahált ionkromatogramjait a **32. ábra** szemlélteti. Az ábrán jól látható, hogy a második dimenzióban keskeny, szimmetrikus csúcsokat kaptunk és a **DMT** és **AMT** egy időben, megfelelő visszatartással eluálódtak. A vizsgált **DMT** és az alkalmazott belső standard **AMT** azonos retenciós idővel történő eluálása megbízhatóbb mennyiségi eredményeket biztosít, hiszen az ESI során egységes mátrixhatás lép fel. A 2D-UHPLC-HRMS/MS módszerünk retenciós idejének ismételtetését megvizsgálva a **DMT** és az **AMT** retenciós ideje 4,98–5,00 perc tartományban változott, ezek alapján elmondható, hogy az elválasztáshoz és dúsításhoz alkalmazott oszlopok megfelelően egyensúlyozódnak, ezáltal módszerünk reprodukálható.

Az eddig ismert irodalmi adatok alapján elmondható, hogy az általunk kidolgozott 10 perces teljes futási idő gyorsabb, mint az irodalomban megtalálható

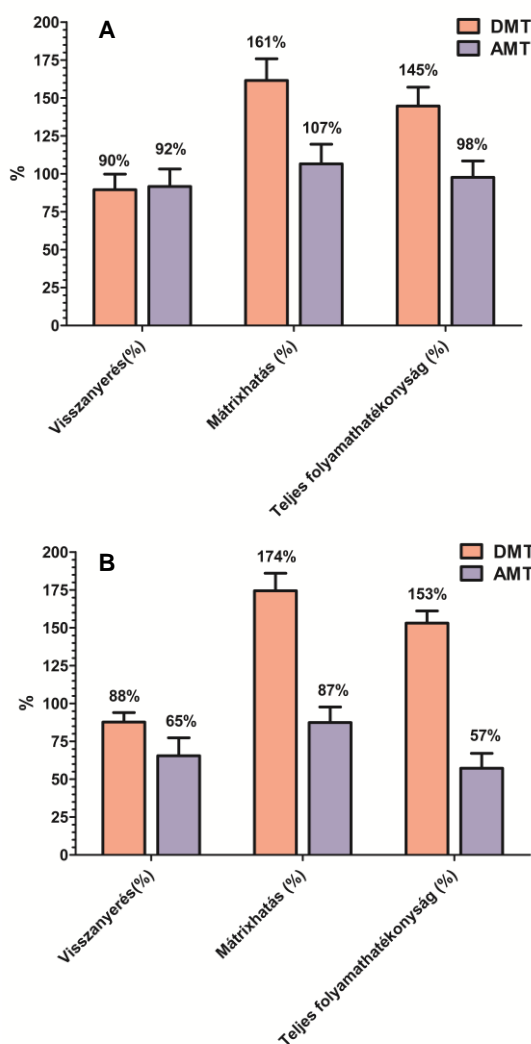
egydimenziós LC–MS/MS módszerek, amelyek a **DMT** mennyiségét vizsgálták agyban és plazmában [58–61].



32. ábra A **DMT** és **AMT** standardok célionjainak kromatogramjai (A) az első dimenziós **HILIC-HRMS/MS** módszerrel és (B) a **2D-UHPLC-HRMS/MS** módszerrel.

A módszerfejlesztésünk további kihívása volt hatékony mintaelőkészítési módszerek kidolgozása, amelyek alkalmasak patkányagy- és vérplazma mintákból a **DMT** dúsítására. Az irodalomban számos mintaelőkészítési módszert írtak már le a **DMT**-vel kapcsolatban [56,58–61,126,127], azonban sok esetben hiányoztak a mintaelőkészítés hatékonyságát jelző fő paraméterek, mint a visszanyerés, mátrixhatás és a teljes folyamathatékonyság. A **DMT** dúsítására emlős szövetekből gyakran szilárd fázisú extrakciós eljárásokat alkalmaznak [56,58,59], azonban ezek a módszerek drágák, munka- és időigényesek. A **2D-LC** technika alkalmazásával a negatív mátrixhatás csökkenthető, ezért lehetőségünk nyílt egyszerűbb mintaelőkészítési eljárás kidolgozására folyadék-folyadék extrakció alkalmazásával. A korábban már említett

disszociációs viszonyok miatt a vérplazma- és agyminták oldatainak pH-ját eltoltuk bázikus tartományba, így segítve a **DMT** dúsulását az etil-acetátos szerves fázisban. Az általunk kidolgozott új extrakciós módszer hatékonyságát leíró főbb paramétereket a **33. ábra** mutatja be. A visszanyerés, mátrixhatás és teljes folyamathatékonyság értékeket az 4.4.1 fejezetben megtalálható képletek (**2–4. képlet**) alapján számoltuk ki. A célzott 2D rendszerek esetén a negatív mátrixhatás csökkentésének egyik lehetősége, hogy a vizsgált vegyületek első dimenziós elválasztása során a frakciógyűjtés a lehető legkisebb időablakban történjen meg, így csökkentve az egyéb detektálás során zavaró komponensek csapódásának lehetőségét. A végleges analitikai módszerünk esetében a **DMT** és **AMT** első dimenziós eluátumból való csapódása 1,8–3,49 perc közötti tartományban történt.



33. ábra DMT és AMT visszanyerés, mátrixhatás és teljes folyamathatékonyságának eredményei (A) plazmában és (B) agban.

Az általunk kidolgozott új mintaelőkészítési módszer visszanyerésének hatékonysága vérplazma vizsgálatoknál a **DMT**-re nézve 20–30%-kal jobbnak bizonyult, mint az eddigi irodalmi adatok [60,61]. Agyminták esetében a belső standardra mérsékelt ionelnyomó hatás lépett fel, de összességében elmondható, hogy mindkét vegyület esetén a komplex biológiai mátrixokból kapott kedvező mátrixhatás értékek (161% plazmában és 174% agyban) egyértelműen jelzik az új 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer előnyét. A teljes folyamathatékonyságra kapott kedvező értékek (145% plazmában és 153% agyban) további megerősítést adtak az új analitikai módszer hatékonyságáról.

A biológiai minták mérése előtt, a kidolgozott teljes analitikai módszert validáltuk a 4.4.3 fejezetben felsorolt paraméterek szerint, melynek eredményeit a **7. táblázat** foglalja össze.

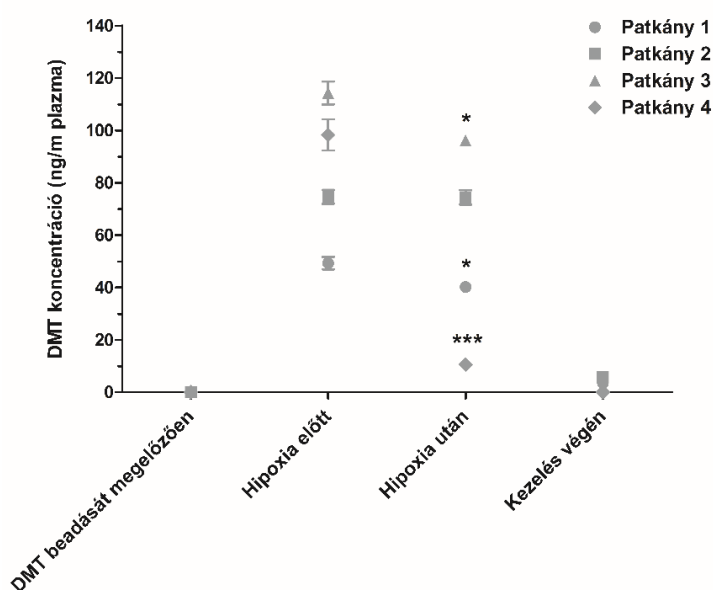
A biológiai kísérletek során 4 időpontban történt vérvétel, ezért a módszer fejlesztése során további céljaink között szerepelt a méréshez szükséges vérplazma mennyiségének minimalizálása, ezzel mérsékelve a vérvétel kedvezőtlen hatását a műtéti beavatkozások során [128]. A 0,108 ng/ml-es kimutatási határt 50 µl vérplazma feldolgozásával értünk el, összevetve a korábbi tanulmányokkal, ahol az ehhez közeli értéket csak nagyobb mennyiségű (200, 500, 1000 µl) vérplazmával sikerült elérni [59–61]. Agyminták esetén szintén kedvezőbb LOD értéket kaptunk, mint *Barker és munkatársai* [58].

7. táblázat Az új 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer főbb validálási paraméterei. CV%: százalékos variációs koefficiens.

	Vérplazma	Agy
LOD	0,108 ng/ml	0,212 ng/g
LOQ	0,328 ng/ml	0,642 ng/g
Torzítatlanság „Low” (%)	111,7	111,6
Torzítatlanság „Mid” (%)	89,6	88,5
Torzítatlanság „High” (%)	102,6	100,9
Pontosság „Low” (CV%)	2,8	2,7
Pontosság „Mid” (CV%)	1,4	5,1
Pontosság „High” (CV%)	1,4	1,3
Keresztszennyezés (%)	0,056	0,078
Stabilitás (%)	-0,452	-0,500

Az új 2D-UHPLC-HRMS/MS módszerünk alkalmazásának egyik célja volt, a **DMT** szint változásának követése iszkémia előtt, alatt, hipoxia után és a reperfúzió végén, valamint az agyszövet **DMT** tartalmának meghatározása a kísérlet végén. További céljaink között szerepelt az endogén **DMT** jelenlétének igazolása vérplazmában és agyban.

Az irodalomban számos tanulmány foglalkozik az exogén **DMT** biológiai mintákból történő meghatározásával, azonban jelenlegi tudomásunk szerint csak egy közlemény igazolta az endogén **DMT** jelenlétét patkányagyban és vérplazmában egy izokratikus LC-MS/MS analitikai módszerrel [56]. Fontos megjegyezni, hogy az általunk kidolgozott új 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer megbízhatóbb adatokkal szolgál, mivel a kétdimenziós kromatográfiás elválasztást egy nagy tömegpontosságú és nagyfelbontású tömegspektrometriás detektálás követte. Ilyen paraméterek például a retenciós idő (4,99 perc), két karakterisztikus ionátmenet (célion esetén 58,0651 m/z , kísérőion esetén 144,0808 m/z), nagy tömegpontosság, valamint a célion és kísérőion csúcsterületeinek aránya ($2,1 \pm 0,21$). Annak ellenére, hogy a céliont sikerült kimutatnunk, a fent említett további paraméterek mindegyike nem teljesült, ezért az endogén **DMT** koncentrációját kimutatási határ alattinak tekintettük, így nem tudtuk igazolni az endogén **DMT** jelenlétét patkány agyban és plazmában. Az exogén **DMT** koncentrációjának meghatározásához külső kalibrációs módszert alkalmaztunk. A kapott kalibrációs görbék megfelelő determinációs együtthatóval rendelkeztek ($r^2 \geq 0,99$).



34. ábra A **DMT** koncentrációjának változása a kísérlet során a vérplazmában. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

A kidolgozott módszert ezután sikeresen alkalmaztuk kezelt patkányok vérplazma **DMT** koncentrációjának nyomon követésére, melyet a **34. ábra** szemléltet. A kísérlet kezdetén, a **DMT** beadását megelőzően vérplazma mintákban a **DMT** mennyisége a kimutatási határ alá esett. A legmagasabb 49,3–114,3 ng/ml koncentrációt az összes állat esetén a hipoxia előtt figyeltük meg. Az 1, 3 és 4-es patkány esetében a **DMT** koncentrációja szignifikáns csökkenést mutatott hipoxia után. Az oxigénhiány után, a kezelés végéig a **DMT** koncentrációja átlagosan 3,8 ng/ml-re csökkent.

A másik fontos kérdés volt, hogy az agyban a **DMT** szint hogyan változik oxigénhiányos körülmények között kezeletlen és **DMT**-vel kezelt állatok esetében. Ehhez kontroll és kezelt állatok agyszöveteit vizsgáltuk. A vérplazma mintákhoz hasonlóan a kísérletet követően az endogén **DMT** nem volt kimutatható a mintákban így nem tudtuk igazolni, a hipoxia által kiváltott endogén **DMT** szint növekedést. A kezelés hatására a **DMT** koncentrációja megemelkedett (2–6,1 ng/g agy). Azonban a **DMT** valós koncentrációja ennél magasabb lehet, mivel a **DMT** gyorsan bomlik a mintagyűjtés során [128], amely különösen igaz az agyminták esetén.

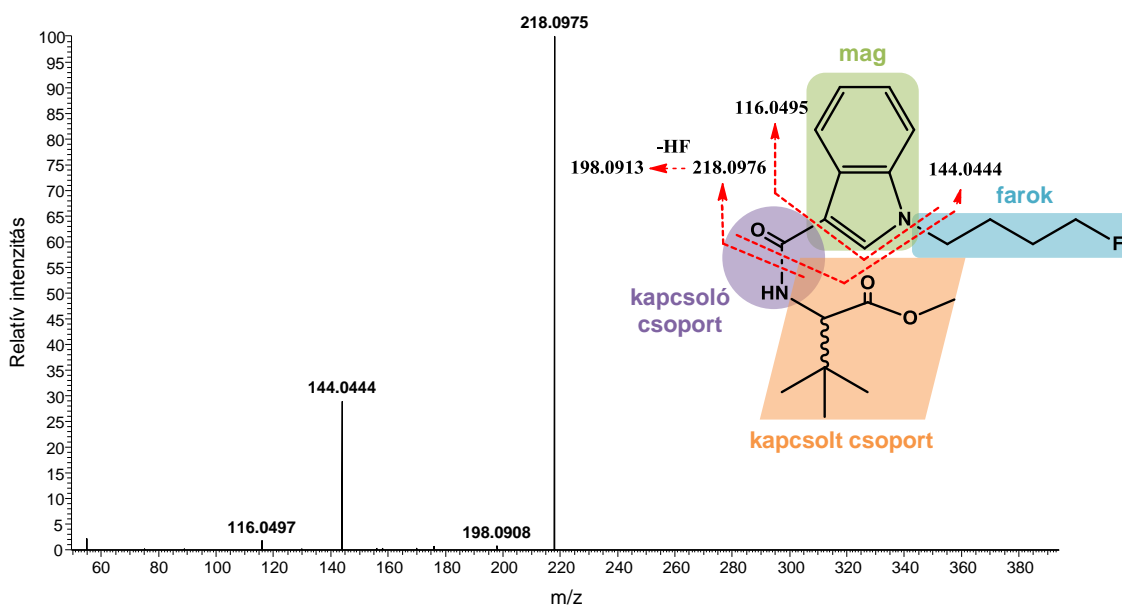
Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk kidolgozott és validált **2D-UHPLC-HRMS/MS** módszer alkalmas a kísérleti állatoknak terápiás céllal beadott **DMT** mérésére patkány agyból és vérplazmából.

5.4. 4F-MDMB-BICA és metabolitjainak vizsgálata

Napjainkban a szintetikus kannabinoidok fogyasztása komoly társadalmi probléma, kiemelt tekintettel a fiatal korosztály érintettségére. Az igazságügyi gyakorlatban a használatuk igazolása vizelet és vérmintából történik, azonban a gyors metabolizmusuknak (például 5F-MDMB-PICA felezési ideje 2,68 óra, 5F-MDMB-PINACA felezési ideje 2,50 óra [70]) köszönhetően az anyamolekula kimutatása a fogyasztásukat követően igen szűk időablakra korlátozódik, azonban a képződő metabolitok mérésével ez jelentősen kitolható. Munkánk célja volt az európai drogpiacon 2020-ban megjelent **4F-MDMB-BICA** új pszichoaktív szer I. fázisú metabolitjainak azonosítása *in vitro* humán májmikroszóma és *in vivo* humán vér- és vizeletmintából LC-HRMS és LC-HRMS/MS analitikai módszerekkel. Továbbá kidolgoztunk, validáltunk és alkalmaztunk egy gyors célzott LC-MS/MS analitikai

módszert **4F-MDMB-BICA** anyamolekula mennyiségi meghatározására humán vizelet és vérmintákból.

A munkánk során elsőként megvizsgáltuk a **4F-MDMB-BICA** fragmentációs mintázatát és optimalizáltuk a főbb fragmensionok képződéséhez szükséges ütközési energiákat. Az egyszeresen töltött protonált anyamolekula $[M+H]^+$, melynek mért tömege $363,2085\ m/z$ (elméleti tömeg: $363,2078\ Da$), két fő fragmens iont adott. Céliként $218,0975\ m/z$ (elméleti tömeg: $218,0976\ Da$) fragmens iont, míg kísérő ionként a $144,0444\ m/z$ (elméleti tömeg: $144,0444\ Da$) fragmens iont választottuk ki. A céliként a metil-dimetil-butanoát molekularész elvesztésével képződött az amid kötés hasításának következtében. A 4-fluor-butil farok csoport vesztésével, az indol mag adja a kísérő iont. A **35. ábra** mutatja a **4F-MDMB-BICA** feltételezett fragmentációját a HRMS/MS spektrum alapján.

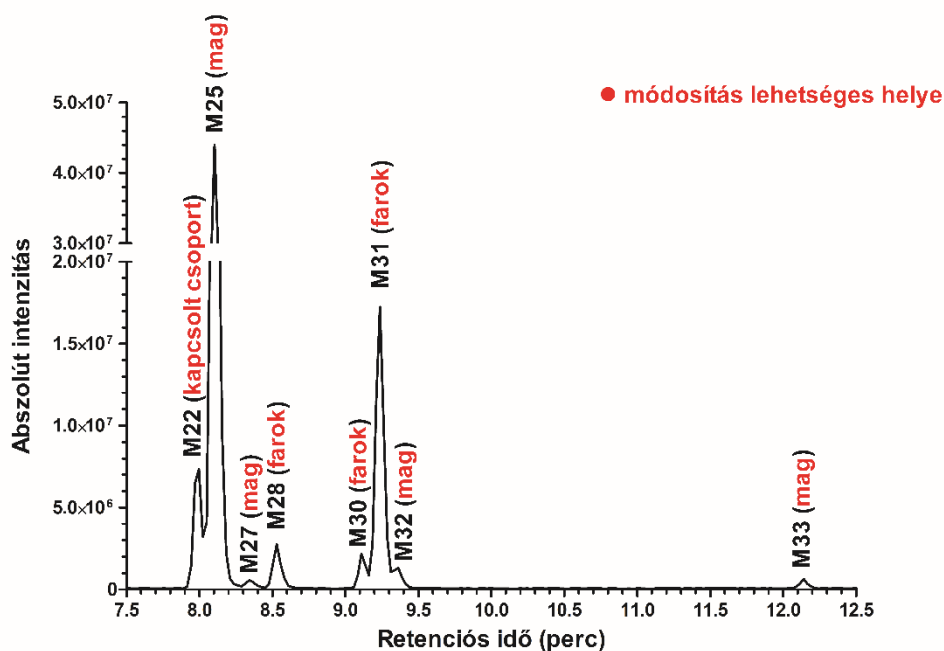


35. ábra A **4F-MDMB-BICA** szerkezete, a 4 fő szerkezeti egységgel (mag, farok, kapcsoló és kapcsolt csoport) valamint a lehetséges fragmentáció az elméleti tömegekkel és a HRMS/MS spektrum a mért tömegekkel.

A **4F-MDMB-BICA** *in vitro* és *in vivo* metabolitjainak azonosítására átfogó LC-HRMS és félig célzott LC-HRMS/MS módszereket dolgoztunk ki. A metabolitok, különös tekintettel az izomerek elválasztásához egy 150 mm hosszú, héjszerkezetű C30 állófázist használtunk. A mérések során A eluensnek 0,1% hangyasav vizes oldatát, B eluensnek pedig 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitrilt választottunk oldószer és áramlási sebesség gradiens program mellett. A **4F-MDMB-BICA** retenciós ideje az

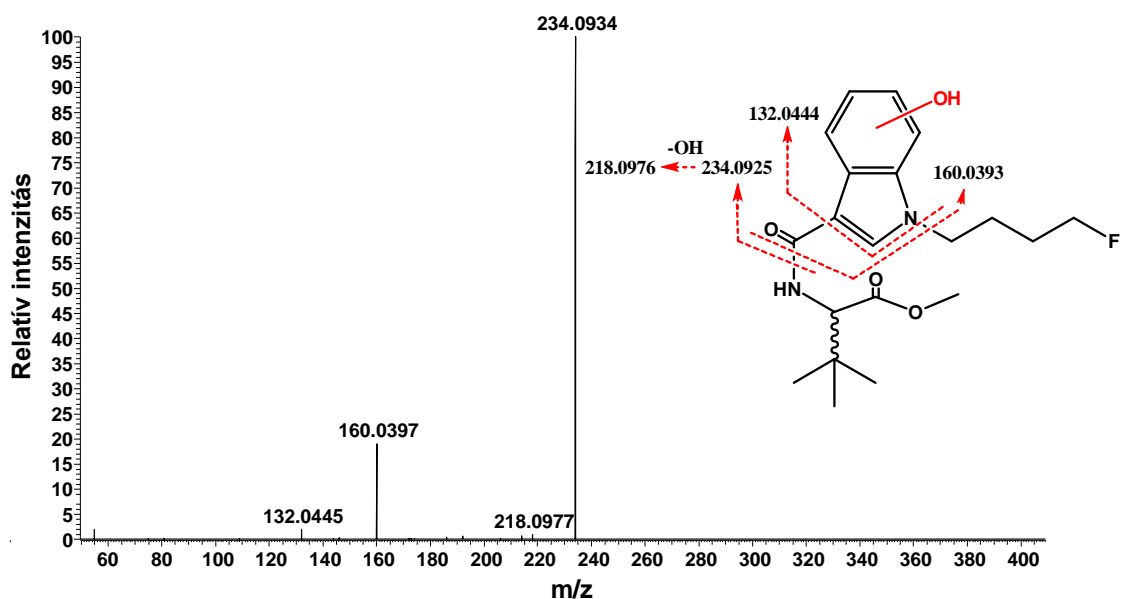
LC-HRMS és LC-HRMS/MS mérések során 11,54 perc volt, a képződő I. fázisú metabolitok a vártak megfelelően kisebb visszatartással rendelkeztek (t_R : 3,75–9,36 perc között, kivéve az **M33** t_R : 12,11 perc), mint az anyamolekula. A **4F-MDMB-BICA** 30 perces *in vitro* humán májmikroszómás inkubálását követően a feltételezett metabolitok azonosításához elsőként a kezelt és kontroll minták átfogó LC-HRMS analitikai mérését végeztük el. A kapott HRMS nyers fájlokat a Progenesis QI program segítségével dolgoztuk fel, majd statisztikailag összevetettük a kontroll és a kezelt mintákat. A kezelés során képződő új kromatográfiai csúcsokhoz rendelt m/z ionokból csúcslistát készítettünk. Az így kapott komponensek szerkezetének meghatározásához a félig célzott LC-HRMS/MS módszert alkalmaztuk. A lehetséges szerkezeteket úgy határoztuk meg, hogy a HRMS/MS spektrumokat manuálisan összehasonlítottuk a lehetséges fragmentációs mintázatokkal, amely az anyamolekula fragmentációján, valamint az irodalomban már leírt, hasonló magot, kapcsoló és kapcsolt csoportot tartalmazó szintetikus kannabinoidok fragmentációs mechanizmusán alapult [105–108]. Az anyamolekulát és az azonosított metabolitokat rangsoroltuk a PRM mérések során úgy, hogy az adott komponens csúcsterületét és a belső standardként használt **AB-FUBINACA-D4** csúcsterületének arányát vizsgáltuk. A legmagasabban rangsorolt vegyület a legnagyobb csúcsterület arányú vegyületet adta. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kapott rangsor informatív és nem tükrözi a pontos mennyiségi sorrendet, mivel a kísérleteink során nem állt rendelkezésünkre metabolit standard, amely elengedhetetlen a pontos mennyiségi meghatározáshoz.

A C30 oszlop alkalmazása lehetővé tette az adott biológiai transzformáció izomerjeinek hatékony elválasztását, amit jól szemléltet a mono-hidroxilezett izomerek bemutatott extrahált ionkromatogramja (**36. ábra**). A fragmentációs mintázat alapján az *in vitro* kezelt mintákban 30 metabolitot sikerült azonosítanunk.



36. ábra A mono-hidroxilezett izomerek LC-HRMS/MS ionkromatogramja humán májmikroszómával kezelt mintából, a módosítás lehetséges helyével.

A májmikroszómás kísérletekkel **4F-MDMB-BICA** számos biotranszformációját sikerült azonosítani úgy, mint az észter hidrolízis, dealkilezés, oxidatív defluorozás, dehidrogénezés, egyszeres és kétszeres hidroxilezés, amidhidrolízis, karboxilezés és ezek kombinációja, amelyeket a *Függelékben* található **F6. táblázatban** részleteztem. Az *N*-dealkilezett (**M18**) és a mono-hidroxilezett (**M25**) metabolit rendelkezett az *in vitro* kísérletekben a legnagyobb csúcsterület aránnyal, így ők szerepelnek a rangsor elején. Az **M25** metabolit HRMS/MS spektrumának (**37. ábra**) elemzéséből látható, hogy a módosítás lehetséges helye az indol magon van. Az egy metilén csoportban különböző 5F-MDMB-PICA humán májsejt inkubációja során *Swortwood és munkatársai* a fő metabolit terméknek az észter hidrolizált+oxidatív defluorozott formát találták [106]. Ez azért érdekes, mert ezt a típusú módosítást humán májmikroszómás kezelés során nem sikerült azonosítanunk. Azonban az észter-hidrolizált+dehidrogénezett (**M26**) metabolitot sikerült azonosítani májmikroszómában, mind az LC-HRMS, mind az LC-HRMS/MS mérésekkel, amely csupán 0,02 Da tömegegységgel tér el az észter hidrolizált+oxidatív defluorozott (**M09**) metabolittól.



37. ábra M25 egyszeresen hidroxilezett metabolit feltételezett szerkezete, a módosítás feltételezett helyének feltüntetésével, fragmentációs mintázata és HRMS/MS spektruma.

A 4F-MDMB-BICA feltételezett *in vivo* metabolitjainak meghatározásához az anyamolekulára és a fő metabolitra (M29) előzetesen szűrt öt pozitív humán vizeletmintát vizsgáltunk a kidolgozott félig célzott LC-HRMS/MS módszerrel az *in vivo* metabolitok azonosításának céljából. Összesen 20 *in vivo* metabolitot sikerült azonosítani a vizelet mintákból, amelyek közül három új metabolit volt úgy, mint az észter hidrolizált+oxidatív defluorozott (M09), az észter hidrolizált+egyszeresen hidroxilezett (M13,) valamint a butánsav (M21) metabolitok. A kétszeresen hidroxilezett metabolitok közül az M05, M10, M14, M15, M17 és M23, az *N*-dealkilált+egyszeresen hidroxilezett metabolitok közül az M20, valamint a mono-hidroxilezett metabolitok közül az M27, M28, M30, M31 és M33 nem volt jelen a vizeletmintákban. További érdekesség, hogy az egyszeresen hidroxilezett metabolitok közül, *in vivo* mintákban nem azonosítottuk azokat a metabolitokat (M28, M30, M31), amelyeknél a módosítás a molekula farki részét érintette. A csúcsterületek arányának rangsorolása során a vizeletben a fő metabolitnak az MDMB-4en-PINACA, 5F-MDMB-PICA, 5F-AMB, 4F-MDMB-BINCA és AMB-FUBINCA szintetikus kannabinoidokhoz hasonlóan az észter hidrolizált metabolit (M29) bizonyult [105–108,129–131]. Az eredményekből látható, hogy a vizeletben azonosított M29 fő metabolit a májmikroszómában az ötödik volt, míg ha összehasonlítjuk az 5F-MDMB-PICA májsejtes eredményeivel, ott szintén az észter hidrolízis metabolitja képződött a

legnagyobb mennyiségben [106]. Érdekes módon, az 5F-MDMB-PICA egyszeresen hidroxilezett metabolitja a májsejtes kezelést követően kis mennyiségben képződött [106,129]. A **4F-MDMB-BICA** indol magon történt mono-hidroxilezés módosítása (**M25**) a májmikroszómában az első, a vizeletben második helyen szerepelt.

A vizelet minták esetében a **4F-MDMB-BICA** fogyasztásának mennyiségéről, a fogyasztás és a mintavétel között eltelt időről sajnos nem állt rendelkezésünkre információ, ezért nehéz megbízható magyarázatot adni az egyes mintákban azonosított metabolitok számának nagy eltérésére. Amíg a 2. vizeletből 19 metabolitot mutattuk ki, addig a 3. vizeletmintában csak kettő metabolitot azonosítottunk. Az 1, 3, 4, 5 vizeletminták mérési eredményei jól szemléltetik a metabolitok mérésének fontosságát a fogyasztás tényének igazolása során, hiszen az anyamolekulát ezekben az esetben nem sikerült azonosítani.

A **4F-MDMB-BICA** további *in vivo* metabolitokjainak azonosítására két előzetesen szűrt pozitív vérmintát is megvizsgáltunk. Az 1. vizelet és az 1. vér, míg a 2. vizelet a 2. vér két személytől származott. A vérminták félig célzott LC-HRMS/MS mérése nem eredményezett új metabolitokat. A két vérmintában összesen 13 metabolitot azonosítottunk. A vizelethez hasonlóan a vérminták esetén is a 2. vérből mutattuk ki a legtöbb metabolitot (11 db), míg az 1. vérmintában csak az észter hidrolizált (**M29**), valamint az észter hidrolízis+dehidrogénezett (**M26**) metabolitokat azonosítottuk fő metabolikus termékként.

Fontos megjegyezni, hogy a rangsorban második *N*-dealkilezett metabolit (**M18**) nem választható karakterisztikus anyagcsere termékként, mivel az 5F-MDMB-PICA-val közös metabolit [105,106]. Az **M26** metabolitot mindkét vérmintában azonosítottuk, így ezt választottuk további karakterisztikus metabolitként az **4F-MDMB-BICA** fogyasztásának bizonyítására vérmintában. Ellentétben a vizeletmintákkal az anyamolekulát mindkét esetben sikerült azonosítani.

Az LC-HRMS/MS mérések során kapott eredményeket átültettük az igazságügyi gyakorlatban használt célzott LC-MS/MS rutin analitikai módszerünkbe a **4F-MDMB-BICA** szintetikus kannabinoid mennyiségi meghatározására és a kiválasztott karakterisztikus metabolitok kimutatására vizelet (**M29**, **M25**) és vérmintából (**M29**, **M26**). A rutin kromatográfiás elválasztásunk egy 100 mm hosszú, héjszerkezetű C18 állófázison történik, melyhez egy gyors gradiens elúció társul, 6 perces analízis idővel, amely az izomerek kevésbé hatékony elválasztásához vezet. Így a továbbiakban az izomerek neve helyett az adott biotranszformációkat tüntetem csak fel (**8**, **9. táblázat**).

A 6 perces analízis során 32 vizsgált szintetikus kannabinoid (anyamolekula és metabolitok) ionátmeneteit (célion, kísérőion) kibővítettük a **4F-MDMB-BICA** anyamolekula és a három kiválasztott metabolit átmeneteivel. A főbb LC-MS/MS paramétereket a **8. táblázatban** foglaltam össze.

8. táblázat A fő LC-MS/MS paraméterek, ahol a CE az ütközési energia.

Komponens	Retenciós idő (min)	Anyamolekula (m/z)	Célion (m/z)	CE (eV)	Kísérő ion (m/z)	CE (eV)
AB-FUBINACA-D4	2,19	373,2	257,1	25	-	-
Észter hidrolízis	2,33	349,2	218,1	20	144	35
Mono-hidroxilezés	2,04	379,2	234,1	20	144	35
Észter hidrolízis + dehidrogénezés	2,14	347,2	218,1	20	144	35
4F-MDMB-BICA	3,69	363,2	218,1	19	144	38

A célzott LC-MS/MS módszert a **4F-MDMB-BICA** mennyiségének humán vizeletben és vérben történő meghatározására validáltuk, mely során meghatároztuk a kimutatási határt, a mennyiségi meghatározás határt, a linearitást, a pontosságot, a torzítatlanságot, a visszanyerést, a mátrixhatást és a teljes folyamathatékonyt. A továbbiakban csak a fontosabb eredményeket szeretném ismertetni. Vizeletben 0,003 ng/ml, vérben 0,004 ng/ml LOD, valamint vizeletben 0,010 ng/ml, vérben 0,011 ng/ml LOQ értékeket kaptunk. A **4F-MDMB-BICA** visszanyerését alacsony, közepes és magas koncentrációban is vizsgáltuk. Vizeletben 74 és 119% közötti értékeket kaptunk, míg vérben a visszanyerés 72 és 129% közötti tartományba esett. A kalibrációs görbék az adott koncentrációs tartományban lineárisak voltak (vizelet: 0,02–5 ng/ml, vér: 0,04–10 ng/ml). A kapott validációs eredmények alapján elmondható, hogy a célzott LC-MS/MS módszer és a hozzá kapcsolódó mintaelőkészítési eljárások alkalmasak a **4F-MDMB-BICA** anyamolekula mennyiségi meghatározására vizelet- és vérmintákból.

A célzott módszerrel meghatároztuk az egyes mintákban a **4F-MDMB-BICA** koncentrációját. Amíg az öt vizsgált vizeletmintából csak a 2. vizeletben (0,970 ng/ml) volt mennyiségileg meghatározható az anyamolekula, addig a két vérminta esetében

0,920 ng/ml és >10 ng/ml koncentráció értékeket kaptunk (**9. táblázat**). Az elsődleges és a másodlagos karakterisztikus metabolitok tekintetében a vizelet- és vérminták eredményeit a **9. táblázat** tartalmazza.

9. táblázat Humán vizelet és vérminták LC-MS/MS eredményei, ahol + a detektált, × a nem detektált komponens.

Komponens	1	2.	3	4	5	1	2
	Vizelet	Vizelet	Vizelet	Vizelet	Vizelet	Vér	Vér
Észter hidrolízis	+	+	+	+	+	+	+
Mono-hidroxilezés	+	+	+	+	+	×	+
Észter hidrolízis + dehidrogénezés	+	+	×	×	×	+	+
4F-MDMB-BICA	×	0,970 ng/ml	×	×	×	0,920 ng/ml	> 10 ng/ml

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az alkalmazott analitikai módszerünkkel sikerült leírni a **4F-MDMB-BICA** I. fázisú metabolitjait humán májmikroszómából, vizeletből és vérmintából. Munkánk során egy új megközelítést alkalmaztunk a metabolitok azonosítására, mely egy átfogó LC-HRMS, félig célzott LC-HRMS/MS és célzott LC-MS/MS analitikai módszerekből állt. Összesen 33 metabolitot sikerült azonosítanunk *in vitro* májmikroszómás kezelést követően, valamint *in vivo* vér- és vizeletmintákból. A **4F-MDMB-BICA** 4 fő szerkezeti részén, a magon, a farkon, a kapcsoló és kapcsolt csoportokon számos biotranszformációt azonosítottunk, melyek közül az észter hidrolízis metabolikus terméket választottuk ki karakterisztikus metabolitnak a célzott rutin analitikai méréséhez.

6. Összefoglalás

Doktori munkám célja volt egy- és kétdimenziós folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás bioanalitikai módszerek kifejlesztése, melyeket lipidomikai és metabolomikai vonatkozásban lehet alkalmazni. Az analitikai módszerek kidolgozása magába foglalta a mintaelőkészítést, folyadékkromatográfiás elválasztást, tömegspektrometriás detektálást és az adatfeldolgozás paramétereinek vizsgálatát és optimalizálását. A dolgozatomban bemutatott új bioanalitikai módszereket sikeresen alkalmaztuk a felmerülő orvos-biológiai kérdések megválaszolására.

A kidolgozott, új **HILIC-HRMS** analitikai módszerünket a szorongásos megbetegedéssel egér modelljében, a vérplazma glicerofoszfátid és szfingofosfolipid molekula specieszek azonosítására, mennyiségi meghatározására, valamint a betegség jellegének vizsgálatára alkalmaztuk. Összesen 10 foszfolipid osztályhoz tartozó 130 foszfolipidet sikerült mennyiségileg meghatározni egér vérplazmából. A szorongó és nem szorongó egerek vérplazma foszfolipid összetételének összehasonlításakor a foszfatidil-kolin (PC), foszfatidil-inozitol (PI), lizofoszfatidil-etanolamin (PE) és szfingomielin (SM) osztályok koncentrációjában tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A statisztikai kiértékelést követően 35 glicerofoszfátid és szfingofosfolipid esetében találtunk szignifikáns különbséget, és ezek közül 33 speciesznel magasabb koncentráció volt megfigyelhető a szorongó egéértörzshöz tartozó egyedéknél. A legnagyobb mennyiségi eltérést a két egéértörzs összehasonlításakor a **PI 32:1**, **PI 36:5**, **LPE 16:1** és **LPE 20:5** komponenseknél figyeltük meg.

A sejtmembránt alkotó lipidek alapvető szerepet játszanak a különféle receptorok lokalizációjában és működésében, ezért az agyi lipidösszetételben bekövetkező változás hozzájárulhat a súlyos depressziós és szorongásos kórképhez. Az általunk kidolgozott új **online átfogó 2D-UHPLC-HRMS** módszer alkalmazásával a vizsgált egérmodellek három agyterületének, a prefrontális kéreg (PFC), a dorzális hippokampusz (DHPC) és a ventrális hippokampusz (VHPC) foszfolipid összetételét kívántuk meghatározni. A 40 perces mérés során 151 glicerofoszfátidot és szfingomielin-t azonosítottunk a vizsgált agyterületekben. A szorongó és nem szorongó egerek agyi foszfolipid összetételének összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a VHPC és PFC agyrégiókban 4 foszfolipid osztály esetén szignifikáns különbség van. Legjobb tudomásunk szerint elsőként írtuk le a különböző agyi régiók foszfolipid

összetételét és mennyiségi változásait a szorongásos betegségek eger modelljében. A statisztikai adatelemzés során megállapítottuk, hogy 37 lipid speciesz összetételében volt szignifikáns különbség a két egércsoport három agyterületének összehasonlításakor. Ezek közül 20-at azonosítottunk a VHPC-ban, 6-ot a DHPC-ban és 11-et a PFC-ben. Fontos megemlíteni, hogy a VHPC régiók foszfolipid összetételének vizsgálatakor a PE, PC, PI és foszfatidil-glicerín (PG) osztályokból származó 20 szignifikánsan különböző speciesz egységesen alacsonyabb koncentrációban volt jelen a szorongó egyedekben. Érdekességképpen, a 37 foszfolipid speciesz közül mindössze a **PE 40:5** mutatott szignifikáns különbséget mind a három vizsgált agyrégióban, azonban a változások eltérő irányúak voltak.

A szorongó és nem szorongó egértörzsek vérplazmájának és agyi foszfolipid összetételének vizsgálata során szignifikáns különbséget mutató foszfolipid specieszek összevetésekor mindössze 3 közös glicerofoszfatidot azonosítottunk a két szövettípusban azonban eltérő irányúak voltak, úgy mint a **PI 36:5**, **LPE 20:1** és **PC 34:2**. A kapott eredmények alapjául szolgálhatnak a szorongásos megbetegedéshez kapcsolódó gyógyszerfejlesztésekhez és/vagy a betegség korai előrejelzéséhez, hiszen az általunk tapasztalt változások további biomarker kutatások alapját képezhetik. Összességében elmondható, hogy a kidolgozott **HILIC-HRMS** és **online átfogó 2D-UHPLC-HRMS** analitikai módszereket sikeresen alkalmaztuk a vérplazma és az agy foszfolipid összetételének mennyiségi és minőségi analízisére a szorongó és nem szorongó egerek vizsgálatakor.

A dimetiltriptamin (**DMT**) oxigénhiányos (hipoxia) állapot esetében fellépő pontos fiziológiás hatása még nem tisztázott. Az erre irányuló biológiai kísérletekhez kapcsolódóan a doktori munkám során célul tűztük ki egy gyors célzott analitikai módszer kidolgozását, amellyel követni lehet a **DMT** mennyiségének változását hipoxiás állapotot előidéző patkány kísérletekben. Ehhez egy új, gyors **célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS** módszert dolgoztunk ki vérplazma- és agyminták mérésére. A módszerfejlesztés során alkalmazott új folyadék-folyadék extrakciós mintaelőkészítéssel kevesebb biológiai minta felhasználásával az irodalmi adatoknál jobb kimutatási határt sikerült elérni. A módszerfejlesztés során kapott kedvezőbb mátrixhatás értékek egyértelműen jelzik a mintaelőkészítés és a **2D-UHPLC-HRMS/MS** módszer további előnyeit. Fontos megjegyezni, hogy mindezt a szakirodalomban megtalálható egydimenziós analitikai módszerekhez képest, rövidebb, mindössze 10 perces teljes analízis idővel sikerült elérni.

A hipoxiát előidéző patkánykísérletekhez gyűjtött agy és idősoros vérplazma minták **DMT** koncentrációjának meghatározásakor megállapítottuk, hogy a **DMT** kezelés hatására az oxigénhiányos állapot fellépése után az **DMT** koncentrációja a vérplazmában csökkent, és a kezelés hatására a **DMT** mennyisége megnőtt az agyban. További eredményként elmondható, hogy az új analitikai módszerünkkel a **DMT**-re kapott alacsony kimutatási határ ellenére a kísérletek során nem tudtuk megerősíteni az endogén **DMT** jelenlétét és annak emelkedését sem az agyban sem a vérplazmában. Az elért eredmények alapján elmondható, hogy az új **célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS** analitikai módszert sikeresen alkalmaztuk kísérleti állatok terápia céljára beadott **DMT** koncentrációjának meghatározására patkány vérplazmában és agyban. A doktori munkám részét nem képező további biológiai vizsgálatok bizonyították, hogy a kísérlet során intravénásan adagolt **DMT** kivédte az iszkémiás sejtkárosodást [132].

Napjainkban a szintetikus kannabinoidok fogyasztása különösen a fiatal korosztály érintettsége miatt komoly társadalmi probléma. A szintetikus kannabinoidok dinamikusan változó piaca kihívás elé állítja az igazságügyi dolgozókat, toxikológus szakértőket és analitikusokat egyaránt. Sajnos számos esetben a szerhasználatot beismerők vizelet és vérmintáiból nem sikerült az anyamolekulát kimutatnunk, melynek oka a szintetikus kannabinoidok gyors metabolizmusával magyarázható. Ebből kifolyólag az anyamolekulák mellett a karakterisztikus metabolitok analízisével megbízhatóbbá válna a szintetikus kannabinoidok fogyasztásának igazolása. Ezért doktori munkám további részeként a 2020-ban megjelent, **4F-MDMB-BICA** új szintetikus kannabinoid I. fázisú reakciókban képződő metabolitjait azonosítottuk *in vitro* humán májmikroszóma, *in vivo* vizelet és vérmintákból. Kutatásunk során új analitikai megközelítést alkalmaztunk a metabolitok meghatározására, mely egy **átfogó LC-HRMS**, **félig célzott LC-HRMS/MS** és egy **célzott rutin LC-MS/MS** analitikai módszerekből épült fel. Az **átfogó LC-HRMS** mérések kiértékelése során kapott lehetséges metabolitok azonosítását egy **félig célzott LC-HRMS/MS** mérés követte. A lehetséges szerkezetek meghatározásához a HRMS/MS spektrumok kiértékelése az anyamolekula fragmentációján, valamint az irodalomban leírt hasonló szerkezetű szintetikus kannabinoidok fragmentációs mechanizmusán alapult.

In vitro humán májmikroszómás inkubációból, valamint *in vivo* vizeletből és vérből összesen 33 metabolitot sikerült azonosítani. A **4F-MDMB-BICA** négy fő szerkezeti részén, a magon, a farkon, a kapcsoló és kapcsolt csoporton számos biotranszformációt azonosítottunk, úgy mint észter hidrolízis, amidhidrolízis,

karboxilezés, *N*-dealkilezés, egyszeres és kétszeres hidroxilezés, oxidatív defluorozás, dehidrogénezés és ezek kombinációja. Az *in vivo* mérések eredményei alapján az észter hidrolízis, a mono-hidroxilezés és az észter hidrolízis+dehidrogénezés metabolikus termékeket választottuk ki karakterisztikus metabolitnak, mely vegyületeket a már meglévő **célzott LC-MS/MS** módszerünkhöz igazítottunk, sikeresen validáltunk és azóta is alkalmazunk a mindennapi rutin analitikai mérések során.

Kijelenthetjük, hogy a **4F-MDMB-BICA** fogyasztásának igazolását vizelet- és vérmintából elsőként a kutatócsoportunk írta le. Ezzel pedig nem csak a hazai, hanem a nemzetközi igazságügyi szervek munkáját is nagymértékben segítettük.

7. Summary

The main goal of my doctoral dissertation was to develop one- and two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometric bioanalytical methods that can be applied in metabolomics and lipidomics studies. The development of analytical methods included the study and optimization of sample preparation, liquid chromatographic separation, mass spectrometric detection and data processing parameters. The new bioanalytical methods presented in my dissertation have been successfully applied to answer the emerging biomedical questions.

With inbreeding the anxious and non-anxious mouse strains, it is possible to study anxiety disorder at the molecular level. In a mouse model of anxiety disease, we hypothesised that there could be a significant difference in the plasma phospholipid composition of anxious and non-anxious mice. In order to confirm the hypothesis, we developed a rapid comprehensive **HILIC-HRMS** method and used it for the quantification of 130 phospholipids covering 10 phospholipid classes in mouse plasma. Significant differences in the total concentrations of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI), lysophosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyelin (SM) classes were found in anxiety-related behaviour group. 33 lipid species were determined up-regulated in the anxiety mouse model, while down-regulation was found only in **PC 38:4** and **PC 42:6**. The highest observed fold changes were found compared with non-anxiety to anxiety groups **PI 32:1**, **PI 36:5**, **LPE 16:1**, and **LPE 20:5** between the two groups.

Thanks to the animal model of anxiety, we have been able to investigate the neural pathway that can be associated with anxiety. In this study, we determined the phospholipid composition of three brain areas of anxious and non-anxious mice (dorsal hippocampus, ventral hippocampus and prefrontal cortex) using a novel, **comprehensive online 2D-UHPLC-HRMS** coupled technique. The 2D-UHPLC separation was carried out by a combination of HILIC in the first dimension followed by second-dimensional RP chromatography. In the first dimension, lipid classes were distinguished by HILIC, while the second-dimensional separation of individual phospholipid and SM species was achieved by RP chromatography. For the enrichment of diluted HILIC eluent and for the RP separation of trapped lipid species, two RP trapping columns were used separately. The final method provided quantification of 151

phospholipid species in three brain regions, ventral hippocampus (VHPC), dorsal hippocampus (DHPC) and prefrontal cortex (PFC) within a 40-minute run time. With the established method, the differences of phospholipid composition in brain regions of 9 non-anxiety and 8 anxiety mice were compared. Our study revealed that 37 glycerophospholipid and sphingomyelin species had significantly altered concentration in the anxiety group: 20 were found in VHPC, 6 in DHPC and 11 in PFC. For PE 40:5, significant changes were observed in all three regions regularly. It is worth noting that significant unidirectional alteration of the concentration of phospholipid species was observed in the ventral hippocampus of the anxious group. In all brain regions examined, only **PE 40:5** showed a significant change.

When comparing phospholipid species with significant differences in the plasma and brain phospholipid composition of anxious and non-anxious mouse strains, only 3 common glycerophospholipids were identified in the two tissue types; namely **PI 36:5**, **LPE 20:1** and **PC 34:2**. While significantly different anxiety mice showed a decrease in plasma, there was a significant increase in the brain. Based on the results, it can be stated that the two analytical methods developed are suitable for the quantitative and qualitative analysis of plasma and brain phospholipid composition. Our results may provide a good basis for future drug developments, as the changes experienced may form the basis of biomarker research. Overall, the developed **rapid HILIC-HRMS** method and the **fully automated, online comprehensive 2D-UHPLC-HRMS** were successfully applied in profiling plasma and brain phospholipids and sphingomyelins in a mouse model of anxiety disorders.

In the other part of my doctoral research, my goal was to develop a rapid targeted method to follow the changes in the amount of **dimethyltryptamine (DMT)** in hypoxia experiments. The aim of the experiment was to demonstrate the neuroprotective effect of dimethyltryptamine by developing a **heart-cutting 2D-LC-HRMS/MS** method for measuring plasma and brain samples. With the new liquid-liquid extraction sample preparation procedure lower amounts of biological samples are needed for the measurements. The limit of detection was able to reduce compared to in the literature so far. For **DMT**, the obtained 90% of recovery of our new sample preparation procedure in plasma was better by approximately 20–30% than data in early studies. The obtained favourable matrix effect values for both compounds from a complex biological matrix clearly indicated the benefit of the application of this **2D-LC-HRMS/MS** method.

With the two-dimensional method, we also decreased the total analysis time to only 10 minutes which, to our knowledge, is shorter than those of one-dimensional methods described in the literature. Plasma measurements show that dimethyltryptamine concentrations decrease after hypoxia while increasing in the brain compared to the control group. In terms of results, our analytical approach is suitable for detecting the presence of dimethyltryptamine administered therapeutically to experimental animals. It is likely that **DMT** may have a neuroprotective role in hypoxic conditions. Additional biological experiments (not part of my doctoral dissertation) demonstrated that **DMT** administered intravenously during the experiment prevented ischemic cell damage.

Nowadays, the black market for designer drugs is changing dynamically. Consequently, to establish consumption, it is essential to identify and quantify newly released synthetic cannabinoids as quickly as possible. Due to their rapid metabolism, in many cases, despite the recognition of their consumption, the mother compound could not be identified in biological fluids. In our work, we aimed to identify the phase I metabolites of **4F-MDMB-BICA** synthetic cannabinoid released in Hungary in 2020. In our work, we used a new approach to identify metabolites consisting of an **untargeted LC-HRMS**, a **semi-targeted LC-HRMS/MS** and **targeted LC-MS/MS** analytical methods. The obtained HRMS data of control and treated pooled human liver microsome (pHLM) samples were statistically compared by the Progenesis QI software, and then the putative metabolites were manually filtered based on literature data. Molecular ions selected manually were further studied by **semi-targeted LC-HRMS/MS** measurement in order to obtain structural information of interests. The possible substructures or structures of unknown molecular ions were determined by manually comparing the related HRMS/MS spectra with their hypothetical fragmentation, which was based on fragmentation of the parent compound and literature data of other synthetic cannabinoids with similar core, linker and linked group.

A total of 33 metabolites were identified from *in vitro* pHLM incubation as well as *in vivo* urine and blood. The application of C30 column allowed us to separate the isomers of given metabolites, such as those of ester hydrolysis and mono-hydroxylation within 20 min of total run time. Several biotransformations were identified in the four major parts of **4F-MDMB-BICA**, the core, the tail, the linker and the linked group: ester hydrolysis, monohydroxylation and their combinations were selected as characteristic metabolites. The **LC-MS/MS** method was successfully validated. The

selected metabolites with parent compound **4F-MDMD-BICA** were adapted to our routine **targeted LC-MS/MS** method, which was validated and applied successfully in the analysis of authentic urine and blood samples.

To the best of our knowledge, this is the first attempt to describe and analyze the phase I metabolites of **4F-MDMD-BICA** to demonstrate its consumption from urine and blood samples. In doing so, we have greatly assisted the work of not only Hungarian but also international forensic organisations.

8. Hivatkozások

- [1] J.W. Robinson, E.M.S. Frame, G.M. Frame II (Eds), *Undergraduate Instrumental Analysis*, CRC Press, **2005**.
- [2] B.M. Ham, A. MaHam (Eds.), *Analytical chemistry: a chemist and laboratory technician's toolkit*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [3] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, A.R. Crouch (Eds.), *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Nelson Education, **2013**.
- [4] J. Fekete, R. Kormány, S. Fekete (Eds.), *Modern folyadékromatográfia*, KromKrom, **2017**.
- [5] M. Naushad, M.R. Khan (Eds), *Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry: evaluation and applications in food analysis*, CRC Press, **2014**.
- [6] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta*, 692 (**2011**) 1-25.
- [7] D.Q. Tang, L. Zou, X.X. Yin, C.N. Ong, *Mass Spectrom. Rev.* 35.5 (**2016**) 574-600.
- [8] D.R. Stoll, *Bioanalysis*, 2.1 (**2010**) 105-122.
- [9] D.R. Stoll, *Bioanalysis*, 7.24 (**2015**) 3125-3142.
- [10] P. Horvatovich, B. Hoekman, N. Govorukhina, R. Bischoff, *J. Sep. Sci.* 33 (**2010**) 1421-1437.
- [11] G. Guiochon, N. Marchetti, K. Mriziq, R.A. Shalliker, *J. Chromatogr. A.* 1189 (**2008**) 109-168.
- [12] P. Jandera, *Cent. Eur. J. Chem.* 10.3 (**2012**) 844-875.
- [13] P. Donato, F. Cacciola, P.Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello, *Mass Spectrom. Rev.* 31.5 (**2012**) 523-559.
- [14] B.W.J. Pirok, D.R. Stoll, P.J. Schoenmakers, *Anal. Chem.* 91 (**2019**) 240-263.
- [15] K. Horváth, J.N. Fairchild, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A.* 1216 (**2009**) 7785-7792.
- [16] H. Malerod, E. Lundanes, T. Greibrokk, *Anal. Methods.* 2.2 (**2010**) 110-122.
- [17] K.M. Kalili, A. De Villiers, *J. Chromatogr. A.* 1289 (**2013**) 58-68.
- [18] F. Bedani, W.T. Kok, H.G. Janssen, *J. Chromatogr. A.* 1133 (**2006**) 126-134.
- [19] P.L. Wood (Ed.), *Metabolomics*, Springer, **2021**
- [20] A.G. Woods, C.C. Darie (Eds.), *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*, Springer, **2014**.

- [21] S. Shrader (Ed.), *Introductory mass spectrometry*, CRC Press, **2013**.
- [22] D. Raftery (Ed.), *Mass Spectrometry in Metabolomics, Methods and Protocols*, Humana, **2014**.
- [23] T. Körmöczi, *Új szintetikus kannabinoidok meghatározása vizeletmintákból folyadékkromatográfiával kapcsolt elektro spray ionizációs tandem tömegspektrometriás módszerrel*, MA/MSc diplomamunka, Szegedi Tudományegyetem, **2017**.
- [24] S. Eliuk, A. Makarov, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 8 (**2015**) 61-80.
- [25] A. Kaufmann, M. Bromirsky, *Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application*, White Paper 65147, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Reference-Materials/wp-65147-ms-q-exactive-orbitrap-scan-modes-wp65147-en.pdf>, Letöltve: 2020.08.14.
- [26] A.C. Peterson, J.D. Russell, D.J. Bailey, M.S. Westphall, J.J. Coon, *Mol. Cell Proteomics*, 11.11 (**2012**) 1475-1488.
- [27] M.V. Schneider, S. Orchard, Omics technologies, data and bioinformatics principles. In *Bioinformatics for omics*, Humana Press, **2011**, 3-30.
- [28] K. Sandra, A. dos Santos Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, *J Chromatogr A*. 1217.25 (**2010**) 4087-4099.
- [29] C. Ferreri, C. Chatgililoglu (Eds.), *Membrane lipidomics for personalized health*, John Wiley and Sons, Incorporated, **2015**.
- [30] L. Nyitrai, G. Pál (Eds), *A biokémia és molekuláris biológia alapjai*, ELTE, e-könyv, **2013** Link: https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0073_biokemia_molekularis_biologia_alapjai/ch11s02html Letöltve: 2020.08.14
- [31] L. Romics, L. Szollár (Eds), *Lipidek, lipoproteinek és hyperlipoproteinaemák*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, **1977**.
- [32] C. Leray (Ed.), *Introduction to Lipidomics; From Bacteria to Man*, CRC Press, **2013**.
- [33] R.C. Murphy, *Tandem mass spectrometry of lipids: molecular analysis of complex lipids*, Royal Society of Chemistry, **2014**.
- [34] G. Liebisch, J.A. Vizcaíno, H. Köfeler, M. Trötzmüller, W.J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener, M.J. Wakelam, *J. Lipid Res.* 54.6 (**2013**) 1523-1530.
- [35] Lipidmaps adatbázis, <https://www.lipidmaps.org>
- [36] M. Li, L. Yan, Y. Bai, H. Liu, *Anal.Chem.* 86.1 (**2014**) 161-175.
- [37] R.J. Comer (Ed.), *A lélek betegségei*, Osiris Kiadó, **2000**.
- [38] A. Németh (Ed.), *A pszichiátria rövidített kézikönyve*, Medicina Könyvkiadó, **2011**.

- [39] L.M. Shin, I. Liberzon, *Neuropsychopharmacology*, 35 (2010) 169-191.
- [40] C.M. Stern, *J. Neurosci.* 31.6 (2011) 1935-1936.
- [41] C.P. Müller, M. Reichel, C. Mühle, C. Rhein, E. Gulbins, J. Kornhuber, *Biochim. Biophys Acta*, 1851.8 (2015) 1052–1065.
- [42] T. Züllig, M. Trötz Müller, H.C. Köfeler, *Anal Bioanal Chem.* 412.10 (2020) 2191-2209.
- [43] T. Sun, X. Wang, P. Cong, J. Xu, C. Xue, *Comp. Rev. Food Sci. Daf.* 19.5 (2020) 2530-2558.
- [44] E. Sokol, E. Almeida, H.K. Hannibal-Bach, D. Kotowska, J. Vogt, J. Baumgart, K.Kristiansen, R. Nitsch, J. Knudsen, C.S. Ejlsing, *Anal. Biochem.* 443 (2013) 88–96.
- [45] E. Cífková, M. Holčapek, M. Lísa, M. Ovčáčíková, F. Lyčka, P. Sandra, *Anal. Chem.* 84 (2012)10064–10070.
- [46] A. Triebel, M. Trötz Müller, J Hartler, T. Stojakovic, H.C. Köfeler, *J. Chromatogr. B.* 1053 (2017) 72-80.
- [47] T.M. Carbonaro, M.B. Gatch, *Brain Res. Bull.* 126 (2016) 74-88.
- [48] L.P. Cameron, D.E. Olson, *ASC Chem. Neurosci.* 9 (2018) 2344-2357.
- [49] J.G. Dean, T. Liu, S. Huff, B. Sheler, S.A. Barker, R.J. Strassman, M.M. Wang, J.Borjigin, *Sci. Rep.* 9.1 (2019) 1-11.
- [50] S.A. Barker, J. Borjigin, I. Lomnicka, R. Strassman, *Biomed. Chromatogr.* 27.12 (2013) 1690–1700.
- [51] L. Corbett, S.T. Christian, R.D. Morin, F. Benington, J.R. Smythies, *Br. J. Psychiatry* 132.2 (1978) 139–144.
- [52] F.R. Franzen, H. Gross, *Nature* 206.4988 (1965) 1052-1052.
- [53] S. Sato, T. Kawamata, T. Kobayashi, Y. Okada, *NeuroReport* 25.10 (2014) 731–736.
- [54] A. Szabo, A. Kovacs, J. Riba, S. Djurovic, E. Rajnavolgyi, E. Frecska, *Front. Neurosci.* 10 (2016) 423.
- [55] S.A. Barker, E.H. McIlhenny, R. Strassman, *Drug Test Anal.* 4.7-8 (2012) 617-635.
- [56] J. Kärkkäinen, T. Forsström, J. Tornaesus, K. Wähälä, P. Kiuru, A. Honkanen, U.H. Turpeinen, A. Hesso, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 65.3 (2005) 189–199.
- [57] D.E. Nichols, *J. Psychopharmacol.* 32.1 (2018) 30–36.
- [58] S.A. Barker, M.A. Littlefield-Chabaud, C. David, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 751.1 (2001) 37–47.

- [59] C.D.R. Oliveira, G.G. Okai, J.L. da Costa, R.M. de Almeida, D. Oliveira-Silva, M. Yonamine, *Bioanalysis* 4.14 (2012) 1731–1738.
- [60] M.R. Meyer, A. Caspar, S.D. Brandt, H.H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.* 406.1 (2014) 225–237.
- [61] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S.A. Barker, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 301–313.
- [62] I. Ujváry, *Élet és Tudomány*, 32 (2009) 1002-1004.
- [63] I. Ujváry, *Élet és Tudomány*, 33 (2009) 1043-1045.
- [64] EMCDDA: Perspectives on drugs, Synthetic cannabinoids in Europe, Link: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2753/POD_Synthetic%20cannabinoids_0.pdf Letöltve: 2020.04.29.
- [65] A.J. Potts, C. Cano, S.H.L Thomas, S.L. Hill, *Clin Toxicol*, 58.2 (2020) 82-98.
- [66] S. Tai, W.E. Fantegrossi, *Curr Top Behav Neurosci.*, 32 (2017) 249-262.
- [67] S.M.R. Gurney, K.S. Schott, S.L. Kacinko, B.C. Presley, B.K. Logan, *Forensic Sci Rev*, 26.1 (2014) 53-78.
- [68] EMCDDA: EU Drug markets Report 2019, Link: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12078/20192630_TD0319332E_NN_PDF.pdf Letöltve: 2020.04.27.
- [69] EMCDDA: European Drug Report, Trends and Development 2021, Link: <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13838/TDAT21001ENN.pdf> Letöltve: 2022.01.21.
- [70] L. Instítóris, K. Kovács, É. Sija, R. Berkecz, T. Körmöczi, I. Németh, I. Elek, Á. Bakos, I. Urbán, C. Pap, É. Kereszty, *Clin Toxicol*, 60.1 (2022) 18-24.
- [71] T. Csesztregi, *Szabadegyetem - Szeged*, XVII. szemeszter (2016)
- [72] A.G. Costantino, C. Altomare, A. Stella, Issues of false negative results in toxicology: difficult in detecting certain drugs and issues with detection of synthetic cathinone (bath salts), synthetic cannabinoids (spice), and other new psychoactive substances. In: *Accurate Results in the Clinical Laboratory*. Elsevier, 2019, 257-270.
- [73] X. Diao, M.A. Huestis, *Pharmacol. Ther.* 101.2 (2017) 239-253.
- [74] X. Diao, M.A. Huestis, *Front. Chem.* 7 (2019) 109.
- [75] C. Crespi, E. Francis, C. Patten, C. Billerica (MA): *BD Biosciences–Discovery Labware*. (2009)
- [76] M.J. Gomez-Lechon, M.T. Donato, A. Lahoz, J.V. Castell, *Curr. Drug Metab.* 9.1 (2008) 1-11.

- [77] Y. Yokoyama, Y. Sasaki, N. Terasaki, T. Kawataki, K. Takekawa, Y. Iwase, T. Shimizu, S. Sanoh, S. Ohta, *Biol. Pharm. Bull.* (2018) b17-00913.
- [78] A.P. Li, C. Lu, J.A. Brent, C. Pham, A. Fackett, A., C.E. Ruegg, P.M. Silber, *Chem. Biol. Interact.* 121.1 (1999) 17-35.
- [79] J.G. Hengstler, D. Utesch, P. Steinberg, K.L. Platt, B. Diener, M. Ringel, N. Swales, T. Fischer, K. Biefang, M. Gerl, T. Böttger, F. Oesch, *Drug Metab. Rev.* 32.1 (2000) 81-118.
- [80] T. Rosado, J. Goncalves, A. Luís, S. Malaca, S. Soares, D.N. Vieira, M. Barroso, E. Gallardo, *Bioanalysis*, 10.19 (2019) 1609-1623.
- [81] A.A. Aldlgan, H.J. Torrance, *Trends Analyt Chem*, 80 (2016) 444-457.
- [82] Az Országos Rendőrfőkapitányság közleménye egy új dizájner drog megjelenéséről, police.hu: <http://www.police.hu/hu/hirek-es-informaciok/legfrissebb-hireink/bunugyek/eletveszelyes-dizajner-drog-jelent-meg-a> Letöltve: 2021.06.07.
- [83] Az NSZKK sajtótájékoztatója a 4F-MDMB-BICA szintetikus kannabinoidról: <https://nszkk.gov.hu/hirek/sajtotajekoztato-4f-mdmb-bica-> Letöltve: 2021.06.07.
- [84] EMCDDA technical report: EMCDDA technical report on the new psychoactive substance methyl 2-([1-(4-fluorobutyl)-1H-indole-3-carbonyl]amino)-3,3-dimethylbutanoate (4F-MDMB-BICA), [Link: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13477/TR-4F-MDMB-BICA_Advanced-release.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13477/TR-4F-MDMB-BICA_Advanced-release.pdf) Letöltve: 2022.01.20.
- [85] A. Cannaert, E. Sparkes, E. Pike, J.L. Luo, A. Fang, R.C. Kevin, R. Ellison, R. Gerona, S.D. Banister, C.P. Stove, *ACS Chem. Neurosci.* 11.24 (2020) 4434-4446.
- [86] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S9–S14.
- [87] G. Liebisch, J.A. Vizcaíno, H. Köfeler, M. Trötz Müller, W.J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener, M.J.O. Wakelam, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1523.
- [88] C.A. Argmann, J. Auwerx, *Cur. Protoc. Mol. Biol.* 75 (2006) 29A.3.1–29A.3.4.
- [89] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [90] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [91] A. Cappiello, G. Famigliini, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, H. Trufelli, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9343–9348.
- [92] T. Kind, K.H. Liu, D.Y. Lee, B. DeFelice, J.K. Meissen, O. Fiehn, *Nat. Methods*, 10 (2013) 755–758.

- [93] M. Holčápek, E. Cífková, B. Červená, M. Lisa, J. Vostálová, J. Galuszka, *J. Chromatogr. A*, 1377 (2015) 85–91.
- [94] L. Jia, C. Wang, H. Kong, Z. Cai, G. Xu, *Metabolomics*, 2 (2006) 95–104.
- [95] D.W.L. Ma, B.M. Arendt, L.M. Hillyer, S.K. Fung, I. McGilvray, M. Guindi, J.P. Allard, *Nutr. Diabetes*, 6 (2016) 1–7.
- [96] O. Quehenberger, A.M. Armando, A.H. Brown, S.B. Milne, D.S. Myers, A.H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K.N. Jones, S. Kelly, R.L. Shaner, C.M. Sullards, E. Wang, R.C. Murphy, R.M. Barkley, T.J. Leiker, C.R.H. Raetz, Z. Guan, G.M. Laird, D.A. Six, D.W. Russell, J.G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, E.A. Dennis, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3299–3305.
- [97] Y. Rabagny, W. Herrmann, J. Geisel, S.H. Kirsch, R. Obeid, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 891–899.
- [98] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E.A. Dennis, C.K. Glass, A.H. Merrill, Jr, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, S. Subramaniam, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 527–532.
- [99] L. Abdullah, J.E. Evans, S. Ferguson, B. Mouzon, H. Montague, J. Reed, G. Crynen, T. Emmerich, M. Crocker, R. Pelot, M. Mullan, F. Crawford, *FASEB J.* 28.12 (2014) 5311–5321.
- [100] C. Bascoul-Colombo, I.A. Guschina, B.H. Maskrey, M. Good, V.B. O'Donnell, J.L. Harwood, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1861.6 (2016) 524–537.
- [101] S.M. van Liempd, D. Cabrera, F.Y. Lee, E. González, E.C. Dell'Angelica, C.A. Ghiani & J. M. Falcon-Perez, *Sci. Rep.* 7.1 (2017) 1–11.
- [102] T.G. Oliveira, R.B. Chan, F.V. Bravo, A. Miranda, R.R. Silva, B. Zhou, F. Marques, V. Pinto, J.J. Cerqueira, G. Di Paolo, N. Sousa, *Mol. Psychiatry*, 21.1 (2016) 80–88.
- [103] C.H. Cortie, A.J. Hulbert, S.E. Hancock, T.W. Mitchell, D. McAndrew, P.L. Else, *Exp. Gerontol.* 70 (2015) 135–143.
- [104] T. Zhang, S. Chen, X. Liang, H. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* 407.21 (2015) 6543–6555.
- [105] L. Mogler, F. Franz, D. Rentsch, V. Angerer, G. Weinfurtner, M. Longworth, S.D. Banister, M. Kassiou, B. Moosmann, V. Auwärter, *Drug. Test. Anal.* 10.1 (2018) 196–205.
- [106] M.T. Truver, S. Watanabe, A. Åstrand, S. Vikingsson, H. Green, M.J. Swortwood, R. Kronstrand, *Drug. Test. Anal.* 12.1 (2020) 127–135.

- [107] S. Watanabe, S. Vikingsson, A. Åstrand, H. Gréen, R. Kronstrand, *AAPS J.* 22.1 (2020) 13.
- [108] B. Haschimi, L. Mogler, S. Halter, A. Giorgetti, B. Schwarze, F. Westphal, S. Fischmann, V. Auwärter, *Drug. Test. Anal.* 11.9 (2019) 1377-1386.
- [109] T. Cajka, O. Fiehn, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 61 (2014) 192–206.
- [110] M. Lída, E. Cífková, M. Holčapek, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5146–5156.
- [111] A.J. Alpert, *J. Chromatogr. A*, 499 (1990) 177–196.
- [112] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29.12 (2006) 1784–1821.
- [113] W. Naidong, *J. Chromatogr. B*, 796 (2003) 209–224.
- [114] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247.
- [115] M. Croset, N. Brossard, A. Polette, M. Lagarde, *Biochem. J.* 345 (2000) 61–67.
- [116] E. Cífková, R. Hájek, M. Lída, M. Holčapek, *J. Chromatogr. A*, 1439 (2016) 65–73.
- [117] D.L. Buhrman, P.I. Price, P.J. Rudewicz, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 7 (1996) 1099-1105.
- [118] S. Wiklund, E. Johansson, L. Sjöström, E.J. Mellerowicz, U. Edlund, J.P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz, J. Trygg, *Anal. Chem.* 80 (2008) 115–122.
- [119] A. Demirkan, A. Isaacs, P. Ugocsai, G. Liebisch, M. Struchalin, I. Rudan, J.F. Wilson, P.P. Pramstaller, U. Gyllensten, H. Campbell, G. Schmitz, B.A. Oostra, C.M. Van Duijn, *J. Psychiatr. Res.* 47 (2013) 357–362.
- [120] S.J. Evans, S. Assari, G.J. Harrington, Y.W. Chang, C.F. Burant, M.G. McInnis, *J. Psychiatr Res.* 68 (2015) 61–67.
- [121] H.Y. Wei, J.Y. Gu, X.Y. Jiang, N.Deng, J. Wu, L.H. Zou, Y.M. Zhu, B.Y. Tan, *Sci. Rep.* 11.1 (2021) 1-11.
- [122] T. Tian, Q. Mao, J. Xie, Y. Wang, W.H. Shao, Q- Zhong, J.J. Chen, *J. Adv. Res.* (2021)
- [123] N.E. Braverman, A.B. Moser, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1822 (2012) 1442-1452.
- [124] Dimetiltriptamin Bioinformatikai és Kémiai adata, Drugbank: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01488> Letöltve: 2021.06.28.
- [125] α -Metiltriptamin Bioinformatikai és Kémiai adata, Drugbank: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01446> Letöltve: 2021.06.28.
- [126] R.W. Walker, H.S. Ahn, G. Albers-Schönberg, L.R. Mandel, W.J.A.Vandenheuvel, *Biochem. Med.* 8.1 (1973) 105–113.

- [127] L.J. Riceberg, H.V. Vunakis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206.1 (1978) 158–166.
- [128] K.H. Diehl, R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J.-M. Vidal, C.V.D. Vorstenbosch, *J. Appl. Toxicol.* 21.1 (2001) 15–23.
- [128] S.A. Burchett, T.P. Hicks, *Prog. Neurobiol.* 79.5-6 (2006) 223–246.
- [129] M. Andersson, X. Diao, A. Wohlfarth, K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30.8 (2016) 1067-1078.
- [130] A.J. Krotulski, A.L. Mohr, S.L. Kacinko, M.F. Fogarty, S.A. Shuda, F.X. Diamond, W.A. Kinney, M.J. Menendez, B.K. Logan, *J. Forensic Sci.* 64.5 (2019) 1451-1461.
- [131] D. Fabregat- Safont, M. Mardal, C. Noble, A. Canaert, C.P. Stove, J.V. Sancho, K. Linnet, F. Hernandez, M. Ibáñez, *Drug. Test. Anal.* 11.9 (2019) 1358-1368.
- [132] Í. Szabó, V.É. Varga, S. Dvorácskó, A.E. Farkas, T. Körmöczi, R. Berkecz, S. Kecskés, Á. Menyhárt, R. Frank, D. Hantosi, N.V. Cozzi, E. Frecska, C. Tömböly, I.A. Krizbai, F. Bari, E. Farkas, *Neuropharmacology* 192 (2021) 108612

9. Közlemények listája

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10062186

9.1. Az értekezés alapját képező közlemények

1. R. Berkecz, **T. Körmöczi**, F. Tömösi, V. Szegedi, J. Horváth, N. Kovács, T. Janáky
Plasma phospholipid profiling of a mouse model of anxiety disorder by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry
Biomedical Chromatography, 32 (2018) e4202.
DOI: 10.1002/bmc.4202 **IF: 1,760**
2. R. Berkecz, F. Tömösi, **T. Körmöczi**, V. Szegedi, J. Horváth, T. Janáky
Comprehensive phospholipid and sphingomyelin profiling of different brain regions in mouse model of anxiety disorder using online two-dimensional (HILIC/RP)-LC/MS method
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 149 (2018) 308-317.
DOI: 10.1016/j.jpba.2017.10.043 **IF: 3,077**
3. **T. Körmöczi**, Í. Szabó, E. Farkas, B. Penke, T. Janáky, I. Ilisz, R. Berkecz
Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry for determination of N,N-dimethyltryptamine in rat plasma and brain; Method development and application
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 191 (2020) 113615
DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113615 **IF: 3,935**
4. **T. Körmöczi**, É. Sija, L. Inostóris, É. Kereszty, I. Ilisz, R. Berkecz
Analytical Methodologies for the Characterization and Analysis of the Parent Compound and Phase I Metabolites of 4F-MDMB-BICA in Human Microsome, Urine and Blood Samples
Journal of Analytical Toxicology, (2021) bkab004.
DOI: 10.1093/jat/bkab004 **IF(2020): 3,367**
Összesített IF: 12,139

9.2. Az értekezés témájához kapcsolódó, az értekezésben fel nem használt közlemények

1. K. Kovács, É. Kereszty, R. Berkecz, L. Tiszlavicz, É. Sija, **T. Körmöczi**, N. Jenei, H. Révész-Schmehl, L. Institóris
Fatal intoxication of a regular drug user following N-ethyl-hexedrone and ADB-FUBINACA consumption
Journal of Forensic and Legal Medicine, 65 (2019) 92-100.
DOI: 10.1016/j.jflm.2019.04.012 **IF:1,302**
2. Í. Szabó, V.É. Varga, S. Dvorácskó, A.E. Farkas, **T. Körmöczi**, R. Berkecz, S. Kecskés, Á. Menyhárt, R. Frank, D. Hantosi, N.V. Cozzi, E. Frecska, C. Tömböly, I.A. Krizbai, F. Bari, E. Farkas
N,N-Dimethyltryptamine attenuates spreading depolarization and restrains neurodegeneration by sigma-1 receptor activation in the ischemic rat brain
Neuropharmacology, 192 (2021) 108612
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108612 **IF(2020): 5,250**
3. V. Kovács, G. Remzsó, **T. Körmöczi**, R. Berkecz, V. Tóth-Szúki, A. Péntzes, L. Vécsei, F. Domoki
The Kynurenic Acid Analog SZR72 Enhances Neuronal Activity after Asphyxia but Is Not Neuroprotective in a Translational Model of Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy
International Journal of Molecular Sciences, 22.9 (2021) 4822
DOI: 10.3390/ijms22094822 **IF(2020): 5,923**
4. L. Institóris, K. Kovács, É. Sija, R. Berkecz, **T. Körmöczi**, I. Németh, I. Elek, Á. Bakos, I. Urbán, C. Pap, É. Kereszty
Clinical symptoms and blood concentration of new psychoactive substances (NPS) in intoxicated and hospitalized patients in the Budapest region of Hungary (2018-19)
Clinical Toxicology, 60.1 (2022) 18-24.
DOI: 10.1080/15563650.2021.1928162 **IF(2020) 4,467**

5. S. Hornok, R. Berkecz, E. Sós, A. D. Sándor, **T. Körmöczi**, N. Solymosi, J. Kontschán, A. Hunyadi
Arthropod moulting hormones (ecdysteroids) are present in the blood of insectivorous bats
Mammal Review, (2022)
DOI: 10.1111/mam.12283
- IF(2021) 4,927**
Összesített IF: 21,869
ΣΣ IF: 34,008

9.3. Előadások

1. **T. Körmöczi**, É. Sija, R. Berkecz
Dizájner drogok fogyasztásának igazolása a metabolomika segítségével
Tavaszi Szél Konferencia 2018: Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia, 2018.
Május 4-6. Magyarország, Győr
2. É. Sija, R. Berkecz, L. Institóris, **T. Körmöczi**, T. Janáky, É. Kereszty
Detections and Metabolism of Three Synthetic Cannabinoids
26th International Meeting on Forensic Medicine, Alpe-Adria-Pannonia, 2018.
Május 30-Június 2., Horvátország, Póla
3. É. Sija, R. Berkecz, L. Institóris, **T. Körmöczi**, É.M. Kereszty
Adb-Fubinaca okozta intoxikáció büntetés-végrehajtási intézetben, Esetbemutató
A Magyar Igazságügyi Orvosok Társasága XVI. Nemzetközi Konferenciája, 2018.
Augusztus 30-Szeptember 1., Magyarország, Pécs
4. B. Barna, **T. Körmöczi**, É. Sija, R. Berkecz
Laboratory challenges of detecting synthetic cannabinoids in urine samples – a new sample preparation method
24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2018.
Október 8-9., Magyarország, Szeged
5. É. Sija, R. Berkecz, L. Institóris, **T. Körmöczi**, É. Kereszty
Szintetikus kannabinoidok in vitro és in vivo képződő metabolitjainak vizsgálata
TOX'2018 Tudományos Konferencia, 2018. Október 17-19. Magyarország, Lillafüred

6. **T. Körmöczi**, O. Kovács, É. Sija, Á. Hunya, R. Samavati, R. Gáspár, L. Institóris, I. Ilisz, R. Berkecz
Analysis of Designer Drugs and Their Metabolites in Blood and Urine Samples
25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2019. Október 7-8., Magyarország, Szeged
7. É. Sija, L. Institóris, R. Berkecz, **T. Körmöczi**, K. Kovács, É.M. Kereszty
5F-MDMB-PICA és 5F-MDMB-PINACA metabolitjainak in vitro és in vivo vizsgálata
TOX'2019 Tudományos Konferencia, 2019. Október 9-11. Magyarország, Szeged
8. **T. Körmöczi**, O. Kovács, É. Sija, Á. Hunya, R. Samavati, R. Gáspár, L. Institóris, I. Ilisz, R. Berkecz
Dizájner drogok és metabolitjaik az igazságügyi gyakorlatban
XLII. Kémiai Előadói Napok, 2019. Október 28-30, Magyarország, Szeged
9. **T. Körmöczi**, É. Sija, R. Berkecz
The Most Common Synthetic Cannabinoids in the Last Year; Focusing on Their Metabolites in Biofluids
26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2020. November 23-24., Magyarország, Szeged, online

9.4. Poszterek

1. R. Berkecz, F. Tömösi, **T. Körmöczi**, T. Janáky
Development and Application of a Novel Comprehensive Online Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry Method in Lipidomics
11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of Ernő Tyihák, 2017. Szeptember 6-8., Magyarország, Siófok.
2. **T. Körmöczi**, É. Sija, R. Berkecz
Analysis of new synthetic cannabinoid in human urine by LC-MS/MS
23rd International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2017. Október 9-10., Magyarország, Szeged

3. **É. Sija, T. Körmöczi, F. Tömösi, T. Janáky, L. Institóris, É.M. Kereszty, R. Berkecz**
ADB-FUBINACA és CUMYL-PEGACLONE metabolitjainak azonosítása human májmikroszómából
TOX'2017 Tudományos Konferencia, 2017. Október 11-13. Magyarország, Bükkfűrdő
4. **T. Körmöczi, É. Sija, R. Berkecz**
Challenges in Detecting Synthetic Cannabinoids in Human Urine Samples (Focus on their Metabolism)
36th Informal Meeting on Mass Spectrometry, 2018. Május 6-9., Magyarország, Kőszeg
5. **T. Körmöczi, É. Sija, O. Nagy, Zs. Ruppert, Á. Hunya, R. Berkecz**
Challenges in Detection of the Recently Emerged Synthetic Cannabinoids in Human Urine Samples
26th International Meeting on Forensic Medicine, Alpe-Adria-Pannonia, 2018. Május 30-Június 2., Horvátország, Póla
6. **A. Dweny, T. Körmöczi, O. Kovács, R. Samavati, R. Gáspár, R. Berkecz**
Development of targeted LC-MS/MS method for analysis of diclofenac and its main metabolites in rat liver perfusion solution obtained by new type of ex vivo perfusion system
24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2018. Október 8-9., Magyarország, Szeged
7. **T. Körmöczi, É. Sija, R. Berkecz**
Identification of the main metabolites of three synthetic cannabinoids using LC-MS/MS technique
24th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2018. Október 8-9., Magyarország, Szeged
8. **T. Körmöczi, O. Kovács, R. Samavati, É. Sija, R. Gáspár, R. Berkecz**
Májperfúziós ex vivo vizsgálat lehetőségei a dizájner drog metabolit kutatásban
TOX'2018 Tudományos Konferencia, 2018. Október 17-19. Magyarország, Lillafűrdő

- 9. T. Körmöczi**, O. Kovács, A. Dweny, R. Samavati, R. Gáspár, R. Berkecz
Újtípusú májperduziós módszer kísérleti beállítása diklofenák hatóanyag segítségével
Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2018. November 8-9., Magyarország, Tapolca
*poszerfődíj
- 10.** O. Kovács, R. Samavati, **T. Körmöczi**, R. Berkecz, R. Róbert
Development of vapor chamber rat liver perfusion system for metabolite research
RECOOP 14th Bridges in Life Sciences Conference, 2019. Április 10-12., Szlovákia, Pozsony
- 11.** R. Berkecz, **T. Körmöczi**, Í. Szabó, E. Farkas, E. Frecska, T. Janáky
Development and application of heart-cutting 2D-LC-MS/MS method for analysis of N,N-dimethyltryptamine in brain samples
12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2019. Szeptember 11-13., Magyarország, Siófok
- 12. T. Körmöczi**, O. Kovács, R. Samavati, R. Gáspár, R. Berkecz
Ex vivo Pharmacokinetic Profiles of CUMYL-PeGaCLONE Synthetic Cannabinoid and Its Metabolites
12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2019. Szeptember 11-13., Magyarország, Siófok
- 13.** N. Kmetykó, **T. Körmöczi**, Í. Szabó, E. Farkas, T. Janáky, I. Ilisz, R. Berkecz
Determination of Dimethyltryptamine in Rat Plasma Using 2D-LC-MS/MS Method
25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, 2019. Október 7-8., Magyarország, Szeged
- 14.** L. Institóris, É. Sija, I. Elek, R. Berkecz, **T. Körmöczi**, É. Kereszty
Designer drogok gyakorisága és jellemzése intoxikált droghasználók vérmintáinak idősoros analízise alapján
TOX'2019 Tudományos Konferencia, 2019. Október 9-11. Magyarország, Szeged
- 15.** Í. Szabó, **T. Körmöczi**, S. Dvorácskó, D. Hantosi, A. Menyhárt, F. Bari, R. Berkecz, C. Tömböly, B. Penke, E. Farkas
Dimethyltryptamine attenuates spreading depolarization in the ischemic rat brain
IBRO Workshop, 2020. Január 29-30., Magyarország, Szeged

16. Í. Szabó, V.E. Varga, **T. Körmöczi**, S. Dvorácskó, D. Hantosi, A. Menyhárt, F. Bari, R. Berkecz, B. Penke, E. Farkas

Dimethyltryptamine Attenuates Spreading Depolarization and Apoptotic Cell Death in the Ischemic Rat Brain

4th Hungarian Neuroscience Meeting for Undergraduate Students, Graduate Students, and Junior Post-Docs, HUNDOC 2020, 2020. Január 28., Magyarország, Szeged

17. **T. Körmöczi**

Quantitative analysis of synthetic cannabinoids and their metabolites in human urine and blood samples

EUGLOH Annual Student Research Conference, 2020. Szeptember 28-30., online

9.5. Témavezetések

1. Nagy Olivér, biológia BSc. szakdolgozat

Legújabb dizájner drogok metabolitjainak LC-MS/MS azonosítása (2018)

Témavezetők: Berkecz Róbert egyetemi adjunktus, **Körmöczi Tímea** PhD hallgató

Belső konzulens: Szekeres András tudományos munkatárs

2. Dweny Mohamed Ayaallah Mohamed, vegyész MSc. diplomamunka

Development and application of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for identification of designer drug metabolites (2018)

Témavezetők: Berkecz Róbert egyetemi adjunktus, **Körmöczi Tímea** PhD hallgató

Belső konzulens: Pálinkó István egyetemi tanár

3. Kmetykó Noémi, kémia BSc. szakdolgozat

Célzott UHPLC-MS/MS analitikai módszer kifejlesztése és alkalmazása kinurénsav, xanturénsav és legújabb származékaiknak mennyiségi meghatározására (2020)

Témavezetők: Berkecz Róbert egyetemi adjunktus, **Körmöczi Tímea** tudományos segédmunkatárs

Belső konzulens: Alapi Tünde egyetemi adjunktus

4. Kovács Petra, gyógyszerészhallgató szakdolgozat (2022)

Témavezetők: Berkecz Róbert egyetemi adjunktus, **Körmöczi Tímea** tudományos segédmunkatárs, PhD hallgató

10. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani **Dr. Berkecz Róbertnek**, aki közel 6 éven át terelgetett, mint MSc és PhD témavezetőm. Mindvégig hasznos szakmai tanácsaival segítette és irányította a munkám sikeres elvégzését, mely nagymértékben hozzájárult szakmai fejlődésemhez. Köszönöm a töretlen támogatását, kitartását és türelmét. Hálás vagyok, hogy segítségére mind szakmailag, mind emberileg mindig számíthattam.

Köszönöm **Prof. Dr. Tóth Gábornak** és **Prof. Dr. Martinek Tamásnak**, az Orvosi Vegytani Intézet intézetvezetőinek, **Prof. Dr. Janáky Tamásnak**, az Orvosi Vegytani Intézet analitikai kutatócsoport vezetőjének és **Dr. Ilisz Istvánnak**, a Gyógyszeranalitikai Intézet intézetvezetőjének, hogy lehetőséget adtak a munkám megvalósulására és biztosították hozzá a szükséges feltételeket.

Hálásan köszönöm **Dr. Ábrahámné Szendrei Rita** technikusnak, hogy már a mesterszakon bevezetett a labor rejtelseibe és önzetlenül hozzájárult szakmai fejlődésemhez. Szeretném megköszönni **Vasas Gabriella** technikusnak a segítséget, nekik köszönhetően munkámat oldott és motiváló légkörben végezhettem.

Szeretném megköszönni **Dr. Kereszty Éva**, **Dr. Instítóris László**, **Dr. Sija Éva**, **Dr. Farkas Eszter**, **Dr. Szegedi Viktor** és **Dr. Horváth János** együttműködő partnereinknek a doktori disszertációm alapjául szolgáló közös munkát.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Prof. Dr. Molnár Árpádnak** a lektorálásban nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban hálás vagyok **Édesanyámnak**, **Édesapámnak**, a **családomnak** és a **barátaimnak**, akik mindvégig támogattak. Köszönöm nektek!

A kutatómunkát az EFOP-3.6.1-16-2016-00008 pályázat támogatta.

11. Függelék

F1. táblázat 2D-UHPLC-HRMS módszer gradiens programja a szelepállásokkal

Első dimenzió (HILIC)			Szelepállás		Második dimenzió (RP-LC)		
Lipid osztályok	Retenciósi idő (perc)	B eluens (%)	1. módszer	2. módszer	Lipid speciesz	Retenciósi idő (perc)	B eluens (%)
nem-poláris lipidek, FA CE LPG PG	0,0	97	1	2		0,0	30
						2,0	95
						5,0	95
						5,1	30
						8,0	30
LPI PI PE			2	1	Nem-poláris lipidek, FA CER LPG PG	8,0	30
						10,0	95
						13,0	95
						13,1	30
LPE PC PS			1	2	LPI PI PE	16,0	30
						18,0	95
						21,0	95
						21,1	30
PC PS SM LPC PA			2	1	LPE PC PS	24,0	30
						26,0	95
						29,0	95
	30,0	82				29,1	30
	31,0	50				32,0	30
			1	2	PC PS SM LPC PA	32,0	30
		35,0				50	
		35,5				97	
		40,0				97	

F2. táblázat Egér vérplazmában azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiai és tömegspektrometriai adataik

Azonosított foszfolipid speciesz		Megfigyelt izomer	Megfigyelt ion	Retenciósi idő [perc]	Molekulatömeg [m/z]		Tömegpontosság (ppm)
		ESI ⁻		tartomány	elméleti	mért	
1	PG 34:2		[M-H] ⁻	2,78-2,84	745,5025	745,5024	-0,1
2	PG 34:1				747,5182	747,5170	-1,6
3	PG 34:0 (STD)				749,5338	749,5328	-1,3
4	PG 36:4				769,5025	769,5017	-1,0
5	PG 36:2				773,5338	773,5327	-1,4
6	PI 32:1		[M-H] ⁻	2,99-3,18	807,5029	807,5033	0,5
7	PI 34:3				831,5029	831,5029	0,0
8	PI 34:2				833,5186	833,5179	-0,8
9	PI 36:5				855,5029	855,4998	-3,6

F2. táblázat folytatása Egér vérplazmában azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiás és tömegspektrometriás adataik

Azonosított foszfolipid speciesz		Megfigyelt izomer	Megfigyelt ion	Retenciósi idő [perc]	Molekulatömeg [m/z]		Tömegpontosság (ppm)	
					ESI ⁻	tartomány		elméleti
10	PI 36:4		[M-H] ⁻	2,99-3,18		857,5186	857,5184	-0,2
11	PI 36:2					861,5499	861,5488	-1,3
12	PI 38:6					881,5186	881,5176	-1,1
13	PI 38:5					883,5342	883,5332	-1,1
14	PI 38:4					885,5499	885,5521	2,5
15	PI 40:7					907,5342	907,5336	-0,7
16	PI 40:6					909,5499	909,5488	-1,2
17	PI 40:5					911,5655	911,5615	-4,4
18	PI 40:4					913,5812	913,5789	-2,5
19	LPG 14:0 (STD)		[M-H] ⁻	3,24-3,36		455,2416	455,2407	-2,0
20	LPG 18:2					507,2729	507,2717	-2,4
21	LPG 18:1					509,2885	509,2876	-1,8
22	LPG 22:6					555,2729	555,2726	-0,5
23	LPI 16:0		[M-H] ⁻	3,77-3,84		571,2889	571,2883	-1,1
24	LPI 18:2					595,2889	595,2891	0,3
25	LPI 18:0	+				599,3202	599,3222	3,3
26	LPI 20:4					619,2889	619,2882	-1,1
27	LPI 22:6					643,2889	643,2881	-1,2
28	PE O-32:1, P-32:0		[M-H] ⁻	3,89-4,08		674,5130	674,5131	0,1
29	PE 32:0					690,5079	690,5079	-1,6
30	PE O-34:3; P-34:2					698,5130	698,5122	-1,1
31	PE 34:2					714,5079	714,5068	-1,5
32	PE 34:0 (STD)					718,5392	718,5382	-1,4
33	PE O-36:5; P-36:4					722,5130	722,5128	-0,3
34	PE O-36:3; P-36:2					726,5443	726,5448	0,7
35	PE 36:4					738,5079	738,5076	-0,4
36	PE 36:2					742,5392	742,5383	-1,2
37	PE O-38:7; P-38:6					746,5130	746,5120	-1,3
38	PE O-38:5; P-38:4					750,5443	750,5432	-1,5
39	PE 38:6					762,5079	762,5048	-4,1
40	PE 38:5					764,5236	764,5226	-1,3
41	PE 38:4					766,5392	766,5372	-2,6
42	PE O-40:7; P-40:6					774,5443	744,5419	-3,1
43	PE O-40:5; P-40:4					778,5756	778,5746	-1,3
44	PE 40:8					786,5079	786,5080	0,1
45	PE 40:6					790,5392	790,5355	-4,7
46	PE P-42:6					802,5756	802,5751	-0,6
47	PE 42:10, O-42:3, P-42:2					810,5079	810,5074	-0,6

F2. táblázat folytatása Egér vérplazmában azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiás és tömegspektrometriás adataik

Azonosított foszfolipid speciesz		Megfigyelt izomer	Megfigyelt ion	Retenciósi idő [perc]	Molekulatömeg [m/z]		Tömegpontosság (ppm)		
			ESI ⁻		tartomány	elméleti		mért	
48	PS 34:0 (STD)		[M-H] ⁻	4,35-4,48	762,5291	762,5281	-1,3		
49	PS 36:4				782,4978	782,4986	1,0		
50	PS 36:2				786,5291	786,5280	-1,4		
51	PS 36:1				788,5447	788,5436	-1,4		
52	PS 38:6				806,4978	806,4972	-0,7		
53	PS 38:5				808,5134	808,5119	-1,9		
54	PS 38:4				810,5291	810,5270	-2,6		
55	PS 40:6				834,5291	834,5279	-1,4		
56	LPE 14:00 (STD)	+	[M-H] ⁻	4,74-5,06	424,2470	424,2462	-1,9		
57	LPE P-16:0				436,2834	436,2821	-3,0		
58	LPE O-16:0				438,2990	438,2978	-2,7		
59	LPE 16:1				450,2626	450,2616	-2,2		
60	LPE 16:0				452,2783	452,2775	-1,8		
61	LPE O-18:1; P-18:0				464,3147	464,3143	-0,9		
62	LPE O-18:0				466,3303	466,3292	-2,4		
63	LPE 18:3				474,2626	474,2617	-1,9		
64	LPE 18:2				476,2783	476,2774	-1,9		
65	LPE 18:1				478,2939	478,2927	-2,5		
66	LPE 18:0				480,3096	480,3084	-2,5		
67	LPE 20:5				498,2626	498,2622	-0,8		
68	LPE 20:4				500,2783	500,2779	-0,8		
69	LPE 20:1				506,3252	506,3239	-2,6		
70	LPE 22:6				524,2783	524,2776	-1,3		
71	PC 28:0 (STD)				[M+HCOO] ⁻	5,49-5,86	722,4973	722,4968	-0,7
72	PC 30:0						750,5286	750,5277	-1,2
73	PC O-32:1; P-32:0						762,5649	762,5683	4,5
74	PC O-32:0						764,5806	764,5838	4,2
75	PC 32:2						774,5286	774,5289	0,4
76	PC 32:1		776,5442	776,5442			0,0		
77	PC 32:0		778,5599	778,5594			-0,6		
78	PC O-34:2; P-34:1		788,5806	788,5778			-3,6		
79	PC O-34:1; P-34:0		790,5962	790,5986			3,0		
80	PC 34:3		800,5442	800,5438			-0,5		
81	PC 34:2		802,5599	802,5633			4,2		
82	PC 36:5		824,5442	824,5443			0,1		
83	PC 36:4		826,5599	826,5620			2,5		
84	PC 36:2		830,5912	830,5917			0,6		
85	PC O-38:5; P-38:4		838,5962	838,5983			2,5		
86	PC 38:7; O-38:0		848,5442	848,5432			-1,2		
87	PC 38:6		850,5599	850,5590			-1,1		
88	PC 38:4		854,5912	854,5927			1,8		

F2. táblázat folytatása Egér vérplazmában azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiás és tömegspektrometriás adataik

Azonosított foszfolipid speciesz		Megfigyelt izomer	Megfigyelt ion	Retenciósi idő [perc]	Molekulatömeg [m/z]		Tömegpontosság (ppm)
			ESI ⁻		tartomány	elméleti	
89	PC O-40:6; P-40:5		[M+HCOO] ⁻	5,49-5,86	864,5755	864,5769	1,6
90	PC 40:8				874,5599	874,5601	0,2
91	PC 40:7				876,5755	876,5740	-1,7
92	PC 40:6				878,5912	878,5903	-1,0
93	PC 42:8				902,5912	902,5923	1,2
94	PC 42:7				904,6068	904,6060	-0,9
95	PC 42:6				906,6225	906,6212	-1,4
96	SM 30:1 (STD)		[M+HCOO] ⁻	5,86-6,21	691,5034	691,5024	-1,4
97	SM 32:1				719,5340	719,5340	0,0
98	SM 33:1				733,5496	733,5493	-0,4
99	SM 34:2				745,5496	745,5497	0,1
100	SM 34:1				747,5653	747,5658	0,7
101	SM 34:0				749,5809	749,5819	1,3
102	SM 35:1				761,5809	761,5788	-2,8
103	SM 36:3				771,5653	771,5648	-0,6
104	SM 36:2				773,5809	773,5804	-0,6
105	SM 36:1				775,5966	775,5985	2,4
106	SM 36:0				777,6122	732,6145	3,0
107	SM 37:1				789,6122	789,6116	-0,8
108	SM 38:2				801,6122	801,6133	1,4
109	SM 39:2				815,6279	815,6289	1,2
110	SM 39:1				817,6435	817,6443	1,0
111	SM 40:3				827,6279	827,6291	1,4
112	SM 40:2				829,6435	829,6464	3,5
113	SM 40:1				831,6592	831,6622	3,6
114	SM 41:2				843,6592	843,6599	0,8
115	SM 41:1				845,6748	845,6760	1,4
116	SM 42:4				853,6436	853,6428	-0,9
117	SM 42:3		855,6592	855,6613	2,5		
118	SM 42:2		857,6748	857,6772	2,8		
119	SM 43:2		871,6905	871,6890	-1,7		
120	SM 43:1		873,7061	873,7056	-0,6		
121	SM 44:2		885,7061	885,7048	-1,5		
122	LPC 14:0		[M+HCOO] ⁻	6,47-6,81	512,2989	512,2994	1,0
123	LPC P-16:0				524,3353	524,3347	-1,1
124	LPC O-16:0				526,3509	526,3507	-0,4
125	LPC 16:1				538,3145	538,3148	0,6
126	LPC 16:0				540,3302	540,3305	0,6
127	LPC P-18:0				552,3302	552,3284	-3,3
128	LPC O-18:0				554,3822	554,3828	1,1
129	LPC 18:2				564,3302	564,3307	0,9
130	LPC 18:0				568,3615	568,3639	4,2
131	LPC 19:0 (STD)	+			582,3771	582,3769	-0,3
132	LPC 20:4				588,3302	588,3306	0,7
133	LPC 20:1		594,3771	594,3766	-0,8		

F2. táblázat folytatása Egér vérplazmában azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiás és tömegspektrometriás adataik

Azonosított foszfolipid speciesz		Megfigyelt izomer	Megfigyelt ion	Retenciós idő [perc]	Molekulatömeg [m/z]		Tömegpontosság (ppm)
					ESI	tartomány	
134	LPC 20:0		[M+HCOO] ⁻	6,47-6,81	596,3928	596,3928	0,0
135	LPC 22:6	+			612,3302	612,3307	0,8
136	LPC 22:4				616,3615	616,3611	-0,6

F3. táblázat Egéragyban azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiás és tömegspektrometriás adataik

Foszfolipid osztály	Foszfolipid speciesz	Retenciós idő (perc)	Molekulatömeg (m/z)		Tömegpontosság (ppm)	Szorongó egerek osztályokon belüli relatív intenzitás (%)		
			elméleti	mért		DHPC	VHPC	PFC
LPG	16:0	9,02	483,2729	483,2722	-1,4	14,34	20,69	21,32
LPG	18:1	9,65	509,2885	509,2892	1,4	4,32	6,19	4,46
LPG	18:0	9,63	511,3042	511,3056	2,7	81,33	73,11	74,23
PG	32:0	10,40	721,5025	721,5011	-1,9	31,05	35,53	33,79
PG	34:2	10,22	745,5025	745,5009	-2,1	1,79	1,33	1,73
PG	36:4	10,30	769,5025	769,5014	-1,4	18,60	21,51	25,44
PG	36:2	10,36	773,5338	773,5316	-2,8	23,63	15,94	13,73
PG	36:1	10,52	775,5494	775,5480	-1,8	4,83	4,07	3,57
PG	38:6	10,26	793,5025	793,5031	0,8	2,09	1,66	1,57
PG	38:4	10,42	797,5338	797,5324	-1,8	18,01	19,95	20,17
LPI	16:0	16,85	571,2889	571,2880	-1,6	8,84	6,61	9,24
LPI	18:1	16,92	597,3045	597,3039	-1,0	7,58	7,13	6,97
LPI	18:0 (sn-2)	17,08	599,3202	599,3196	-1,0	5,41	4,38	5,05
LPI	18:0 (sn-1)	17,16	599,3202	599,3195	-1,2	47,55	38,07	39,89
LPI	20:4	16,73	619,2889	619,2881	-1,3	30,62	43,81	38,85
PI	34:2	18,19	833,5186	833,5162	-2,9	0,01	0,01	0,01
PI	36:5	18,22	855,5029	855,5046	2,0	0,02	0,03	0,03
PI	36:4	18,19	857,5186	857,5167	-2,2	5,27	7,26	5,92
PI	36:2	18,31	861,5499	861,5489	-1,2	0,16	0,13	0,05
PI	36:1	18,42	863,5655	863,5636	-2,2	1,08	0,87	0,28
PI	O-38:4, P-38:3	18,36	871,5706	871,5697	-1,0	0,14	0,1	0,1
PI	38:6	18,15	881,5186	881,5171	-1,7	0,6	0,71	0,71
PI	38:5	18,20	883,5342	883,5326	-1,8	4,9	6,03	4,42
PI	38:4	18,31	885,5499	885,5493	-0,7	85,8	82,42	86,45
PI	40:7	18,17	907,5342	907,5324	-2,0	0,09	0,1	0,09
PI	40:6	18,28	909,5499	909,5485	-1,5	1,65	2,08	1,84
PI	40:5	18,29	911,5655	911,5681	2,9	0,06	0,08	0,02
PI	40:4	18,40	913,5812	913,5799	-1,4	0,21	0,17	0,07
PE	32:1	18,54	688,4923	688,4912	-1,6	0,16	0,11	0,13
PE	32:0	18,66	690,5079	690,5069	-1,4	0,04	0,02	0,04
PE	O-34:3, P-34:2	18,61	698,5130	698,5121	-1,3	0,16	0,1	0,1
PE	O-34:2, P-34:1	18,72	700,5287	700,5278	-1,3	4,91	5,18	4,23
PE	34:2	18,56	714,5079	714,5061	-2,5	0,4	0,38	0,38
PE	34:1	18,68	716,5236	716,5225	-1,5	1,23	1,3	1,48
PE	O-36:5, P-36:4	18,59	722,5130	722,5113	-2,4	2,22	2,58	3,01
PE	O-36:3, P-36:2	18,72	726,5443	726,5433	-1,4	6,59	5,54	3,98
PE	35:1	18,66	730,5392	730,5380	-1,6	0,09	0,01	0,02
PE	36:5	18,42	736,4923	736,4914	-1,2	0,07	0,08	0,08
PE	36:4	18,54	738,5079	738,5069	-1,4	1,34	1,37	1,37

F3. táblázat folytatása Egéragyban azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiás és tömegspektrometriás adataik

Foszfolipid osztály	Foszfolipid speciesz	Retenciósi idő (perc)	Molekulatömeg (m/z)		Tömegpontosság (ppm)	Szorongó egerek osztályokon belüli relatív intenzitás (%)		
			elméleti	mért		DHPC	VHPC	PFC
PE	36:3	18,58	740,5236	740,5219	-2,3	0,25	0,32	0,15
PE	36:2	18,68	742,5392	742,5384	-1,1	0,17	0,11	0,15
PE	36:1	18,78	744,5549	744,5537	-1,6	3,17	2,64	2,38
PE	O-38:7, P-38:6	18,54	746,5130	746,5124	-0,8	12,83	12,01	12,79
PE	O-38:5, P-38:4	18,71	750,5443	750,5431	-1,6	8,2	9,91	10,25
PE	O-38:3, P-38:2	18,82	754,5756	754,5741	-2	3,55	2,53	1,85
PE	38:6	18,50	762,5079	762,5080	0,1	6,87	7,35	7,86
PE	38:5	18,56	764,5236	764,5254	2,4	0,39	0,36	0,39
PE	38:4	18,67	766,5392	766,5373	-2,5	9,93	10,94	10,78
PE	38:3	18,73	768,5549	768,5537	-1,6	0,03	0,01	0,04
PE	38:2	18,78	770,5705	770,5689	-2,1	0,3	0,18	0,13
PE	O-40:8, P-40:7	18,55	772,5283	772,5276	-0,9	3,45	3,08	3,37
PE	38:1	18,93	772,5862	772,5850	-1,6	0,06	0,01	0,01
PE	O-40:7, P-40:6	18,66	774,5443	774,5429	-1,8	16,7	16,25	16,38
PE	38:0	18,90	774,6018	774,6019	0,1	0,05	0,02	0,02
PE	O-40:3, P-40:2	18,95	782,6069	782,6069	0	0,72	0,57	0,33
PE	O-40:2, P-40:1	19,12	784,6226	784,6217	-1,1	0,41	0,30	0,18
PE	40:6	18,63	790,5392	790,5376	-2	13,05	13,97	15,33
PE	40:5	18,83	792,5549	792,5526	-2,9	0,04	0,04	0,03
PE	40:4	18,75	794,5705	794,5682	-2,9	2,14	2,18	2,39
PE	40:1	19,04	800,6175	800,6172	-0,4	0,05	0,02	0,01
PE	42:10, O-42:3, P-42:2	19,11	810,6382	810,6372	-1,2	0,09	0,05	0,03
PE	42:5	18,64	820,5862	820,5859	-0,4	0,12	0,18	0,17
PE	42:2	18,87	826,6331	826,6316	-1,8	0,31	0,30	0,20
LPE	P-16:0	25,37	436,2834	436,2828	-1,4	10,55	7,96	11,38
LPE	16:0	25,27	452,2783	452,2777	-1,3	7,97	6,99	9,16
LPE	O-18:1, P-18:0	25,71	464,3147	464,3141	-1,3	20,04	12,79	13,5
LPE	18:2	25,12	476,2783	476,2774	-1,9	0,13	0,1	0,14
LPE	18:1 (sn-2)	25,28	478,2939	478,2934	-1	1,21	1,07	1,18
LPE	18:1 (sn-1)	25,35	478,2939	478,2934	-1	7,35	7,13	7,00
LPE	18:0 (sn-2)	25,55	480,3096	480,3090	-1,2	3,1	4,36	3,69
LPE	18:0 (sn-1)	25,62	480,3096	480,3095	-0,2	24,11	29,14	24,9
LPE	20:4	25,11	500,2783	500,2779	-0,8	10,93	12,06	10,32
LPE	20:1 (sn2)	25,60	506,3252	506,3245	-1,4	0,13	0,18	0,08
LPE	20:1 (sn-1)	25,66	506,3252	506,3246	-1,2	0,62	0,55	0,28
LPE	22:6	25,08	524,2783	524,2777	-1,1	13,66	17,46	18,1
LPE	22:1 (sn-2)	25,92	534,3565	534,3558	-1,3	0,02	0,01	0,01
LPE	22:1 (sn-1)	25,51	534,3565	534,3561	-0,7	0,17	0,20	0,24
PC	30:0	26,54	750,5286	750,5281	-0,7	0,19	0,09	0,15
PC	O-32:1, P-32:0	26,74	762,5649	762,5650	0,1	0,13	0,09	0,10
PC	32:1	26,58	776,5442	776,5457	1,9	1,33	1,04	1,32
PC	32:0	26,67	778,5599	778,5597	-0,3	17	16,00	16,93
PC	O-34:3, P-34:2	34,21	786,5286	786,5282	-0,5	0,12	0,42	0,23
PC	O-34:1, P-34:0	26,77	790,5962	790,5939	-2,9	1,74	1,36	1,24
PC	O-34:0	26,94	792,6119	792,6119	0	0,33	0,21	0,26
PC	34:3	26,50	800,5442	800,5441	-0,1	0,01	0,00	0,01

F3. táblázat folytatása Egérágyban azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiai és tömegspektrometriás adataik.

Foszfolipid osztály	Foszfolipid speciesz	Retenciósi idő (perc)	Molekulatömeg (m/z)		Tömeg-pontosság (ppm)	Szorongó egerek osztályokon belüli relatív intenzitás (%)		
			elméleti	mért		DHPC	VHPC	PFC
PC	34:2	26,59	802,5599	802,5576	-2,9	1,10	1,31	1,39
PC	34:1	26,69	804,5755	804,5748	-0,9	23,78	21,73	22,97
PC	34:0	26,82	806,5912	806,5929	2,1	8,73	9,69	10,60
PC	O-36:5, P-36:4	34,22	810,5286	810,5282	-0,5	0,18	0,54	0,21
PC	O-36:4, P-36:3	25,61	812,5806	812,5829	2,8	0,01	0,00	0,02
PC	O-36:2, P-36:1	26,88	816,6119	816,6115	-0,5	0,07	0,02	0,02
PC	36:5	26,44	824,5442	824,5444	0,2	0,11	0,13	0,15
PC	36:4	26,55	826,5599	826,5598	-0,1	7,63	8,43	7,84
PC	36:3	26,62	828,5755	828,5747	-1,0	0,02	0,04	0,02
PC	36:2	26,72	830,5912	830,5894	-2,2	1,77	1,45	1,52
PC	36:1	26,83	832,6068	832,6062	-0,7	15,98	16,08	14,50
PC	O-38:4, P-38:3	26,75	840,6119	840,6116	-0,4	0,20	0,34	0,27
PC	O-38:3, P-38:2	26,85	842,6275	842,6260	-1,8	0,19	0,27	0,19
PC	38:7, O-38:0	26,40	848,5442	848,5446	0,5	0,04	0,05	0,07
PC	38:6	26,51	850,5599	850,5596	-0,4	8,20	9,49	9,52
PC	38:5	26,73	852,5755	852,5731	-2,8	-	0,01	0,01
PC	38:4	26,69	854,5912	854,5906	-0,7	3,37	2,98	2,89
PC	38:2	26,86	858,6225	858,6201	-2,8	0,29	0,19	0,15
PC	38:1	26,99	860,6381	860,6365	-1,9	1,92	1,67	1,05
PC	O-40:6, P-40:5	26,58	864,5755	864,5746	-1,0	0,01	0,00	0,01
PC	40:8	26,37	874,5599	874,5587	-1,4	0,83	1,50	1,40
PC	40:7	26,53	876,5755	876,5742	-1,5	0,80	0,93	1,15
PC	40:6	26,64	878,5912	878,5908	-0,5	2,40	2,68	2,84
PC	40:5	26,74	880,6068	880,6047	-2,4	0,07	0,06	0,09
PC	40:4	26,78	882,6225	882,6211	-1,6	0,49	0,52	0,49
PC	40:2	26,98	886,6538	886,6531	-0,8	0,43	0,31	0,13
PC	40:1	27,18	888,6694	888,6687	-0,8	0,47	0,31	0,21
PC	42:9	26,48	900,5755	900,5751	-0,4	0,01	0,00	0,01
PC	42:7	26,64	904,6068	904,6060	-0,9	0,03	0,03	0,03
PS	34:1	34,39	760,5134	760,5147	1,7	0,25	0,39	0,53
PS	36:1	34,52	788,5447	788,5427	-2,5	10,63	4,67	2,56
PS	38:5	34,24	808,5134	808,5138	0,5	0,07	0,06	0,06
PS	38:4	34,22	810,5291	810,5283	-1,0	5,62	3,75	2,42
PS	38:3	34,26	812,5450	812,5435	-1,5	0,18	0,67	0,39
PS	38:2	34,34	814,5604	814,5594	-1,2	0,34	1,08	0,69
PS	38:1	34,46	816,5760	816,5746	-1,7	0,93	1,56	0,71
PS	40:7	26,29	832,5134	832,5114	-2,4	1,22	1,10	1,59
PS	40:6	26,37	834,5291	834,5281	-1,2	78,78	84,35	89,53
PS	40:3	26,63	840,5760	840,5743	-2,0	0,33	0,29	0,27
PS	42:9	34,34	856,5134	856,5124	-1,2	1,63	2,10	1,25
LPC	14:0	32,88	512,2989	512,2986	-0,6	1,81	1,65	1,81
LPC	P-16:0	33,33	524,3353	524,3357	0,8	0,06	0,00	0,03
LPC	O-16:0	33,33	526,3509	526,3494	-2,8	0,16	0,02	0,05
LPC	16:1	32,98	538,3145	538,3144	-0,2	1,10	1,00	1,71
LPC	16:0 (sn-2)	33,16	540,3302	540,3302	0,0	6,01	6,36	8,53
LPC	16:0 (sn-1)	33,24	540,3302	540,3306	0,7	43,13	35,10	35,79
LPC	18:2	33,09	564,3302	564,3301	-0,2	0,59	0,41	0,76
LPC	18:1	33,32	566,3458	566,3458	0,0	25,66	28,05	25,67
LPC	18:0	33,57	568,3615	568,3612	-0,5	10,54	12,65	9,58
LPC	20:4	33,08	588,3302	588,3301	-0,2	7,10	9,60	9,54
LPC	20:3	33,21	590,3458	590,3451	-1,2	0,14	0,09	0,18

F3. táblázat folytatása Egéragyban azonosított foszfolipidek és főbb kromatográfiai és tömegspektrometriás adataik.

Foszfolipid osztály	Foszfolipid speciesz	Retenciósi idő (perc)	Molekulatömeg (m/z)		Tömeg-pontosság (ppm)	Szorongó egerek osztályokon belüli relatív intenzitás (%)		
			elméleti	mért		DHPC	VHPC	PFC
LPC	20:1	33,63	594,3771	594,3770	-0,2	1,06	1,07	0,94
LPC	20:0	33,87	596,3928	596,3927	-0,2	0,16	0,02	0,07
LPC	22:6	33,06	612,3302	612,3300	-0,3	2,47	3,96	5,34
PA	34:1	34,34	673,4814	673,4804	-1,5	21,95	22,84	26,88
PA	36:2	34,34	699,4970	699,4965	-0,7	3,21	0,68	1,06
PA	36:1	34,47	701,5127	701,5118	-1,3	21,82	12,99	13,70
PA	40:6	34,29	747,4970	747,4972	0,3	53,03	63,50	58,36
SM	34:1	34,40	747,5653	747,5632	-2,9	4,00	5,18	4,85
SM	34:0	34,46	749,5809	749,5787	-2,9	0,10	0,01	0,09
SM	35:1	35,63	761,5809	761,5787	-2,9	1,52	1,18	1,29
SM	36:2	34,44	773,5809	773,5808	-0,1	5,96	8,08	8,32
SM	36:1	34,55	775,5966	775,5965	-0,1	76,00	72,33	77,23
SM	38:1	34,72	803,6279	803,6279	0,0	3,19	4,23	3,04
SM	40:1	34,91	831,6592	831,6615	2,8	0,58	1,26	0,23
SM	42:2	34,87	857,6748	857,6746	-0,2	8,66	7,73	4,95

F4. táblázat A 2D-UHPLC-HRMS mérés során azonosított szignifikáns különbséget mutató agyi foszfolipid specieszek változása szorongó és nem szorongó egerek agyrégióiban

Egéragy régió	Foszfolipid speciesz	Szignifikancia érték (p)	Csúcsterület százalékos változása a nem szorongó egértörzshöz képest
DHPC	PE 40:5	< 0,001	27
DHPC	PE O-36:3, P-36:2	0,011	60
DHPC	PE O-38:3, P-38:2	0,017	62
DHPC	PE 34:1	0,020	84
DHPC	PE O-40:7, P-40:6	0,023	75
DHPC	SM 36:1	0,041	123
VHPC	PE 40:5	0,001	16
VHPC	PC 38:5	0,002	56
VHPC	PC O-34:1, P-34:0	0,004	58
VHPC	PC 40:2	0,007	34
VHPC	PC 40:4	0,009	65
VHPC	PC O-36:2, P-36:1	0,010	16
VHPC	PE O-40:7, P-40:6	0,013	77
VHPC	PE 34:1	0,015	78
VHPC	PC 36:3	0,015	30
VHPC	PE O-40:8, P-40:7	0,016	80
VHPC	PC 38:1	0,020	61
VHPC	PE 38:4	0,021	79

F4. táblázat folytatása A 2D-UHPLC-HRMS mérés során azonosított szignifikáns különbséget mutató agyi foszfolipid specieszek változása szorongó és nem szorongó egerek agyrégióiban

Egéragy régió	Foszfolipid speciesz	Szignifikancia érték (p)	Csúcsterület százalékos változása a nem szorongó egértörzshöz képest
VHPC	PI 36:5	0,029	59
VHPC	PC 40:6	0,030	73
VHPC	PE 40:6	0,032	84
VHPC	PG 32:0	0,037	76
VHPC	PC 38:7, O-38:0	0,037	50
VHPC	PC 34:2	0,040	76
VHPC	PE O-38:5, P-38:4	0,040	79
VHPC	PC O-32:1, P-32:0	0,040	65
PFC	PE 40:5	< 0,001	384
PFC	PE 38:0	0,003	24
PFC	PA 40:6	0,006	159
PFC	PS 36:1	0,007	40
PFC	PA 36:2	0,019	221
PFC	PC 42:9	0,019	256
PFC	PS 40:6	0,026	71
PFC	PE O-38:3, P-38:2	0,031	61
PFC	LPE 20:1 (sn-2)	0,031	34
PFC	PG 34:2	0,039	179
PFC	LPG 18:0	0,042	174

F5. táblázat A célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszer gradiens programja mindkét dimenzióban, szelepváltásokkal

Első dimenzió gradiens programja			Második dimenzió gradient programja			Szelepváltások		
Idő (perc)	B%	Áramlási sebesség (ml/perc)	Idő (perc)	B%	Áramlási sebesség (ml/perc)	Idő (perc)	Szelep 1	Szelep 2
0,00	85	0,3	0,00	2	0,5	0,00	2. Pozíció	2. Pozíció
						1,80	1. Pozíció	1. Pozíció
			3,00	2	0,5			
			3,10	2	0,3			
			3,50	2	0,3	3,5	2. Pozíció	2. Pozíció
4,00	85	0,3						
4,50	50	1,0						
			5,50	100	0,3			
			6,00	100	0,3			
			6,10	100	0,5			
6,50	50	1,0						
7,00	85	1,2						
						8,00	1. Pozíció	1. Pozíció
						8,01	2. Pozíció	2. Pozíció
			9,00	100	0,5			
			9,50	2	0,5	9,50	1. Pozíció	1. Pozíció
						9,51	2. Pozíció	2. Pozíció
9,90	85	1,2						
10,00	85	0,3	10,00	2	0,5			

F6. táblázat A főbLC-HRMS/MS adatai a 4F-MDMB-BICA anyavegyület (P) és az azonosított I. fázisú metabolitjainak szerkezeti információi retenciós idejük (t_R) sorrendjében. A rangsoroláshoz összehasonlítottuk az egyes metabolitok és a belső standard (AB-FUBINACA-D4) átlagos csúcsterületarányát. ND: nem detektált.

ID	Biotranszformáció	Karakterisztikus metabolit	Biotranszformáció feltételezett helye	Összegképlet	Elméleti tömeg [M+H] ⁺	t_R [perc]	Elméleti fragmensek tömege [m/z]	máj-mikroszórma	Rangsor						
									Vizelet 1	Vizelet 2	Vizelet 3	Vizelet 4	Vizelet 5	Vér 1	Vér 2
P	4F-MDMB-BICA			C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₃	363,2078	11,54	218,0976 144,0444	1	ND	17	ND	ND	ND	1	2
M01	Észter hidrolízis + N-dealkiláció + dehidrogénezés		kapcsolt csoport és mag és kapcsolt csoport	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₃	273,1234	3,75	144,0444 116,0495	13	6	3	ND	ND	ND	ND	7
M02	N-dealkiláció + mono-hidroxilezés		mag és kapcsolt csoport	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	305,1496	3,90	144,0444 162,1125	20	ND	13	ND	ND	ND	ND	ND
M03	N-dealkiláció + mono-hidroxilezés		mag és mag	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	305,1496	4,02	160,0393 132,0444	17	ND	18	ND	ND	ND	ND	ND
M04	N-dealkiláció + mono-hidroxilezés		mag és mag	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	305,1496	4,55	160,0393 132,0444	8	9	8	ND	ND	ND	ND	ND
M05	Di-hidroxilezés		mag és kapcsolt csoport	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₅	395,1977	4,72	234,0925 160,0393	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M06	Oxidatív defluorozás + mono-hidroxilezés		farok és mag	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	377,2071	5,34	232,0968 160,0393	30	13-14	15	ND	ND	ND	ND	ND
M07	N-dealkiláció + mono-hidroxilezés		mag és mag	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	305,1496	5,61	160,0393 132,0444	21	12	11	ND	ND	ND	ND	ND
M08	Észter hidrolízis + mono-hidroxilezés		kapcsolt csoport és mag	C ₁₉ H ₂₅ FN ₂ O ₄	365,1871	5,65	234,0925 160,0393	26	3	4	ND	3	ND	ND	9
M09	Észter hidrolízis + oxidatív defluorozás		kapcsolt csoport és farok	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₄	347,1965	5,68	216,1019 144,0444	ND	ND	14	ND	ND	ND	ND	12-13
M10	Di-hidroxilezés		farok és farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₅	395,1977	5,71	144,0444 250,0874	27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M11	Észter hidrolízis + mono-hidroxilezés		mag és kapcsolt csoport	C ₁₉ H ₂₅ FN ₂ O ₄	365,1871	5,90	218,0976 144,0444	28	5	6	ND	ND	ND	ND	5
M12	Amid hidrolízis		kapcsoló csoport	C ₁₃ H ₁₄ FNO ₂	236,1081	6,00	118,0651 130,0651	12	7	10	ND	ND	2	ND	ND
M13	Észter hidrolízis + mono-hidroxilezés		kapcsolt csoport és farok	C ₁₉ H ₂₅ FN ₂ O ₄	365,1871	6,07	234,0925 144,0444	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M14	Di-hidroxilezés		mag és farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₅	395,1977	6,13	160,0393 250,0874	29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M15	Di-hidroxilezés		mag és farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₅	395,1977	6,50	160,0393 250,0874	19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

F6. táblázat folytatása A főbb LC-HRMS/MS adatai a 4F-MDMB-BICA anyavegyület (P) és az azonosított I. fázisú metabolitjainak szerkezeti információi retenciós idejük (t_R) sorrendjében. A rangsoroláshoz összehasonlítottuk az egyes metabolitok és a belső standard (AB-FUBINACA-D4) átlagos csúcsterületarányát. ND: nem detektált.

ID	Biotranszformáció	Karakterisztikus metabolit	Biotranszformáció feltételezett helye	Összegképlet	Elméleti tömeg [M+H] ⁺	t_R [perc]	Elméleti fragmencionok tömege [m/z]	máj-mikroszóma	Rangsor						
									Vizelet 1	Vizelet 2	Vizelet 3	Vizelet 4	Vizelet 5	Vér 1	Vér 2
M16	Észter hidrolíziss + mono-hidroxilezés		kapcsolt csoport és mag	C ₁₉ H ₂₅ FN ₂ O ₄	365,1871	6,70	234,0925 144,0444	31	15	20	ND	ND	ND	ND	ND
M17	Di-hidroxilezés		farok és farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₅	395,1977	6,90	335,1765 250,0874	18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M18	N-dealkiláció		mag	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₃	289,1547	7,32	144,0444 116,0495	2	ND	19	ND	ND	ND	ND	3
M19	Karboxilezés		kapcsolt csoport	C ₂₀ H ₂₅ FN ₂ O ₅	393,1820	7,41	218,0976 144,0444	24	13-14	9	ND	ND	ND	ND	ND
M20	N-dealkilezés + mono-hidroxilezés		mag és mag	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	305,1496	7,43	160,0393 132,0444	23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M21	Butánsav		farok	C ₁₀ H ₂₆ N ₂ O ₅	375,1914	7,97	230,0812 144,0444	ND	4	7	ND	ND	ND	ND	8
M22	Mono-hidroxilezés		kapcsolt csoport	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	7,98	218,0976 144,0444	7	ND	12	ND	ND	ND	ND	ND
M23	Di-hidroxilezés		farok és farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₅	395,1977	8,09	335,1765 250,0874	22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M24	Oxidatív defluorozás		farok	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₄	361,2122	8,09	216,1019 144,0444	16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6
M25	Mono-hidroxilezés	májmikroszóma (1.), vizelet (2.)	mag	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	8,09	234,0925 160,0393	3	2	2	1	1	3	ND	10
M26	Észter hidrolíziss + dehidrogénezés	májmikroszóma (2.), vér (2.)	kapcsolt csoport és kapcsolt csoport	C ₁₉ H ₂₃ FN ₂ O ₃	347,1765	8,17	218,0976 144,0444	4	8	5	ND	ND	ND	3	4
M27	Mono-hidroxilezés		mag	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	8,34	234,0925 144,0444	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12-13
M28	Mono-hidroxilezés		farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	8,53	234,0925 144,0444	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14
M29	Észter hidrolíziss	vizelet (1.), vér (1.)	kapcsolt csoport	C ₁₉ H ₂₅ FN ₂ O ₃	349,1922	8,83	218,0976 144,0444	6	1	1	2	2	1	2	1
M30	Mono-hidroxilezés		farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	9,11	144,0444 234,0925	11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M31	Mono-hidroxilezés		farok	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	9,24	144,0444 234,0925	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M32	Mono-hidroxilezés		mag	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	9,36	234,0925 160,0393	10	11	16	ND	ND	ND	ND	ND
M33	Mono-hidroxilezés		mag	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₄	379,2028	12,11	234,0925 160,0393	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11

