

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

KÖRMÖCZI Tímea**

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszeranalitikai Intézet,
Somogyi utca 4., 6720 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A bioanalitika az analitika biológiai minták analizisével foglalkozó tudományterülete, amely magába foglalja a felvetett biológiai kérdés megválaszolásához szükséges analitikai módszer megtervezését, a mintavételt, a mintaelőkészítést, a módszerfejlesztést, validálást, az analitikai mérés végrehajtását és legvégül a kapott adatok kiértékelését és értelmezését.

A 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), melyek különböző biokémiai folyamatokban vesznek részt és alakulnak át. Kutatásunk az „omikák” tudományterületén belül az anyagcsere kis molekulatömegű termékeivel, azaz a metabolitokkal foglalkozó metabolomikára, valamint gyakran a metabolomika részeként emlegetett, a sejtekben, szövetekben és biológiai folyadékokban található lipidek összességét vizsgáló lipidomikára terjed ki.

A bioanalitika egyik legelterjedtebb kapcsolt technikája a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS). Napjainkban széles körű elterjedése figyelhető meg a gyógyszerkutatás, igazságügy, élelmiszeripar, népegészségügy, az orvos-biológiai kutatások (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 mérése során a nagyszámú komponensek koelúciója megnehezítheti azok minőségi és mennyiségi meghatározását. Ezekre megoldást nyújthat az offline vagy online kétdimenziós folyadékkromatográfias módszerek alkalmazása (2D-LC), amely két kromatográfias rendszer összekapcsolását jelenti.

Munkánk során célunk volt egydimenziós és online kétdimenziós LC-MS bioanalitikai módszerek kifejlesztése, melyek alkalmazása olyan orvos-biológiai kérdések megválaszolására nyújt lehetőséget, mint a szorongásos megbetegedés állatmodelljének lipidomikai megközelítésű

vizsgálata, a dimetiltriptamin (DMT) koncentrációjának meghatározása patkány agyban és vérplazmában kiváltott iszkémia esetében, valamint az egyik legújabb szintetikus kannabinoid (4F-MDMB-BICA) metabolitjainak azonosítása a fogyasztás tényének megállapításához. A kísérleti eredmények bemutatása több részre tagolódik a kidolgozott analitikai módszereknek és témáknak megfelelően, melyekben az eredmények bemutatása mellett röviden ismertetem a módszerfejlesztést és a hozzá kapcsolódó orvos-biológiai problémafelvetéseket.

2. Eredmények

2.1. A szorongó és nem szorongó egerek vérplazma foszfolipidjeinek vizsgálata gyors HILIC-HRMS módszerrel

A pszichiátriai rendellenességek egyik leggyakoribb zavar a szorongás, mely betegség kialakulása nem teljesen tisztázott. Azonban a sejtmembránt alkotó foszfolipidek (glicerofoszfolipidek és szfingofoszfolipidek) meghatározó szerepet játszanak a betegség kialakulásában¹. A foszfolipidek amfipatikus tulajdonságúak, egyrészt egy poláris fejcsoportból, másrészt pedig apoláris zsírsav lánc(ok)ból állnak. Munkánk során célul tűztük ki egy átfogó, gyors analitikai módszer kidolgozását, mely alkalmas a foszfolipid osztályok elválasztására vérplazmából.

Az általunk alkalmazott hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfias elválasztás (HILIC) esetén a retenciót főként a poláris fejcsoportok hidrofil tulajdonságai határozzák meg². A mintaelőkészítés során egy ammónium-formiáttal módosított Folch extrakciót alkalmaztunk annak érdekében³, hogy a lizofoszfátidil-kolin (LPC), foszfátidil-kolin (PC), lizofoszfátidil-etanolamin (LPE), foszfátidil-etanolamin (PE) és szfingomielin (SM) osztályokhoz tartozó specíesek formiát ionnal képzett kvázi molekulaionjait detektálni tudjuk negatív ionizációs módban. A módszer kidolgozáshoz és a relatív mennyiségi meghatározáshoz belső standardként 10 foszfolipid osztályt lefedő nem endogén foszfolipid keveréket alkalmaztunk. A mintaelőkészítés visszanyerése átlagosan 78% volt, míg a mátrixhatás 84–99% közé esett, mely mutatja a mérsékelt ionel-

* Körmöczi Tímea azonos című PhD értekezéséhez kapcsolódó tézisfüzet alapján készült.

** Tel.: +36 62 545 925, e-mail: kormoczi.timea@szte.hu

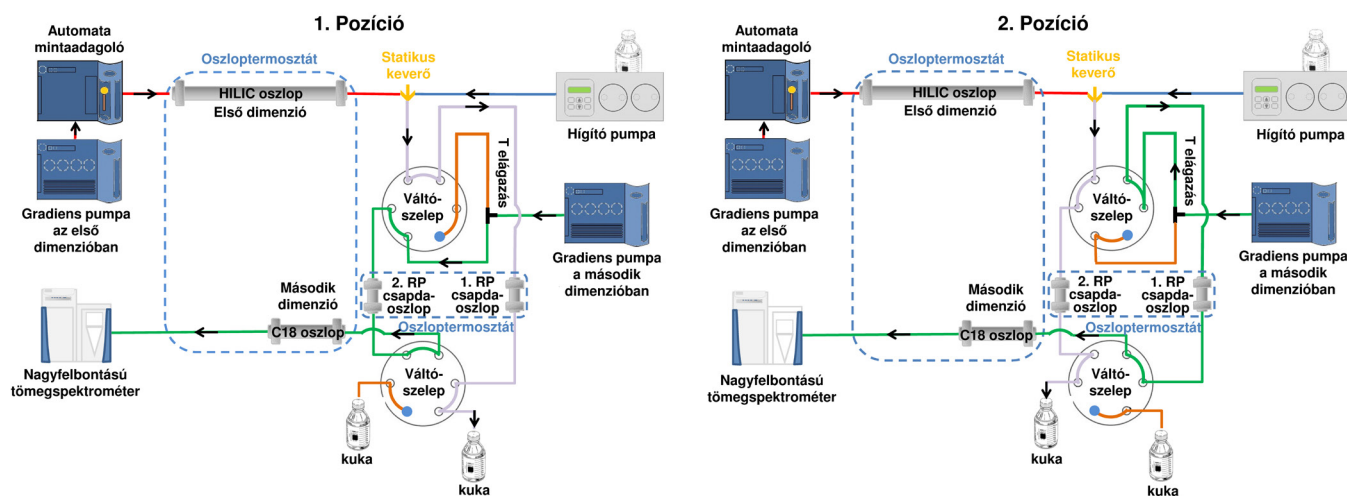
nyomó hatást az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) során. Kivételt ez alól a foszfatidil-serin (PS) jelentett, ahol a mátrixban található, vele együtt eluálódó komponensek feltételezhetően csökkentik a mozgófázis felületi feszültségét, ezáltal javítják a porlasztás hatékonyságát, valamint segítik a PS standard deprotonálódását folyadék-gázfázisban. A kidolgozott HILIC- nagy felbontású tömegspektrometriás (HRMS) módszerünket végül 8 szorongó és 8 nem szorongó egér vérplazma foszfolipid tartalmának összehasonlítására alkalmaztuk.

A kidolgozott HILIC-HRMS módszerrel összesen 130 endogén foszfolipidet azonosítottunk. Meghatároztuk az egyes foszfolipid osztályok összmennyiségét és a szorongó és nem szorongó egereknél kapott értékeket összehasonlítottuk. Mindegyik foszfolipid osztályra elmondható, hogy a szorongó egerekben nagyobb mennyiségben fordultak elő a nem szorongó egyedekhez képest. A SM, LPC, LPE és foszfatidil-inozitol (PI) foszfolipid osztályok esetében szignifikáns különbség volt megfigyelhető. Az eredmények statisztikai kiértékelését követően igazoltan elkülönül a szorongó és nem szorongó egerek csoportja, míg az OPLS-DA eredményekkel alátámasztottuk, hogy a különbséget a két csoportban szignifikánsan különböző foszfolipidek adják. Az S-diagram segít értelmezni az OPLS-DA eredményeit, mutatta a lehetséges alul- és felül szabályozott biomarkereket. 35 foszfolipid volt szignifikánsan különböző a két egércsoport vérplazmájában, melyek közül csupán két komponens, a PC 38:4 és a PC 42:6 volt alacsonyabb szabályozású a szorongó egerekben⁴.

2.2. A szorongó és nem szorongó egerek három agyterületének foszfolipid vizsgálata online átfogó 2D-UHPLC-HRMS módszerrel

Az előző pontban említett foszfolipidek vizsgálatára több mérési lehetőség áll a rendelkezésünkre. Az agy komplex

összetétele miatt egy online átfogó kétdimenziós rendszert dolgoztunk ki (1. ábra). Az első dimenzióban a főbb foszfolipid osztályok HILIC elválasztását követően az adott frakció foszfolipid komponenseinek gyűjtése egy fordított fázisú (RP) csapdaoszlopon történt. A csapdaoszlop alkalmazása lehetőséget nyújt a foszfolipidek dúsítására a komplex mátrixból, melynek eredményeként keskeny csúcsokat kapunk a második dimenzióban, ellentétben a hurok esetében tapasztalt csúcsszélesedő hatással. További előnye, hogy nincs térfogati megkötés, illetve a hurok esetében tapasztalt oldószer összeférhetlenséget is csökkenteni lehet^{5,6}. A második dimenziós C18 állófázis alkalmazásával, az azonos osztályhoz tartozó foszfolipidek kromatográfiás visszatartását a zsírsavláncok száma és hossza, valamint a kettős kötések száma és elhelyezkedése befolyásolja², így a második dimenzióban az adott foszfolipid osztályba tartozó egyes foszfolipid komponensek elválasztása történt, melyet HRMS detektálás követett. A kétdimenziós módszerünk valójában két módszerből állt, a két pozíciónak és a szeleppállásoknak megfelelően. Az 1. Pozícióban amíg az első dimenzió mozgófázisa az 1. RP csapdaoszlopon dúsul, addig párhuzamosan a 2. RP csapdaoszlopon a korábban már csapdázódott foszfolipid osztályok elválasztása és detektálása történik a második dimenzióban (1. ábra). A 2. Pozícióban az 1. RP csapdaoszlopon dúsított foszfolipidek elválasztása és detektálása történik. Az első dimenziós kromatográfiás mozgófázisát 5 frakcióra szedtük, mely frakciók második dimenziós elválasztása során ugyanazt a gradiens programot alkalmaztuk annak érdekében, hogy azonos kromatográfiás körülményeket biztosítsunk az egymáskövető két HILIC frakcióban jelenlevő PC és PS speciestek számára. A mérések során két analitikai módszert használtunk, amelyek csak a szeleppállásokban különböztek. Erre a páratlanszámú frakciók miatt volt szükség, így az adott mérés utolsó frakciója és a következő mérés első frakciója nem ugyanazon a csapdaoszlopon dúsult.



1. ábra. Az online átfogó 2D-UHPLC-HRMS rendszer sematikus ábrája a két szeleppállásban.

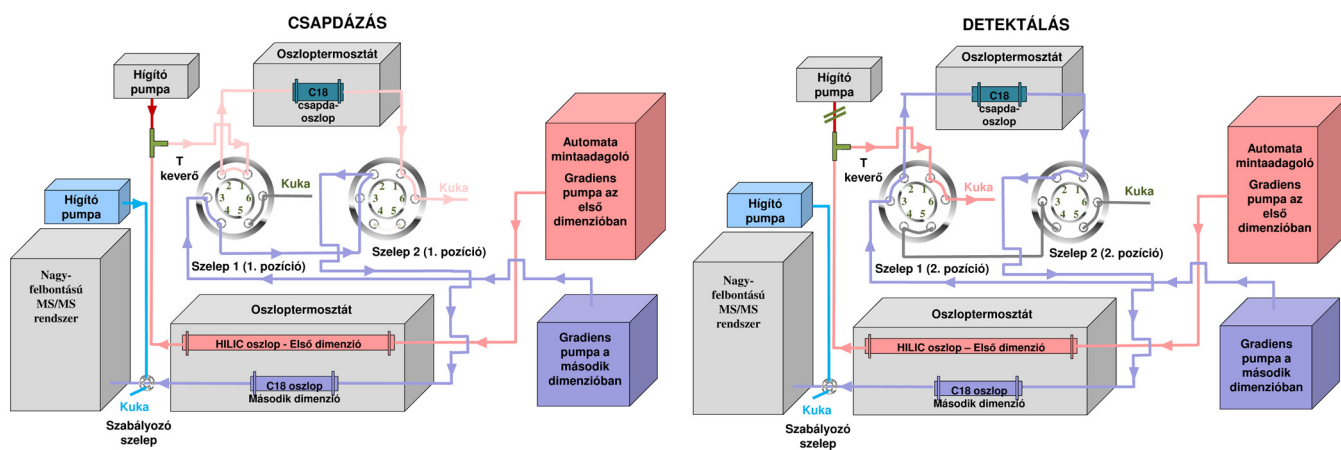
Rágcsálókön végzett korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a prefrontális kéreg, a hippocampus, az amygdala, a BNST és a talamusz meghatározó szerepet játszhat a fenyegetés észlelésében, a szorongás feldolgozásában és a válaszreakció kivitelezésében, melyek az evolúció során tovább öröklődnek és hasonló szerepet tölthetnek be az ember esetében is¹. A vérplazma mintaelőkészítés során alkalmazott módosított Folch extrakció átlagos visszanyerésének 85% feletti értéke egy hatékony extrakciós módszerre utal. A mátrixhatás átlagos értékei 63-88% között mozogtak, ami elfogadható ionelnyomó hatás, tekintettel az agyszövet összetettségére. Feltételezésünk szerint a szorongó és nem szorongó egerek agyi foszfolipid összetételében különbség lehet, melynek igazolására az új online átfogó 2D módszerünket alkalmazva, 8 szorongó és 9 nem szorongó eger 3 agyrégióját (prefrontális kéreg, ventrális hippocampus, dorzális hippocampus) hasonlítottuk össze.

A mérések során 151 endogén foszfolipidet azonosítottunk. Eredményeink alátámasztják azt a megállapítást, hogy az idegszövetek nagy mennyiségben tartalmaznak plazmánsavat és plazmánsavat, amelyeknél a glicerinváz első szénatomján lévő észter kötés helyett éter vagy vinil-éter kötés található⁷. A plazmalógének és éter-analógok döntően a PE és PC osztályokban voltak jelen. A kapott adatokat statisztikailag értékeltük ki, mely során igazoltuk, hogy az egyes agyi régiók foszfolipid osztályai eltérnek-e a szorongó és nem szorongó egyedek között. Jelentős különbséget figyeltünk meg 4 foszfolipid osztály esetén 2 agyrégióban. A PE jelentősen csökkent a szorongó egerek ventrális hippocampusában. Hasonló tendenciát vettünk észre a PS esetében a prefrontális kéregben, azonban a lizofoszfátidil-glicerín (LPG) és foszfátidsav (PA) növekedést mutatott a nem szorongó egerekhez képest. A többváltozós statisztikai adatelemzést követően igazoltuk, hogy a szorongó és nem szorongó egerek agyi foszfolipid összetétele elkülönül egymástól. A három agyterület 151 vizsgált foszfolipidje közül 37 foszfolipid esetében szignifikáns különbséget figyeltünk meg, melyek közül csak a PE 40:5 mutatott szignifikáns, de eltérő irányú változást az összes vizsgált agyrégióban⁸.

2.3. Endogén és exogén DMT koncentrációjának hatékonyabb meghatározása egy új, célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszerrel

A DMT egy indol alkaloid vegyület, mely természetes módon megtalálható több növényben és állatban. Az endogén DMT bioszintéziséhez például INMT N-metiltranszferáz enzimre van szükség. Feltételezések szerint, ahol INMT enzim található, ott DMT is⁹. Azonban az endogén DMT jelenléte és fiziológiai szerepe a mai napig vita tárgyát képezi¹⁰. A kísérleti rágcsálókba beadott magasabb mennyiségű DMT csökkentette az agyi infarktust¹¹, valamint humán agykéreg neuron sejtenyésztésben elősegítette a sejtek túlélését¹². Kutatásunk során céljaink között szerepelt az intravénás infúzióval bejutott DMT iszkémiás körülmények során bekövetkező koncentrációjának nyomon követése patkány agy- és vérplazma mintákban. A mennyiségi meghatározáshoz egy gyors célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS módszert dolgoztunk ki. További céljaink között szerepelt, hogy a kidolgozott érzékeny módszerrel igazolni tudjuk az endogén DMT jelenlétét.

A 2. ábrán látható a 2D módszer két szeleppállásához tartozó sematikus ábra. Csapdázáskor mindkét váltószelep 1. pozícióban van. A csapdázás során az első dimenzió HILIC elválasztása során a DMT és a belső standardként használt alfa-metiltriptamin (AMT) a RP csapdaoszlopon dűsul. Ezt követően mindkét váltószelep a 2. pozícióba fordul, azaz a csapdaoszlopon dűsult komponensek a második dimenzió RP oszlopára eluálódnak, megtörténik a második dimenziós elválasztás és HRMS/MS detektálás. Ahhoz, hogy ortogonális elválasztásunk hatékony legyen, csökkentenünk kell az első oszlop mozgófázisának eluens erősségét, így mindkét vegyület a csapdaoszlopon tud dűsulni. Az első oszlop mozgófázisát egy hígító pumpa segítségével hígítottuk, majd különböző áramlási sebességek mellett vizsgáltuk a csapdázás hatékonyságát. Kezdetben RP-ban kis eluens erősséggel rendelkező 0,1% hangyasav vizes oldatát használtuk 1 ml/perc áramlási sebesség mellett, mely alacsony csapdázási hatékonyságot eredményezett. A hígító



2. ábra. Az online célzott 2D-UHPLC-HRMS/MS rendszer sematikus ábrája csapdázáskor és detektáláskor

eluens áramlási sebességének további növelése (2, 2,5 és 3 ml/perc) csak kis mértékben csökkentette a két vegyület visszatartását. A magas vizes oldószertartalom mellett tapasztalt alacsony csapdázási hatékonyság a DMT (pK_s : 8,68) és az AMT (pK_s : 9,96) savi disszociációs állandójával magyarázható. Az alkalmazott hangyasavas eluens 2,7-es pH-ja mellett a vizsgált komponensek protonált formái dominálnak, amelyek RP elválasztás során alacsony visszatartással rendelkeznek. Ezért a protonált forma visszaszorításával a csapdázási hatékonyság javítható. A drámai javulást (DMT: +57000%, AMT: +5577%) a hígítószer pH-jának növelésével (pH 10,2) érték el. A második dimenzióban a vizsgált komponensek azonos retenciós idővel, keskeny szimmetrikus csúcsokkal eluálódtak. A vizsgált komponens és a belső standard azonos retenciós ideje megbízhatóbb mennyiségi eredményeket biztosít, hiszen az ionizáció során a mátrixalkotók egységes hatást gyakorolnak a vizsgált vegyületekre. Az eddig ismert irodalmi adatok alapján elmondható, hogy az általunk kidolgozott 10 perces teljes futási idejű módszer gyorsabb, mint az irodalomban megtalálható egydimenziós LC-MS/MS módszerek, amelyek a DMT mennyiségét vizsgálták agyban és plazmában. Mivel a 2D-LC technikával a mátrixhatás csökkenthető, egy egyszerű folyadék-folyadék extrakciós mintaelőkészítést dolgoztunk ki, melynek visszanyerés hatékonysága a DMT-re nézve 20-30%-kal jobbnak bizonyult, mint az irodalomban eddig leírt tanulmányok^{13,14}. A HRMS/MS mérés során tapasztalt magas ionizációs fok a pozitív mátrixhatás értékeknek köszönhető. A 0,108 ng/ml-es kimutatási határt (LOD) 50 μ l vérplazma feldolgozásával érték el, ami lényegesen jobb, mint a korábban megjelent tanulmányokban, ahol ehhez közeli értéket csak nagyobb mintamennyiség felhasználásával sikerült elérni¹³⁻¹⁵. Agyminták esetén szintén jobb LOD értékeket kaptunk, mint az irodalmi adatok¹⁶. A kevesebb mintamennyiség azért is fontos, hogy a kísérlet során az állatot kevésbé viselje meg a többszöri mintavétel.

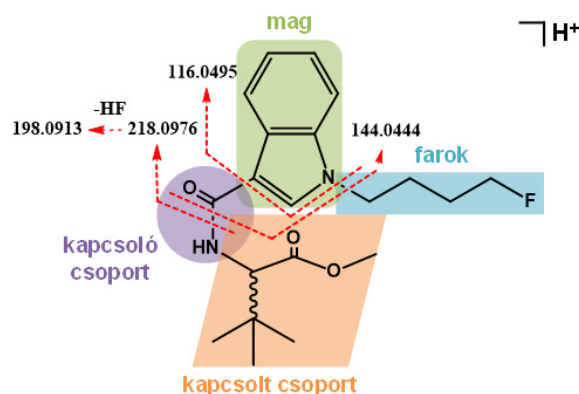
Az új 2D-UHPLC-HRMS/MS módszerünket patkány kísérletek során alkalmaztuk, ahol a vérplazma DMT szint változását követtük iszkémia előtt, iszkémia alatt, hipoxia után és a reperfüzió végén. A kísérlet kezdetén, a DMT beadását megelőzően, a begyűjtött minták DMT mennyisége a kimutatási határ alá esett. A legmagasabb 49,3-114,3 ng/ml koncentrációt az összes állat (4 db) esetében a hipoxia előtt figyeltük meg. Az 1, 3, 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. Másik fontos kérdés, hogy a kezelés hatására az agyban a DMT szint megemelkedik-e oxigénhiányos állapot fellépésekor. Ehhez kontroll és kezelt állatok agyszöveteit vizsgáltuk. A kezelés hatására a DMT-t 2,0-6,1 ng/g tartományban mutattuk ki az agyban, tehát a kezelés során a DMT átvutott a vér-agy gáton. Az érzékeny módszerrel az endogén DMT jelenlétét illetve a kezelés hatására megnövekedett szintet szeretnénk volna igazolni, azonban mint korábban említettem, az irodalmat megosztja az endogén DMT szöveti jelenléte és eddig mindösszesen 1 kézirat írja le a DMT kimutatását agyból

kapcsolt LC-MS technikával¹⁷. Az általunk kidolgozott 2D módszerrel azonban nem tudtuk igazolni a DMT jelenlétét, illetve szintjének megemelkedését hipoxiát követően¹⁸.

2.4. A 4F-MDMB-BICA szintetikus kannabinoid fogyasztásának igazolása metabolomikai megközelítéssel

A szintetikus kannabinoidok mérése 2015 óta az Igazságügyi Orvostani Intézettel közös együttműködésben folyik. A szintetikus kannabinoidok a dizájner drogok legnagyobb csoportját teszik ki, melyeket a marihuánához hasonlóan a fogyasztók főként cigaretta formájában „biofű, herbál, varázsfű vagy szinti fű” szleng név alatt szívnak el. A THC-hoz hasonlóan a szintetikus kannabinoidok is a CB1 és CB2 kannabinoid receptorokon fejtik ki hatásukat, azonban a parciális agonista THC-hoz képest teljes agonistaként működnek¹⁹. Ez azért veszélyes, mert sokkal kisebb koncentrációban képesek a hatásukat kifejteni, így könnyű őket túladagolni. A szintetikus kannabinoidok kimutatása az igazságügyi gyakorlatban elsősorban vizelet és vérmin-tából 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 mintából²⁰. Ezért az anyamolekula mellett szükséges annak karakterisztikus, fő metabolitjait is vizsgálni. Annak érdekében, hogy az új szert és annak metabolitjait hatékonyan ki tudjuk mutatni, megelőző metabolit vizsgálatok szükségesek. A leggyakrabban alkalmazott *in vitro* modell a human májmikroszóma.

2020. augusztusában a rendőrség egy új dizájner drog megjelenéséről adott hírt, mely addig 11 embert halálát okozta, azóta a halálos áldozatok száma 40 fölé jut^{21,22}. Az új szert, a 4F-MDMB-BICA-t a felhasználók csak bikaként emlegették. Szerkezetét tekintve 4 fő részből áll a szintetikus kannabinoidok nevezéktanának megfelelően (3. ábra)²³. Egyrészt áll egy metil-dimetil-butanoát (MDMB) kapcsolt csoportból, egy 4-fluor-butil láncból (4F...B), a mag egy indol gyűrű (I) és a kapcsoló pedig egy karboxamid csoport (CA).



3. ábra. 4F-MDMB-BICA szerkezete a 4 fő résszel és a feltételezett fragmentációs hasításokkal

Munkánk során célul tűztük ki a 4F-MDMB-BICA I. fázisú metabolitjainak azonosítását *in vitro* human májmikroszómás kezelést követően és a rendőrség által lefoglalt *in vivo* vizelet- és vérmintákból. A 4F-MDMB-BICA standardot a Nemzeti Szakértői és Kutatóközpont biztosította számunkra, melyet a lefoglalt minták metanolos extrakciójával nyertek ki. A mennyiségi mérésekhez meghatároztuk a céliont és a kísérőiont a HRMS/MS spektrum alapján.

A 30 perces *in vitro* májmikroszómás inkubációt követően a feltételezett metabolitok azonosításához elsőként a kezelt és kontroll minták átfogó LC-HRMS analitikai mérését végeztük el. A kapott HRMS nyers fájlakat statisztikailag összevetettük és a kezelés során képződő új kromatográfiás csúcsokhoz rendelt *m/z* ionokból csúcslistát készítettünk. Az így kapott komponensek szerkezetének meghatározásához félig-célzott LC-HRMS/MS módszert alkalmaztunk. 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 szerkezetű szintetikus kannabinoidok fragmentációs mechanizmusán alapult. Az azonosított metabolitokat rangsoroltuk a HRMS/MS mérések során a belső standarddal adott aránya alapján. A legmagasabban rangsorolt vegyületet a legnagyobb csúcsterület arányú vegyület adta. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kapott rangsor informatív és nem tükrözi a pontos mennyiségi sorrendet, mivel kísérleteink során nem állt rendelkezésünkre metabolit standard, mely elengedhetetlen a pontos mennyiségi meghatározáshoz. Az *in vitro* kísérletekkel és a rendőrségtől kapott 5 *in vivo* vizelet- és 2 *in vivo* vérmintából a 4F-MDMB-BICA 33 biotranszformációját sikerült azonosítani úgy, mint az észter hidrolízist, dealkilezést, oxidatív defluorozást, dehidrogénezést, egyszeres és kétszeres hidroxilezést, amidhidrolízist, karboxilezést és ezek kombinációját, valamint izomereket. A rutin LC-MS/MS analízishez elsődleges karakterisztikus metabolitnak az észter hidrolizált metabolitot választottuk ki, míg az egyszeres hidroxilált a vizeletre, az észter hidrolizált + dehidrogénezett metabolit pedig a vérre lett másodlagos metabolitnak meghatározva. A 4F-MDMB-BICA mennyiségi meghatározáshoz a vizsgált komponensek tömegspektrometriás paramétereit optimalizáltuk, majd validáltuk a rutin módszert, mely során az LOD 0,003 ng/ml lett vizeletben, vérben pedig 0,004 ng/ml. A célzott módszerrel a rendőrségtől kapott biológiai mintákban megmértük a 4F-MDMB-BICA koncentrációját. Az anyamolekula mindkét vérmintában kimutatható volt (1: 0,92 ng/ml, 2: >10 ng/ml), azonban a vizeletminták közül csak a 2-es vizeletmintában volt jelen (0,97 ng/ml). Az eredmények tekintetében elmondható, hogy elsőként sikerült leírni a 4F-MDMB-BICA I. fázisú metabolitjait valamint a bioanalitikai elemzését human májmikroszómában, vizeletben és vérben. Az eredményekből látható, hogy az anyamolekulát csak egy vizeletmintában sikerült azonosítani, így a másik négy esetben a fogyasztás tényét csak a metabolitok kimutatása igazolhatta²⁴. Ez a példa jól mutatja, hogy szükség van a szintetikus kannabinoidok kimutatásának metabolikus megközelítésére az igazságügyi gyakorlatban.

3. Kísérleti rész

A módszerek fejlesztése során az elválasztási, detektálási paraméterek és az adatfeldolgozás mellett különös hangsúlyt fektettünk a mintaelőkészítés kidolgozására, valamint a módszerek teljes vagy részleges validálására. A nagyfelbontású detektálást egy Thermo Scientific™ Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ tömegspektrométerrel végeztük, melyhez egy Waters® ACQUITY UPLC® I-Class ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás készüléket csatoltuk. A szintetikus kannabinoidok rutin analízise egy Shimadzu Nexera UHPLC és Thermo Scientific™ TSQ Fortis™ hármas kvadrupól tömegspektrométer kapcsolt rendszeren történik.

4. Összefoglalás

A doktori munka során kidolgozott új kapcsolt egy- és két-dimenziós LC-MS módszereket sikeresen alkalmaztuk a kutatás során felmerülő orvos-biológiai kérdések megválaszolására. A kidolgozott módszereket a jövőben az orvosdiagnosztikában, terápiában, biomarker kutatásban, az igazságügyi gyakorlatban vagy a mindennapi analitikai rutinban lehet alkalmazni.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Berkecz Róbertnek a munkám során nyújtott segítségéért és támogatásáért. A kutatás és a kéziratok elkészítése az EFOP-3.6.1-16.2016-00008, a Transzlációs Idegstudományi Nemzeti Laboratórium (RRF-2.3.1-21-2022-00011) és az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott a TKP2021-EGA-32 számú projekt támogatásával valósulhatott meg.

Hivatkozások

1. Müller, C.P.; Reichel, M.; Mühle, C.; Rhein, C.; Gulbins, E.; Kornhuber, J. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1851*.8, 1052–1065.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.014>
2. Sandra, K.; dos Santos Pereira, A.; Vanhoenacker, G.; David, F.; Sandra, P. *J Chromatogr A*, **2010**, *1217*.25, 4087-4099.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.039>
3. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H.; *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
4. Berkecz, R.; Körmöczy, T.; Tömösi, F.; Szegedi, V.; Horváth, J.; Kovács, N.; Janáky, T. *Biomed. Chromatogr.*, **2018**, *32*.6, e4202
<https://doi.org/10.1002/bmc.4202>
5. Donato, P.; Cacciola, F.; Tranchida, P.Q.; Dugo, P.; Mondello, L. *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, *31*.5, 523-559.
<https://doi.org/10.1002/mas.20353>
6. Pirok, B.W.J.; Stoll, D.R.; Schoenmakers, P.J. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 240-263.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04841>

7. Braverman, N.E.; Moser, A.B. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1442–1452.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>
8. Berkecz, R.; Tömösi, F.; Körmöczy, T.; Szegedi, V.; Horváth, J.; Janáky, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2018**, *149*, 308–317.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.043>
9. Carbonaro, T.M.; Gatch, M.B.; *Brain Res. Bull.* **2016**, *126*, 74–88.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.016>
10. Nichols, D.E. *J. Psychopharmacol.* **2018**, *32.1*, 30–36.
<https://doi.org/10.1177/0269881117736919>
11. Sato, S.; Kawamata, T.; Kobayashi, T.; Okada, Y. *NeuroReport* **2014**, *25.10*, 731–736.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000162>
12. Szabo, A.; Kovacs, A.; Riba, J.; Djurovic, S.; Rajnavolgyi, E.; Frecska, E. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 423.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00423>
13. Meyer, M.R.; Caspar, A.; Brandt, S.D.; Maurer, H.H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406.1*, 225–237.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7425-9>
14. McIlhenny, E.H.; Riba, J.; Barbanj, M.J.; Strassman, R.; Barker, S.A. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 301–313.
<https://doi.org/10.1002/bmc.1657>
15. Oliveira, C.D.R.; Okai, G.G.; da Costa, J.L.; de Almeida, R.M.; Oliveira-Silva, D.; Yonamine, M. *Bioanalysis*, **2012**, *4.14*, 1731–1738.
<https://doi.org/10.4155/bio.12.124>
16. Barker, S.A.; Littlefield-Chabaud, M.A.; David, C. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *751.1*, 37–47.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00442-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00442-4)
17. J. Kärkkäinen, J.; Forsström, T.; Tornaues, J.; Wähälä, K.; Kiuru, P.; Honkanen, A.; Turpeinen, U.H.; Hesso, A. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **2005**, *65.3*, 189–199.
<https://doi.org/10.1080/00365510510013604>
18. Körmöczy, T.; Szabó, I.; Farkas, E.; Penke, B.; Janáky, T.; Ilisz, I.; Berkecz, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2020**, *191*, 113615.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113615>
19. Tai, S.; Fantegrossi, W.E. *Neuropharmacology of New Psychoactive Substances (NPS)*; Springer, **2017**. ISBN: 978-3-319-52442-9
20. Costantino, A.G.; Altomare, C.; Stella, A. *In: Accurate Results in the Clinical Laboratory (Second Edition)*, Elsevier, **2019**. ISBN: 978-0-12-813776-5
21. Az Országos Rendőrfőkapitányság közleménye egy új dizájner drog megjelenéséről, police.hu:
<http://www.police.hu/hu/hirek-es-informaciok/legfrissebb-hireink/bunugyek/eleveszelyes-dizajner-drog-jelent-meg-a>
22. Az NSZKK sajtótájékoztatója a 4F-MDMB-BICA szintetikus kannabinoidról:
<https://nszkk.gov.hu/hirek/sajtotajekoztato-4f-mdmb-bica->
23. Potts, A.J.; Cano, C.; Thomas, S.H.L.; Hill, S.L. *Clin Toxicol.* **2020**, *58.2*, 82–98.
<https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1661425>
24. Körmöczy, T.; Sija, É.; Institóris, L.; Kereszty, É.M.; Ilisz, I.; Berkecz, R. *J. Anal. Toxicol.*, **2022**, *46.2*, 135–145.
<https://doi.org/10.1093/jat/bkab004>

Bioanalytics, lipidomics and metabolomics application of one- and two-dimensional LC-MS techniques

One of the most common coupled techniques in bioanalysis is liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS). Nowadays it is widespread technique in the fields of drug research, forensic science, food industry, biomedical research (proteomics, metabolomics, biomarker research) medical diagnostics or environmental protection as well. One-dimensional liquid chromatography (LC) is one of the most significant widespread separation techniques for the study of complex biological matrices. Offline and online two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) have been shown to be powerful tools to resolve the co-elution of the high number of analytes, in particular, in the field of proteomics, metabolomics and lipidomics. The main goal of my doctoral dissertation was to develop and apply one- and online two-dimensional LC-MS methods to answer biomedical questions in the bioanalytical approach.

Although anxiety disorders are among the most widespread diseases, their pathogenesis is still poorly understood. Lipids can play a key role, so our 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. By comparing the plasma phospholipid composition of 8 anxious and 8 non-anxious mice, significant increases in the total concentration of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI), lysophosphatidylethanolamine (LPE) and sphingomyelin (SM) classes were found in the anxious group. In the anxious group, 33 phospholipid species were determined to be up-regulated, while down-regulation was found only for PC 38:4 and PC 42:6.

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. With the established method, the differences of phospholipid composition in brain regions of 9 nonanxiety and 8 anxiety mice were compared. Our study revealed that 37 glycerophospholipid and sphingomyelin species had significantly altered concentration in the anxiety group. For PE 40:5, significant changes were observed in all three regions regularly.

Dimethyltryptamine (DMT) is an indole alkaloid found naturally in plants and animals. The synthesis of endogenous DMT in mammals performed by a methyltransferase enzyme, e.g., indolethylamine N-methyltransferase (INMT). INMT is produced in many tissues, and it can be concluded that wherever the INMT enzyme is present, there is also endogenous DMT. However, the endogenous presence of DMT divides the literature. Exogenous DMT administered at a supraphysiological concentration to experimental rodents reduced the occurrence of cerebral infarction. The main goals of this study were the development of a fast, targeted heart-cutting 2D-LC-HRMS/MS method and optimisation of sample preparation procedures for the quantitative analysis of DMT in rat brain and plasma using a relatively low amount of biological samples. The method thus developed was applied for the

determination of DMT level in rat plasma and brain of experimental model of cerebral ischemia/reperfusion using DMT administration. By connecting orthogonal HILIC and RP chromatography through the use of RP trap column and HRMS/MS detection, a sensitive and selective analytical method was successfully utilised within a total run time of 10 min for the determination of the concentration of DMT in rat plasma and brain of an experimental model of cerebral ischemia/reperfusion. The new liquid–liquid extraction sample preparation procedure and the novel heart-cutting 2D-UHPLC-HRMS/MS method gave an opportunity to improve the limit of detection compared to the literature data, using a smaller amount of biological samples. A further advantage of the new sample preparation method is that the recovery for DMT in plasma is 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-UHPLC-HRMS/MS method. The 10-min total run time is faster than various published one-dimensional LC-MS/MS methods for DMT analysis in brain and plasma. Another advantage is that α -methyltryptamine as the internal standard and DMT as the targeted compound eluted with the same retention time, thus the matrix effect was the same for both compounds during the MS detection. The obtained results show that while the concentration of DMT decreases after hypoxia in the plasma, then it is increased in the brain compared to the control group. Unfortunately, we could not confirm the presence of endogenous DMT in either the brain or the plasma. Based on the obtained results, it can be concluded that the new analytical method was successfully used to confirm the presence of DMT administered to experimental animals with therapeutic purposes.

Synthetic cannabinoids (SCs) are the largest group of new psychoactive substances. Their appearance on the black market changes rapidly, so their identification and the establishment of consumption is a particularly important task in the field of forensic toxicology. Due to the rapid metabolism of synthetic cannabinoids, it is important to analyse not only the parent molecules but also their characteristic metabolites. 4F-MDMB-BICA as a new dangerous illicit synthetic cannabinoid and 11 deaths were attributed to its consumption in Hungary until 11 August 2020. The aim of our work was to identify human liver microsome (in vitro) and human urine and blood (in vivo) phase I metabolites of 4F-MDMB-BICA. The obtained HRMS data from in vitro comprehensive LC-HRMS measurements were statistically deconvoluted. Molecular

ions selected were further studied by semi-targeted LC-HRMS/MS measurements 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 the fragmentation of the parent compound and literature data of other SCs with similar core, linker and linked group. This study provides the first characterisation of the in vitro and in vivo metabolites of 4F-MDMB-BICA with a new analytical approach. We identified several biotransformations affecting the structure of 4F-MDMB-BICA (core, tail, linker and linked group), such as ester hydrolysis, dealkylation, oxidative defluorination, dehydrogenation, mono- and di-hydroxylation, amide hydrolysis, carboxylation and their combinations. In general, the selection of at least two main metabolites is recommended in routine toxicological analysis to obtain reliable qualitative data to prove synthetic cannabinoid consumption. Thus, based on the results of the semi-targeted LC-HRMS/MS measurement of human urine and blood samples, we selected the ester hydrolysis metabolite as the primary biomarker of both body fluids. The urinary mono-hydroxylation metabolite and the ester hydrolysis and dehydrogenation substances in blood were selected as secondary confirmatory targets for the screening of 4F-MDMB-BICA.

Another goal was to extend our targeted routine analytical LC-MS/MS method with a selected characteristic phase in order to justify the use of 4F-MDMB-BICA even if the level of the parent molecule in both blood and urine falls below the detection limit. For the quantitative analysis of 4F-MDMB-BICA, the main validation parameters, such as limit of detection, limit of determination, linearity, accuracy, precision, recovery, matrix effect, process efficiency and carryover were determined. Overall, the obtained main validation parameters verify that our targeted LC-MS/MS method with related sample preparation procedures is suitable to screen 4F-MDMB-BICA in both urine and whole blood samples. As a next step, we determined the concentration of the parent molecule 4F-MDMB-BICA in two blood and five urine samples. By the application of the targeted method, the parent compound was detectable only in one urine sample (0.970 ng/mL), while it was quantifiable (0.920 ng/mL and > 10 ng/mL) in both blood samples. However, the selected characteristic metabolites could be detected in all blood and urine samples. This underlines the importance of the metabolomic approach in the analysis of synthetic cannabinoids in forensic and toxicological practice.