

VÝVOJ METODIKY TOXIKOLOGICKÉHO SCREENINGU PRO KONTROLU PREVALENCE SYNTETICKÝCH KANABINOIDŮ

R. Čabala, M. Bursová, T. Hložek, M. Židková, M. Balíková, V. Ševčík, T. Koňák*

Ústav soudního lékařství a toxikologie

*Generální ředitelství vězeňské služby



1. LÉKAŘSKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ
NEMOCNICE V PRAZE

Obsah

- Současný stav nových syntetických drog (NSD)
- Syntetické kanabinoidy (SC)
- Metody screeningu
- Cíle projektu
- Dosažené výsledky



Současný stav nových syntetických drog (NSD)

Nové syntetické drogy (NSD)

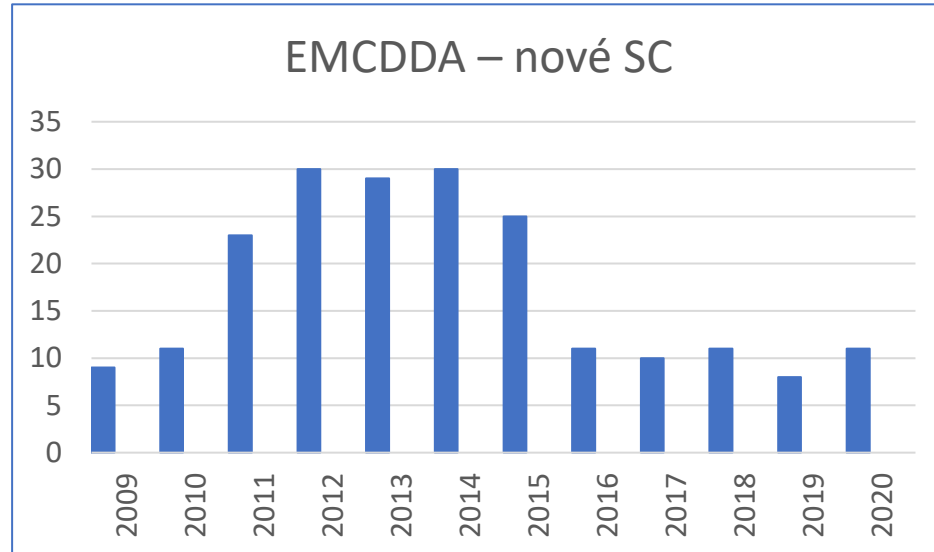
- Legal highs, herbal highs, designer drugs, Research chemicals, spice, bath salts, n > 830
- Nelegální užití s cílem obejít zákony o kontrolovaných omamných psychotropních látkách (OPL)
- Látky se stimulačními a entaktogenními účinky

Halucinogenní syntetické kanabinoidy (SC)

- Velmi dynamický vývoj (od roku 2008 identifikováno více než 169 SC)
- Agonisté endogenních kanabinoidních receptorů CB1 a CB2 - mimikují účinky THC
- Podstatně větší účinnost než fytoKANABINOIDY (THC)
- Nežádoucí účinky: psychózy, křeče, poškození tkání, srdeční zástavy a smrt
- Distribuce:
 - sprejování na inertní botanický materiál (marihuanu, šalvěj, tabák)
 - náplně do e-cigaret
 - impregnace dopisních papírů
- Nižší cena ve srovnání s marihuanou a hašišem



Syntetické kanabinoidy (SC)



EU 2019 – záchyt > 200 kg SC

Prevalence NPS 2015 - 2018 v EU

15 – 16 let	... 0,8 – 8,3 %
15 – 34 let	... 0,2 – 3,2 %
15 – 64 let	... 0,1 – 1,4 %

2020 Maďarsko – 21 úmrtí

Structural classifications of synthetic cannabinoids

Classification	Examples
Adamantoylindoles	5F-AKB-48, APICA, STS-135
Benzimidazoles	AZ-11713908, AZD-1940
Benzoylindoles	JWH-250, RCS-8
Cyclohexylphenols	CP-47,947, CP-55,940
Dibenzopyrans	JWH-051, JWH-056
Eicosanoids	AM-883, AM-1346, O-585, O-689
Hydrocarbons	JWH-171, JWH-176
Indazole carboxamides	AB-PINACA, AB-FUBINACA
Indazole-3-carboxamides	AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, PX-2, PX-3
Indole-3-carboxamides	CUMYL-BICA, CUMYL-CBMICA, Org 28312, Org 28611
Indole-3-carboxylates	FDU-PB-22, FUB-PB-22
Naphthoylindazoles	THJ-018, THJ-2201
Naphthoylindoles	JWH-007, JWH-018
Naphthoylpyrroles	JWH-398, AM-1221
Naphthylmethylindenes	AM-2201, AM-694, WIN-55,212-2
Naphthylmethylindoles	JWH-073, JWH-200
Phenylacetylindoles	JWH-167, JWH-203
Pyrazolecarboxamides	5F-AB-FUPPYCA, AB-CHFUPYCA
Pyrralobenzoxazines	WIN 55,212-2
Quinolinyne esters	PB-22, 5F-PB-22
Tetramethylcyclo-propanoylindazoles	A-796,260, A-834,735, XLR-11, XLR-12
Tetramethylcyclo-propanoylindoles	FAB-144
Tetramethylcyclo-propylindoles	UR-144, XLR-11

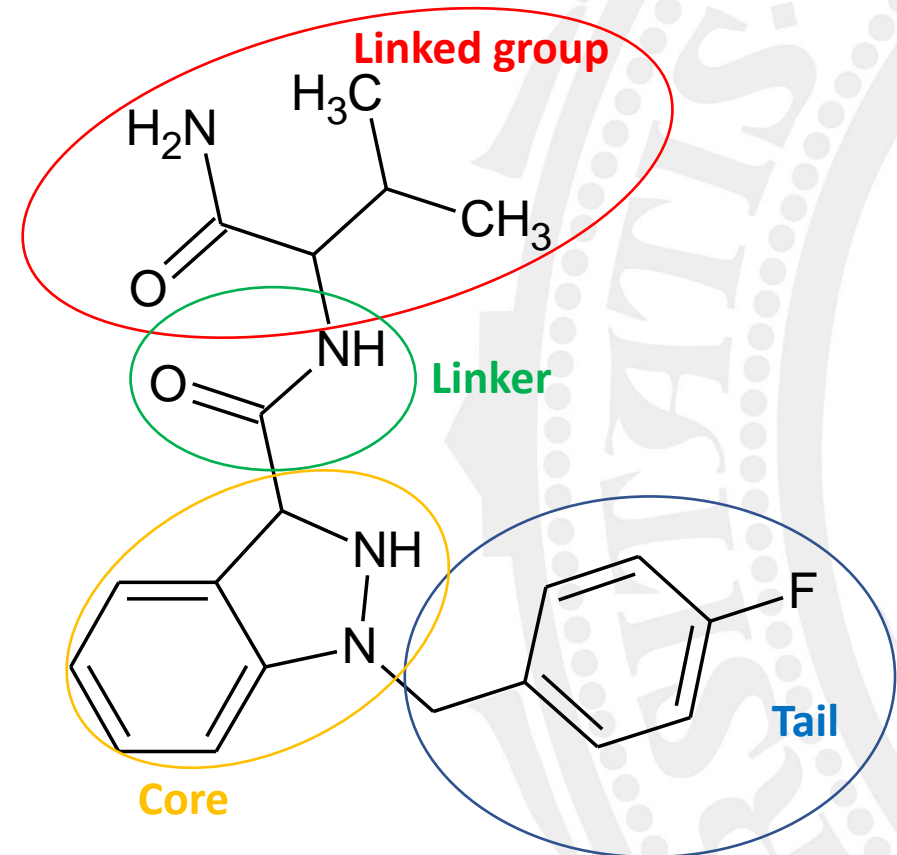
Syntetické kanabinoidy (SC) - názvosloví

JWH ... John W. Huffman
AM ... Alexandros Markiyannis
HU ... Hebrew University (Jerusalem)
CP ... Carl Pfizer

Skladba názvu: **Linked group** – **Tail** **Core** **Linker**

N-(**1-carbamoyl-2-methyl-propyl**)-1-[(**4-fluorophenyl**)methyl]
indazole-3-carboxamide

Aktuální: AB-FUBINACA
Nové jméno: MABO-FUBINACA



Postupy screeningu SC

➤ Metabolismus SC analogický přírodnímu THC

- I. fáze: tvorba především hydroxy- a dihydroxymetabolitů - jejich farmakologická aktivita není známa
- II. fáze: tvorba konjugátů (glukuronidů a sulfátů) a jejich vyloučení močí

➤ **Koncentrace** - v krvi jednotky až maximálně desítky ng/ml; rychlý pokles až k absenci původní látky (i v moči)

➤ **Orientační screening (v moči)** - imunochemické metody

- Pouze pro první generaci SC (JWH deriváty)
- Nové generace SC - nedostupné - **užití bez rizika odhalení**
- Vývoj testů pro nové třídy SC nerentabilní

➤ **GC-MS** – databáze spekter - jen původní molekuly SC, nikoliv jejich metabolity

➤ **Neznámé SC** - jednoznačná identifikace – GC-HRMS & HPLC-HRMS (Orbitrap, qTOF) - znalost přesných hmot metabolitů:

- Kazuistiky
- *in vivo* experimentální animální pokusy
- *in vitro* experimenty: lidské jaterní mikrozomy, jaterní řezy, HepaRG buňky, houba *Cunninghamella elegans*

Cíle projektu

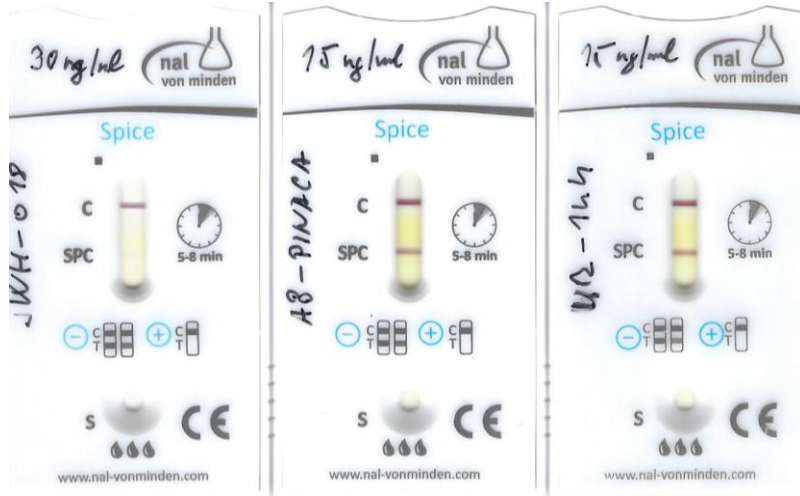
- Vytvoření certifikované metody záchytu a průkazu SC a jejich metabolitů
- Doplnění analytické databáze standardů a jejich hmotnostních spekter včetně jejich metabolitů
- Posouzení dostupných komerčních imunodetekčních souprav pro systematické testování SC
- Zpřístupnění certifikované metody, analytické databáze a dalších výstupů všem toxikologickým, policejním a celním laboratořím pro potřeby forenzně toxikologických expertíz
- Průběžné generování *in vitro* metabolitů SC
- Průběžný screening k vyhodnocení prevalence SC

Program bezpečnostního výzkumu Ministerstva vnitra ČR: Projekt VI20192022168, 2019 - 2022

Dosažené výsledky

1. Imunochemický screening

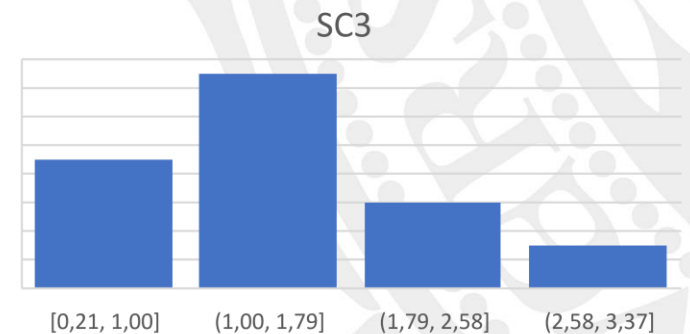
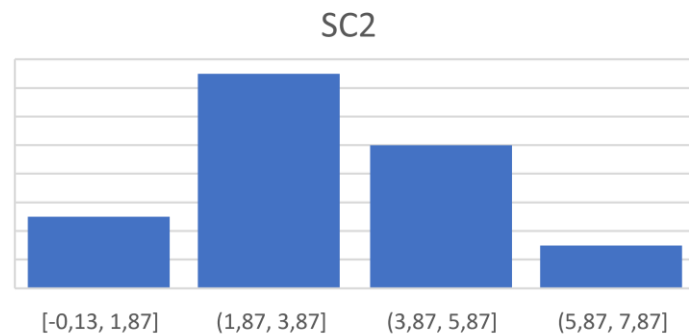
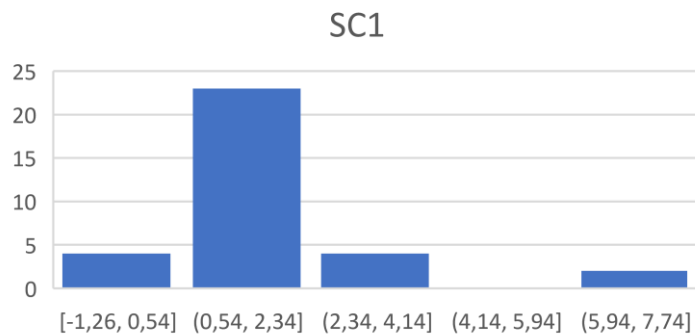
Testování imunochemických testů (kazetky)



- Drug-Screen SPC 50 ng/ml, nal von Minden
- Deklarovaná citlivost – 50 ng/ml
- V testech dosaženo vyšší citlivosti (nižší koncentrace) pro JWH-018

Testování laboratorních setů: Synthetic cannabinoids: #1 (záchyt od 20 ng/ml JWH-018), #2 (10 ng/ml UR-144), #3 (10 ng/ml AB-PINACA)

33 vzorků ze standardního provozu 2019: vazební věznice Příbram, Vinařice, Jiřice, Ruzyně, Pankrác, Světlá n.S.



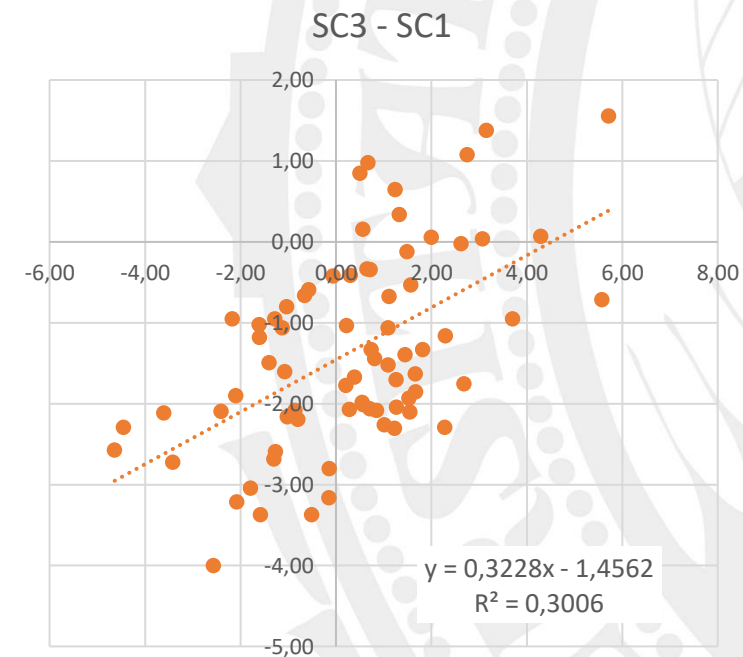
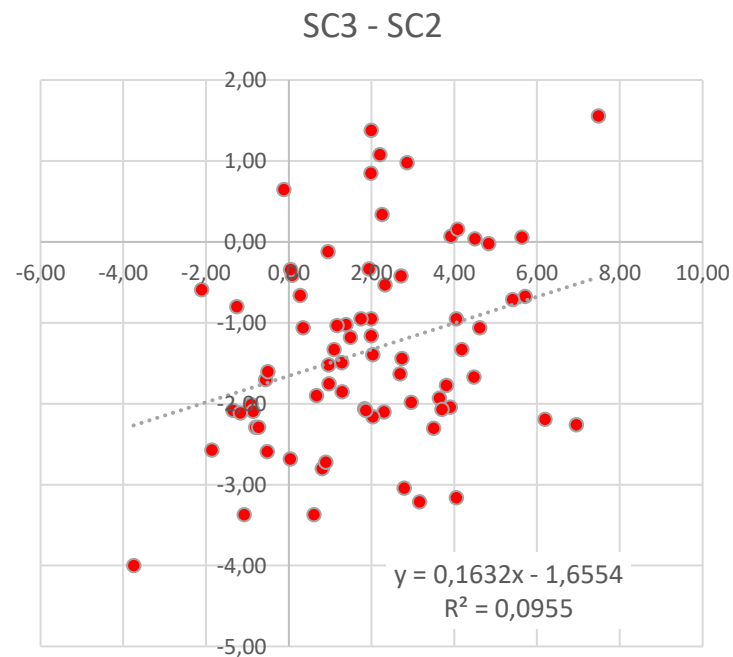
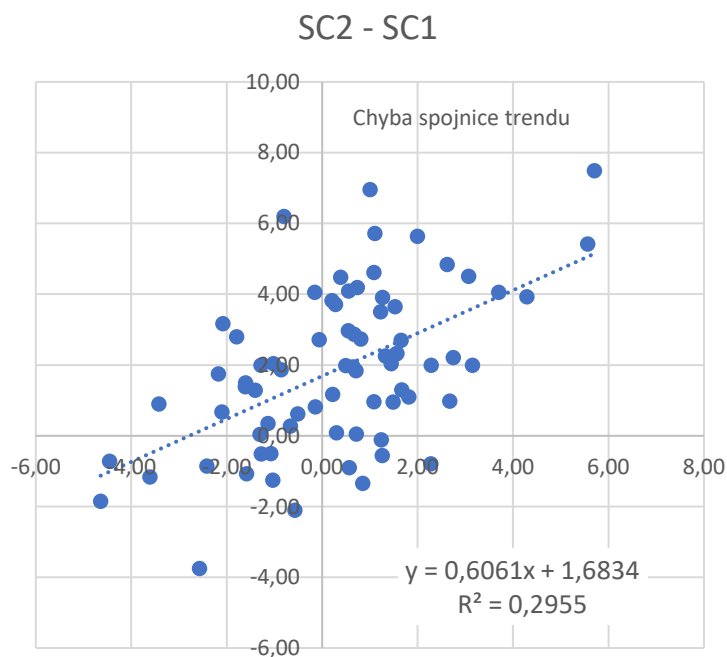
Dosažené výsledky

1. Imunochemický screening

Testování laboratorních setů

Synthetic cannabinoids: #1 (záchyt od 20 ng/ml JWH-018), #2 (10 ng/ml UR-144), #3 (10 ng/ml AB-PINACA)

74 anonymních vzorků moče (2020): nežádoucí interkorelace výsledků, výběr suspektních vzorků k další analýze



Obdobně analyzováno dalších anonymních 75 vzorků z r. 2021

Dosažené výsledky

2. Pořízení nových SC

2019

5-Fluoro-APINACA
AB-CHMINACA
ADB-FUBINACA
FDU-PB-22
FUB-PB-22
MDMB-CHMICA
(S)-5F-MDMB-PINACA
(S)-AB-FUBINACA
(S)-ADB-CHMINACA
UR-144

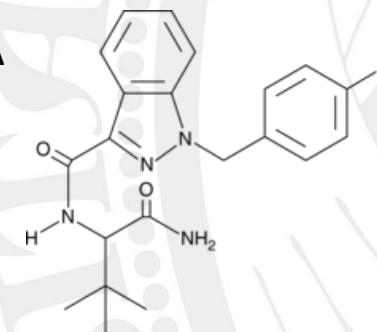
2020

MDMB-CHMINACA
APP-BUTINACA
CI2201 (JWH 398)
CUMYL-CBMICA
ADB-BUTINACA
2-Fluoro QMPSB
5-Fluoro-7-APAICA
AB-CHMINACA metab M1A
AB-CHMINACA metab M1B
AB-CHMINACA metab M2
AB-CHMINACA metab M3A
MDMB-CHMICA metabolite M2
UR-144 N-pentanoic acid metab.
(+)-UR-144 N-(4-hydroxypentyl) metab
UR-144 N-(5-hydroxypentyl) metab.
UR-144 N-(2-hydroxypentyl) metab.
MAB-CHMINACA metab. M1

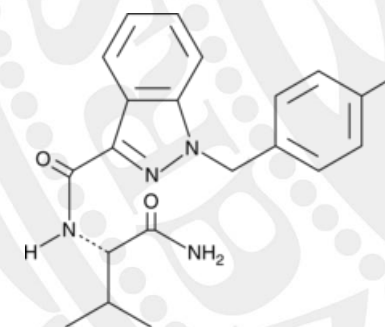
Plán 2021

4-Cyano Cumyl-BUTINACA
5-Fluoro MN-24
(S)-MMB-FUBINACA
a další ...

ADB-FUBINACA



AB-FUBINACA



Dosažené výsledky

3. *In vitro* inkubace SC (Katedra biochemie, FF UK Hradec Králové) - Identifikace a kvantifikace metabolitů xenobiotika

A. Jaterní řezy (precizní tkáňové řezy)

- Nezbytnost čerstvé tkáně
- Finanční náročnost celého zařízení
- Problematické dlouhodobé uchovávání

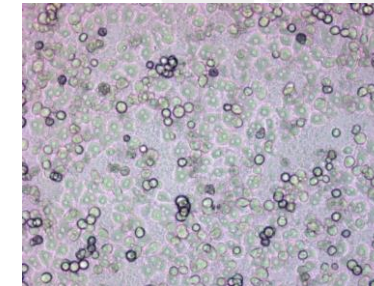
B. Izolované hepatocyty

- Zachování celistvosti buněk
- Možnost (omezená) pracovat i s lidskými vzorky
- Nezbytnost většího kousku čerstvé tkáně
- Problematické dlouhodobé uchovávání



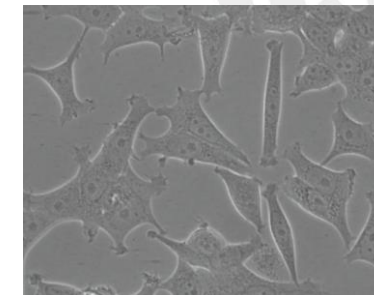
C. Subcelulární frakce jaterního homogenitu – Mikrosomy

- Nejrozšířenější *in vitro* systém
- Možnost dlouhodobého uchovávání
- Možnost práce s lidskými vzorky
- Porušení celistvosti buňky – ztráta přirozených podmínek
- Multienzymový systém (Cytochromy P450 a b5, NADPH-CYP-reduktasa, Flavinové monooxygenasy, Hydroxysteroiddehydrogenasy, UDP-glukuronosyltransferasy, Glutathion-S-transferasy, Esterasy)



D. Buněčné linie – HepaRG buňky

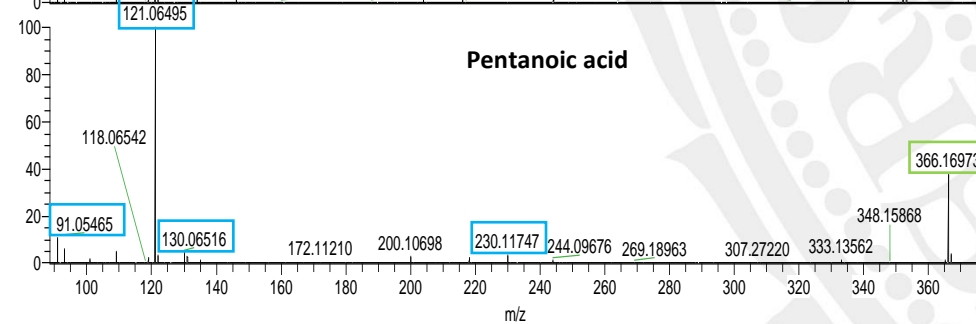
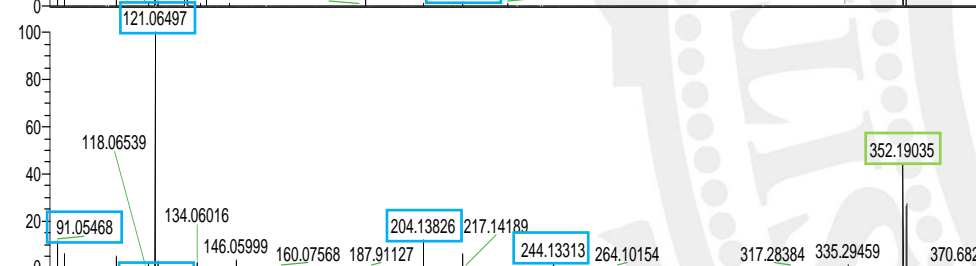
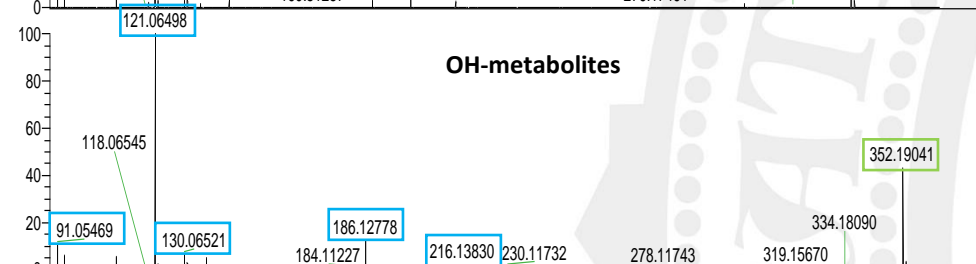
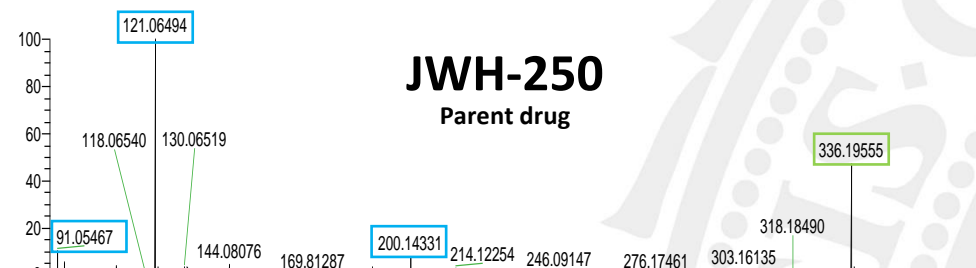
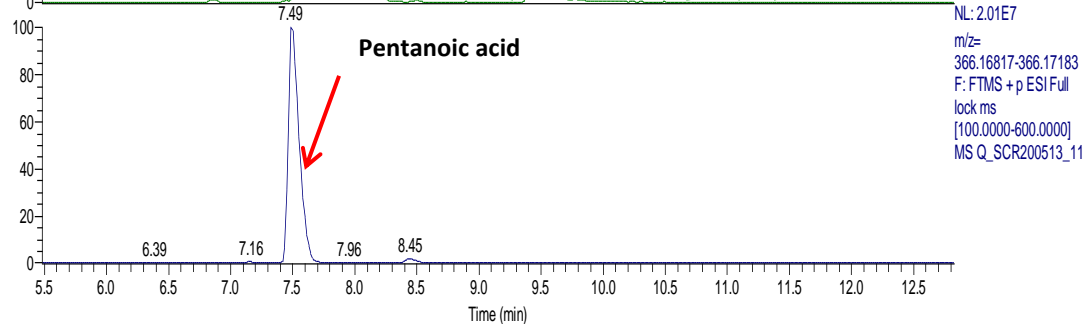
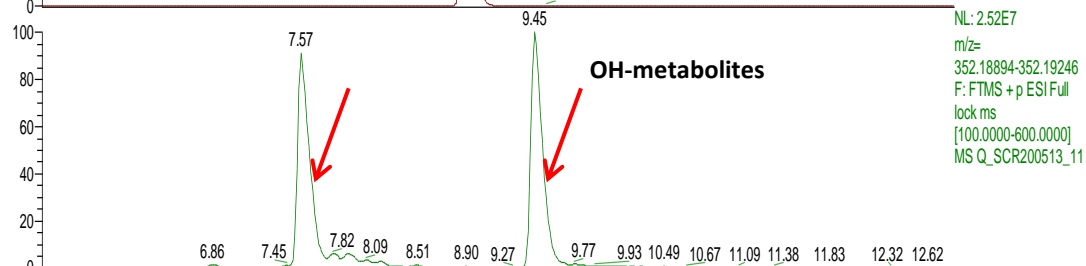
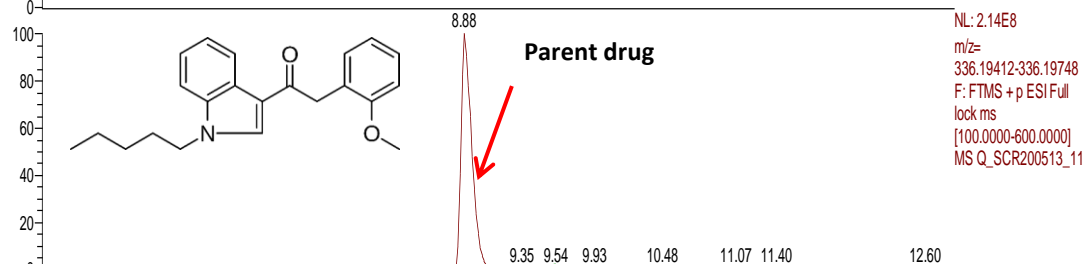
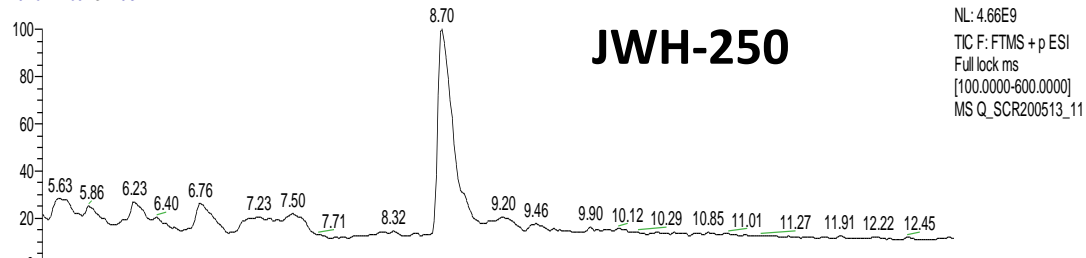
- Alternativa hepatocytů (HepG2, HepaRG)
- Model nádorové tkáně
- Kultivace neomezená časově
- Většinou neodpovídá normálním buňkám - změny v zastoupení i aktivitě enzymů



Dosažené výsledky

3. a 4. Pořízení nových SC – doplňování databáze MS spekter SC a jejich metabolitů

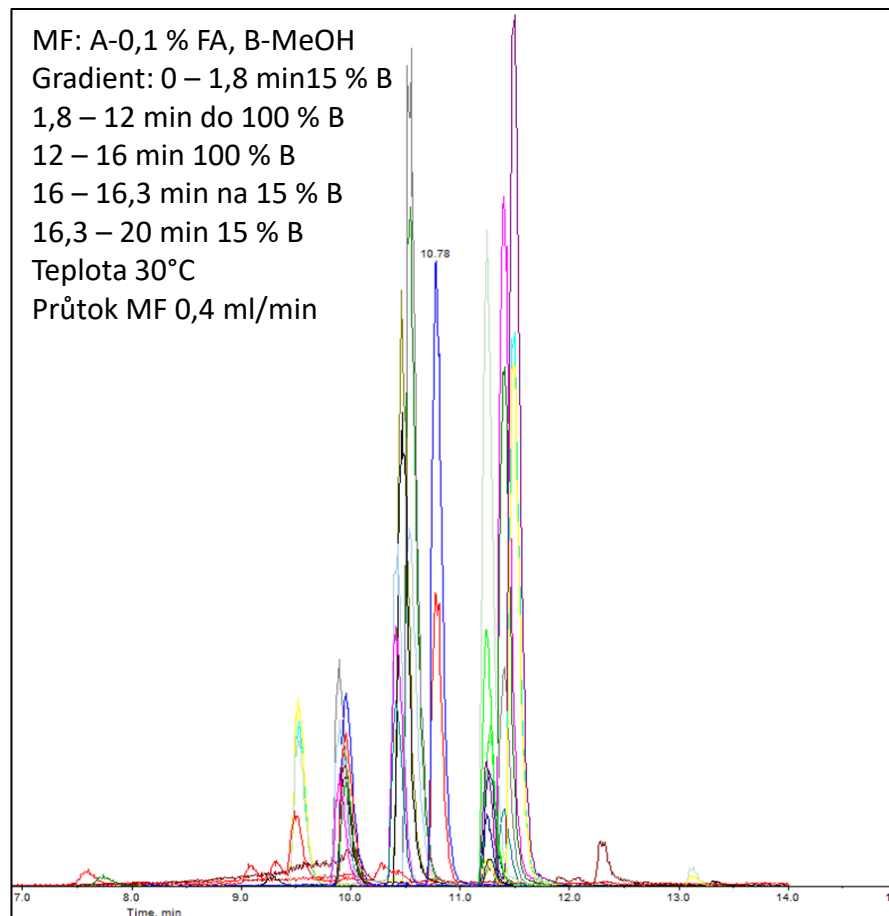
RT: 5.48 - 12.83 SM: 5G



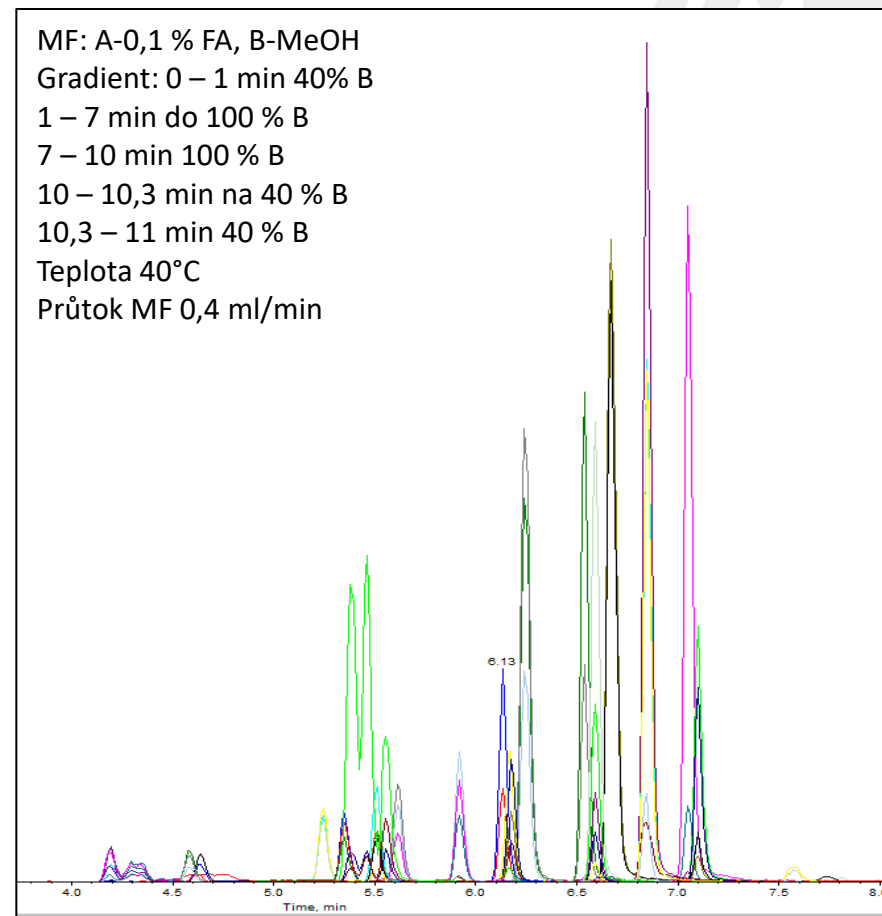
Dosažené výsledky

5. Vývoj screeningové metody SC – HPLC-MS/MS analýza 23 SC a jejich metabolitů

Kolona Accucore Phenyl Hexyl 2,6 μm , 100 x 2,1 mm



Kolona Kinetex Bifenyl 2,6 μm , 50 x 2,1 mm

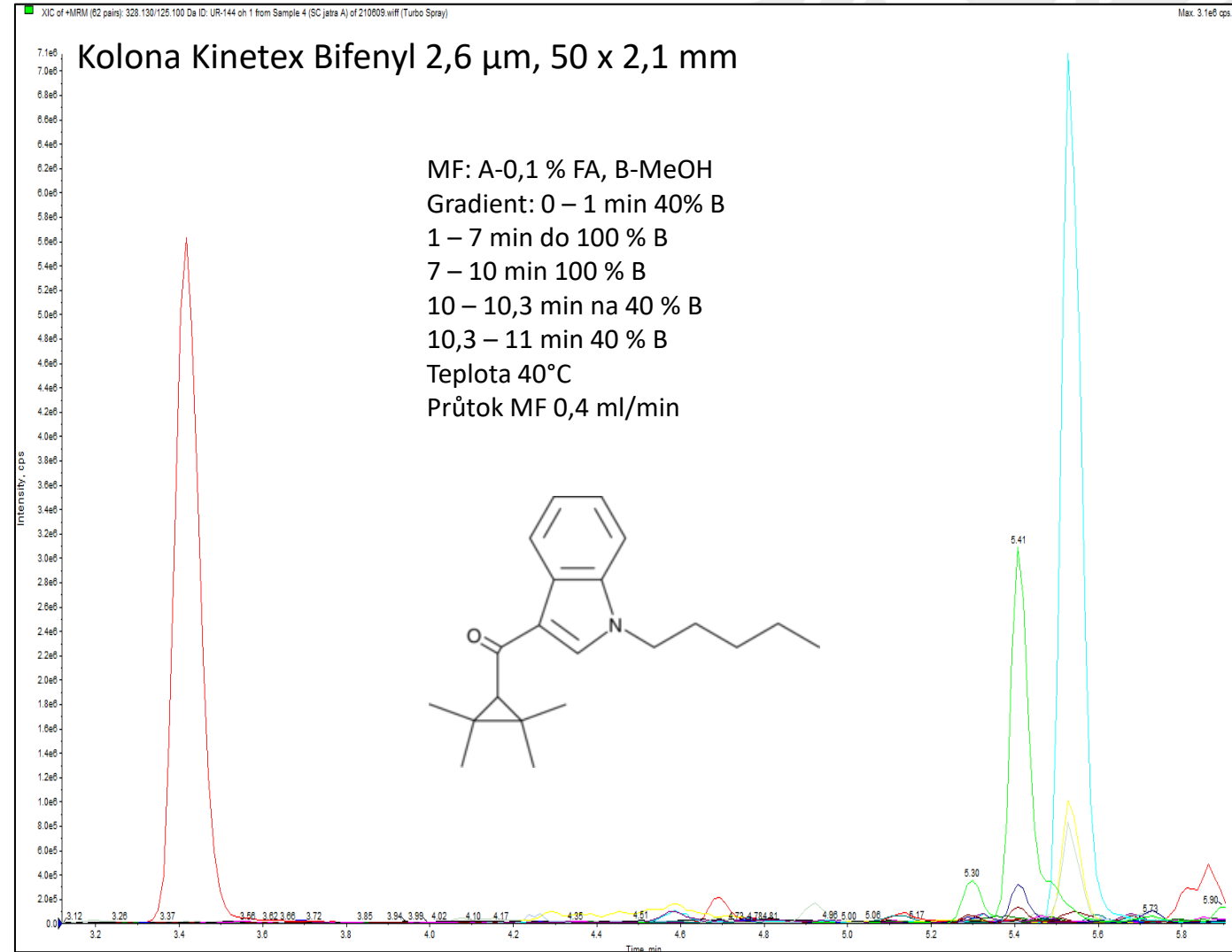


Dosažené výsledky

6. Vývoj screeningové metody SC – HPLC-MS/MS analýza UR-144 a jeho metabolitů

Pokus na potkanovi – test metody

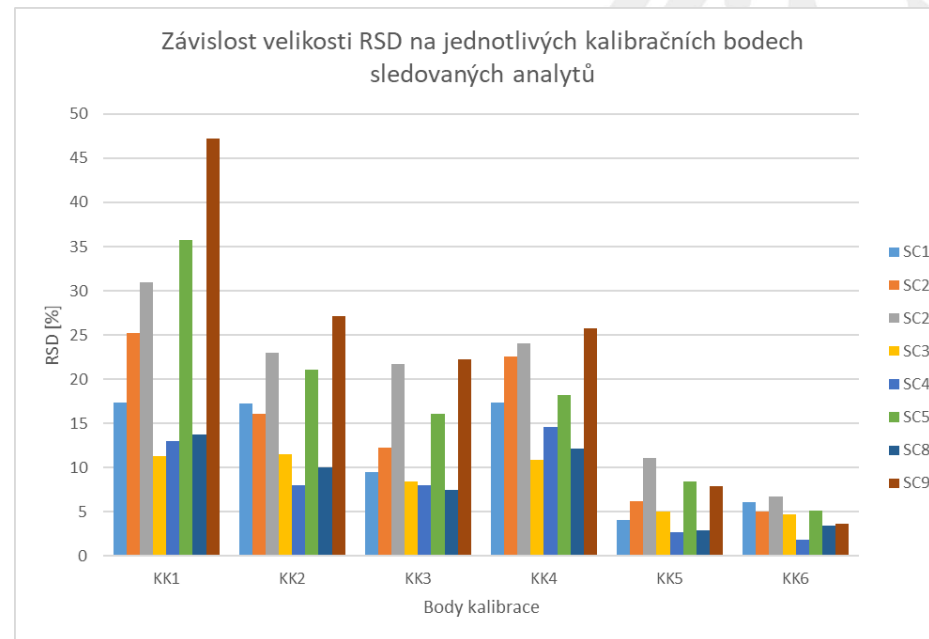
- Dávka 2 mg UR-144/kg podána laváží v oleji do žaludku
- Odběr biologického materiálu - jater po 8 hod
- Játra homogenizována, centrifugována, supernatant odpařen a rozpuštěn v MF
- Analýza screeningovou metodou HPLC-MS/MS
- Potvrzeny původní látka a 4 metabolity:
 - UR-144 N-pentanoic acid metab.
 - (+-)-UR-144 N-(4-hydroxypentyl) metab.
 - UR-144 N-(5-hydroxypentyl) metab.
 - UR-144 N-(2-hydroxypentyl) metab.



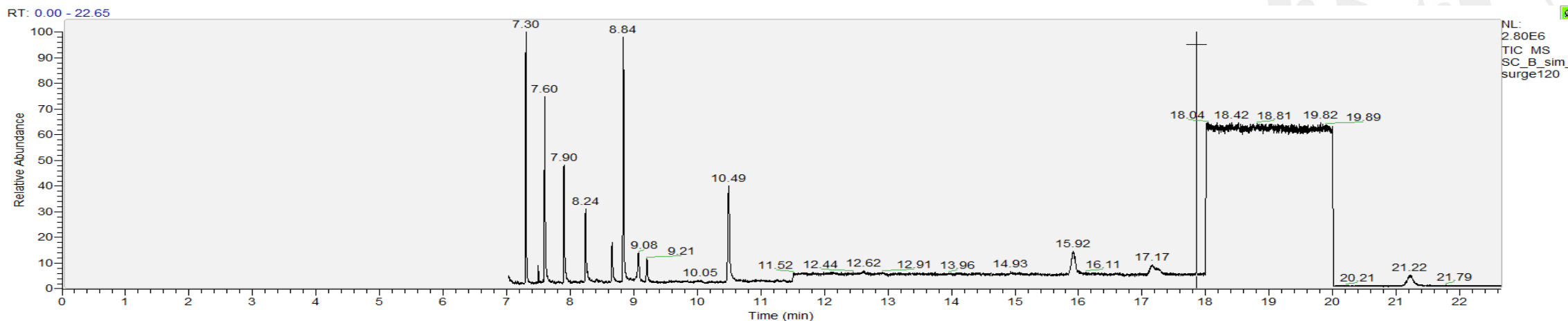
Dosažené výsledky

7. Vývoj screeningové metody SC – GC-MS/MS analýza SC a jejich metabolitů

Označení	Analyt	Retenční čas	Sledované m/z
SC3	UR-144	8.83	214; 143.8; 311.2; 296.2
SC8	5F-MDMB-PINACA	10.49	233; 289.1; 321.1; 318.2
SC1	MDMB-CHMICA	15.9	240.1; 143.8; 328.2; 384.3; 245.1
SC10	ADB-CHMINACA	17.15	326.2; 241.1; 144.9
SC2	AB-CHMINACA	17.25	326.2; 241.1; 144.9; 312.2
SC5	ADB-FUBINACA	18.79	338.1; 253; 377
SC9	AB-FUBINACA	19.04	324.2; 377; 253
SC4	5F-APINACA	21.22	355.2; 233.1; 294.2



GC-MS: Kolona Rxi-17MS (20 m x 0,18 mm x 0,18 μ m)
Splitless, SIM, koncentrace cca 1100 ng/g



Dosažené výsledky

8. Vývoj screeningové metody SC – Návrh SOP HPLC-MS/MS screeningové metody – příprava na certifikaci

 **VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE V PRAZE**
U Nemocnice 499/2, 128 08 Praha 2 | www.vfn.cz, http://intranet.vfn.cz
Ústav soudního lékařství a toxikologie – pracoviště toxikologie
Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2

Standardní operační postup | SOP-USLTOX-004 | strana 6 z 9 | verze 1

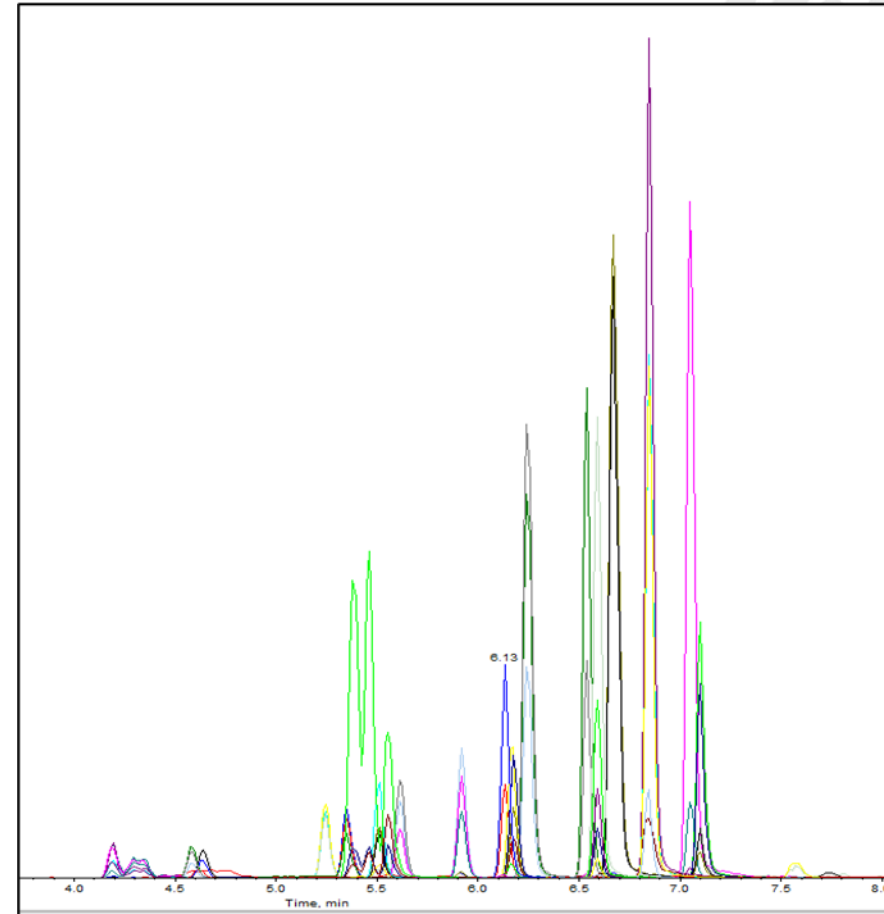
KONFIRMACE SYNTETICKÝCH KANABINOIDŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU METODOU LC-MS/MS

Tabulka 1. Seznam syntetických kanabinoidů s jejich MRM přechody

Analyt	Přechod	Přechod	Přechod	Přechod
5-F-PINACA (5F-ADB)	377,4	318,2	233,1	145,0
FDU-PB-22	395,4	252,1	109,1	
ADB-CHMINACA	370,5	241,1	145,0	
9AB-FUBINACA	368,4	324,1	253,1	109,0
FUB-PB-22	396,4	252	109,1	224,0
UR-144	311,4	295,2	125,1	214,1
AB-CHMINACA	356,4	241,1	312,2	145,2
MDMB-CHMICA	384,5	240,1	144,1	116,1
SF-APINACA	383,5	135,1	107,0	105,1
ADB-FUBINACA	382,4	338,1	253,1	109,1
AB-CHMINACA-M1A	372,5	328,2	257,1	145,1
MDMB-CHMICA-M2	370,5	240,1	144,0	116,0
AB-CHMINACA-M2	357,5	241,1	312,2	145,0
AB-CHMINACA-M3A	373,5	257,1	145,1	239,1
MAB-CHMINACA-M1	386,5	257,1	342,1	145,1
ADB-BUTINACA	330,4	201,1	286,1	145,0
MDMB-CHMINACA	385,5	241,1	326,1	145,1
APP-BUTINACA	364,4	201,1	320,1	145,1
UR-144-N-(4-HYDROXYPENTYL) METABOLIT	327,5	125,1	97,2	
UR-144-N-(2-HYDROXYPENTYL) METABOLIT	327,5	125,1	230,1	144,1
UR-144-N-(5-HYDROXYPENTYL) METABOLIT	327,5	125,1	97,2	
AB-CHMINACA METABOIT M1B	372,5	328,1	239,1	145,1
UR-144-N-PENTANOIC ACID METABOLIT	341,5	125,1	97,2	144,0

Dokument zobrazený na intranetu VFN je řízen správcem dokumentace pracoviště.
Po vytištění slouží pouze pro informativní účely – nepodléhá pravidlům řízení dokumentace.

Kolona Kinetex Bifenyl 2,6 μm , 50 x 2,1 mm



Dosažené výsledky

9. Pravidelné rešerše literatury

Hledaný termín na Google Scholar – ***Synthetic Cannabinoids***

Publikováno článků: 2019: **4280** 2020: **4100** 2021: **2200**

Pravidelný výběr relevantních článků přes licence UK: např.

Pruntha Yoganathan, Hugh Claridge, Lucy Chester, Amir Englund, Nicola J. Kalk, and Caroline S. Copeland

Synthetic Cannabinoid-Related Deaths in England, 2012–2019

Cannabis and Cannabinoid Research - Ahead of Print

Published Online: 24 Feb **2021**, DOI: 10.1089/can.2020.0161

Atasoy, A.; Daglioglu, N.; Gören, İ. E.; Girisbay, A.; Aslan, R.; Akgur, S. A.

Determination of Synthetic Cannabinoids in Randomly Urine Samples Collected from Probationers in Turkey

Forensic Science International **2021**, 322, 110752, DOI: 10.1016/j.forsciint.2021.110752

Poděkování

Kolektiv řešitelů děkuje Univerzitě Karlově, Generálnímu ředitelství vězeňské služby a Ministerstvu vnitra ČR za finanční podporu

a

Vám za zájem a pozornost.