

# Optimiranje uvjeta analize tetrahidrokanabiola i metabolita u urinu štakora primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa

---

**Miljanić, Alena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:413646>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-11**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Medicinska kemija

Alena Miljanić

Optimiranje uvjeta analize tetrahidrokanabinola i metabolita u urinu  
štakora primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar  
masa

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
Medicinska kemija

Alena Miljanić

Optimiranje uvjeta analize tetrahidrokanabinola i metabolita u urinu  
štakora primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar  
masa

Diplomski rad

Rijeka, 2018.

Mentor rada: dr. sc. Irena Brčić Karačonji

Komentor rada: prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

UNIVERSITY OF RIJEKA  
BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT  
University Graduate Programme  
Medicinal chemistry

Alena Miljanić

Optimisation of tetrahydrocannabinol and metabolites analysis by gas  
chromatography-mass spectrometry in rat urine

Master's thesis

Rijeka, 2018.

Mentor: dr. sc. Irena Brčić Karačonji

Co-mentor: prof. dr. sc. Ana Lucić Vrdoljak

Diplomski rad obranjen je dana 28.09.2018 u 10 h pred povjerenstvom:

1. DOC. DR. SC. KARLO WITTINE (predsjednik)

2. PROF. DR. SC. DEAN MARKOVIĆ (član)

3. PROF. DR. SC. ANA LUCIĆ VRDOLJAK (član)

Rad ima 35 stranica, 5 slika, 2 tablice i 28 literaturnih navoda

# Sažetak

Zbog rastućeg javnog mišljenja o antitumorskom potencijalu tetrahidrokanabinola (THC) te kao sredstvu za ublažavanje simptoma kemoterapije irinotekanom, dio onkoloških bolesnika poseže za neregistriranim pripravcima THC-a. Da bi se procijenio utjecaj THC-a na metabolizam irinotekana na eksperimentalnom modelu štakora, potrebno je razviti osjetljivu, točnu i preciznu analitičku metodu kojom se može odrediti masena koncentracija THC-a te njegovih metabolita [11-hidroksi-delta-9-tetrahidrokanabinola (THC-OH) i 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilne kiseline (THC-COOH)] u urinu štakora kojima je apliciran samo THC, te u grupi kojoj je istovremeno apliciran THC i irinotekan. U tu su svrhu optimirani uvjeti hidrolize i ekstrakcije ispitivanih analita te se proveo razvoj i validacija plinsko-kromatografske metode uz detekciju spektrometrom masa (GC/MS) za istovremeno određivanje sva tri ispitivana analita. Optimalnom metodom hidrolize THC, THC-OH i THC-COOH glukuronida, pokazala se kombinirana hidroliza, enzimom  $\beta$ -glukuronidazom iz *E. coli* na 50 °C tijekom 2 sata, nakon koje je slijedila alkalna hidroliza. Ekstrakcija na čvrstoj fazi prilagođena za kanabinoide korištena je prije GC/MS analize. Predloženom metodom analiziran je istovremeno sadržaj sva tri analita u urinu štakora prikupljenog unutar 24 sata od tretmana (n = 10). THC nije detektiran niti u jednom uzorku, THC-OH je detektiran u 50 % uzoraka, a THC-COOH u svim uzorcima. Metoda opisana u radu zbog svoje je osjetljivosti (granice detekcije: 0,8-1 µg/L), točnosti (> 96 %) i preciznosti (RSD < 6 %) pogodna za određivanje masene koncentracije THC-a i metabolita u urinu štakora.

*Ključne riječi: GC/MS, tetrahidrokanabinol, urin štakora, metaboliti, hidroliza*

# Summary

Due to the growing public interest about the antitumor potential of tetrahydrocannabinol (THC) and its possible role as an agent for alleviating unpleasant symptoms of chemotherapy with irinotecan, some oncology patients reach for unregistered THC preparations. In order to evaluate the effect of THC on irinotecan metabolism in a rat experimental model, it is necessary to provide a sensitive, accurate and precise analytical method. This method was used for the determination of the mass concentration of THC and its metabolites [11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-OH) and 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH)] in the rat urine of a group where only THC was applied and one where THC was applied simultaneously with irinotecan. For this purpose, optimized hydrolysis conditions and extraction of the investigated analytes were performed and the development and validation of the gas chromatographic method were done by detecting mass spectrometry (GC/MS) for the simultaneous determination of all three of the analysed analytes. When optimising the conditions of hydrolysis for THC, THC-OH and THC-COOH glucuronide, the best hydrolysis, so-called tandem hydrolysis, was demonstrated by  $\beta$ -glucuronidase enzyme from *E. coli* at 50 ° C for 2 hours followed by alkaline hydrolysis. When extraction was carried out, the solid phase extraction method was used for the cannabinoid columns that preceded the GC/MS analysis. The proposed method analysed the content of all three analytes in 24-hour rat urine (n = 10). THC was not detected in either sample, THC-OH was detected in 50% of samples, and THC-COOH in all of the samples. The method described in the paper is suitable for determining the mass concentration of THC and metabolic rate in the urine of the rat due to its susceptibility (detection limits: 0.8-1  $\mu$ g/L), accuracy (> 96%) and precision (RSD < 6%).

*Key words: GC/MS, tetrahydrocannabinol, rat urine, metabolites, hydrolysis*

# Sadržaj

1	Uvod .....	8
1.1	Izvor THC-a i njegova kemijska svojstva .....	8
1.2	Toksikokinetika THC-a.....	9
1.3	Vežanje THC-a za receptore i njegovi učinci .....	11
1.4	Terapeutska primjena kanabinoida.....	11
1.5	Zakonodavni okvir .....	13
1.6	Analitičke tehnike za određivanje koncentracije THC-a i metabolita u urinu .....	14
1.6.1	Hidroliza i ekstrakcija kanabinoida i metabolita .....	14
1.6.2	Kromatografska analiza .....	14
1.6.3	Kromatografske tehnike.....	15
2	Cilj rada .....	16
3	Materijali i metode .....	17
3.1	Kemikalije i priprava standardnih otopina .....	17
3.2	Pokusne životinje.....	18
3.3	Obrada životinja .....	18
3.4	Instrumentacija .....	19
3.5	Priprema uzoraka urina .....	19
3.5.1	Hidroliza i ekstrakcija na čvrstoj fazi.....	21
3.5.2	Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa .....	21
3.5.3	Validacija metode .....	21
3.5.4	Statističke metode .....	22
4	Rezultati .....	23



5	Rasprava.....	29
6	Zaključak .....	32
7	Literatura .....	32
	Zahvala .....	35

# 1 Uvod

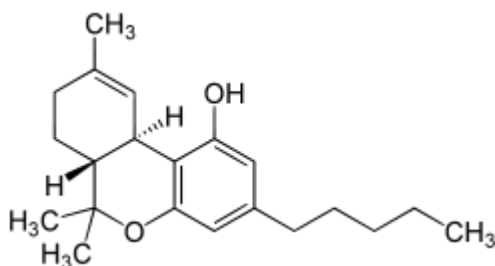
## 1.1 Izvor THC-a i njegova kemijska svojstva

Tetrahidrokanabinol (THC,  $\Delta^9$ -THC, delta-9-tetrahidrokanabinol) je spoj kemijske formule  $C_{21}H_{30}O_2$  i molarne mase 314,45 g/mol. Glavna je psihoaktivna supstanca u biljci vrste *Cannabis sativa* (konoplja). Za prvu uspješnu izolaciju THC-a iz konoplje (1964. godine) zaslužni su Raphael Mechoulam i Yechia Gaoni s Weizmann instituta u Rehovotu, Izrael.

Najveću količinu THC-a sadrže listovi ženske biljke (uglavnom 2-3 %). Donji listovi i stabljika sadrže manje od 1 % THC-a, a u sjemenkama i korijenju nije prisutan.<sup>1</sup>

THC je na sobnoj temperaturi u čvrstoj, smolastoj formi blago-žute boje, a zagrijavanjem postaje ljepljiva i viskozna tekućina. Termolabilna je i fotolabilna molekula.<sup>2</sup> Skladištenjem dolazi do smanjenja kumulativnog sadržaja THC-a oksidacijom u kanabinol (CBN).<sup>2</sup>

THC je slabo topljiv u vodi, ali se dobro otapa u većini organskih otapala kao što su etanol ili heksan, te u lipidima. Smatra se da je glavna funkcija THC-a u konoplji zaštita biljke od štetočina.



Slika 1. Struktura  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola.

Marihuana i hašiš se dobivaju iz biljke *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* (indijska konoplja) i najčešće su korištene nedopuštene droge u svijetu.<sup>3</sup>



*Slika 2. Cvijet biljke Cannabis sativa L. u kojem je koncentriran najveći dio THC-a u biljci.*

## 1.2 Toksikokinetika THC-a

Produkti konoplje se unose u organizam pušenjem ili oralno primjenom kapsula sa sintetičkim THC-om, dronabinolom (Marinol™) te putem hrane ili tekućine u dozama 2,5-40 mg THC-a.<sup>2</sup> Kinetika kanabinoida je ista za žene i muškarce.

Apsorpcija THC-a razlikuje se s obzirom na put unosa. Apsorpcija THC-a inhalacijom je oko 20-30 %. Porast koncentracije THC-a u plazmi nakon inhalacije je sličan porastu nakon intravenozne primjene s najvišim pikom u koncentraciji unutar nekoliko minuta, te zatim brzo opada. Pušenjem cigarete koja sadrži 3,55 % THC-a, vršna koncentracija THC-a u plazmi ( $152 \pm 86,3 \mu\text{g/L}$ ) postiže se oko 10 minuta nakon udisanja. Ingestijom je bioraspoloživost značajno manja (4-12 %) zbog metabolizma prvog

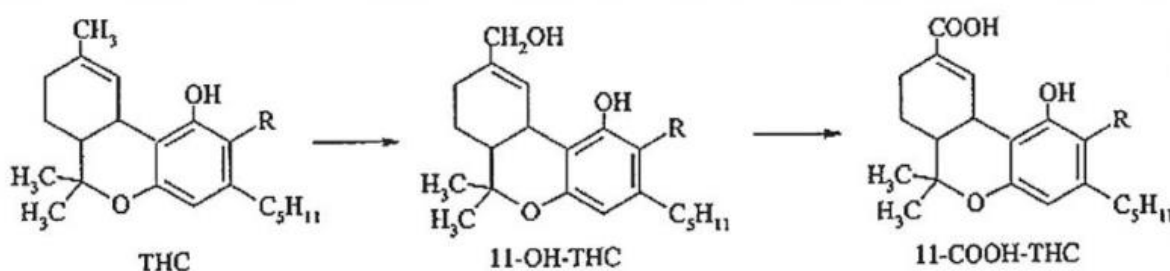
prolaska kroz jetru. Oralnom primjenom apsorbicija je odgođena, te se najveća koncentracija THC-a u plazmi postiže nakon 1-2 sata.<sup>4</sup>

Smatra se da na raspodjelu THC-a i njegovih metabolita u tkivu utječu samo fizikalno-kemijska svojstva istih, bez sudjelovanja specifičnih transportnih puteva ili barijera koje utječu na koncentraciju droge u tkivu.

THC je izrazito lipofilan spoj te se stoga u organizmu nakuplja prvenstveno u masnom tkivu, jetrima, plućima i slezeni.<sup>5</sup> Manje od 1 % primijenjene doze prolazi krvno-moždanu barijeru.<sup>4</sup>

Oko 90 % THC-a u krvi nalazi se u plazmi, a 10 % u crvenim krvnim stanicama. Oko 95-99 % THC-a je vezano za proteine plazme, najčešće lipoproteine, a manji dio za albumin.<sup>2</sup>

THC se uklanja iz plazme u više faza, s detektibilnim koncentracijama tijekom više od tjedan dana nakon konzumiranja. Hidroksilacijom THC-a nastaje psihoaktivna komponenta 11-hidroksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC-OH), a daljnjom oksidacijom neaktivni 11-nor-9-karboksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC-COOH) (Slika 3) koji se izlučuje urinom većinom kao konjugat glukuronske kiseline.<sup>5</sup>



Slika 3. Glavni metabolički put  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola.<sup>6</sup>

THC se izlučuje u obliku metabolita urinom (20-35 %) i fecesom (65-80 %). Manje od 5 % oralne doze izluči se u nepromijenjenom obliku.<sup>2,4</sup> Nakon pet

dana izluči se 80-90 % ukupne doze. Metaboliti u urinu (kojih ima 20) su uglavnom kiseli, kao primjerice THC-COOH, dok su oni u fecesu kiseli i neutralni, a najviše je 9-karboksi-THC-a (29 %) i THC-OH (21 %).<sup>4</sup>

### 1.3 Vezanje THC-a za receptore i njegovi učinci

THC se u mozgu veže za specifične kanabinoidne receptore, dijelove tzv. endokanabinoidnog sustava. Postoje CB1 receptori koji se prvenstveno nalaze u centralnom živčanom sustavu, te CB2 receptori koji se zajedno s CB1 receptorima nalaze u perifernim tkivima. Kanabinoidne receptore, osim egzogenih, mogu aktivirati i endogeni kanabinoidi poput N-arahidonoiletanolamina (anandamid) i 2-arahidonoil glicerola (2-AG) koji se sintetiziraju u neuronima, a utječu na niz fizioloških funkcija.<sup>7</sup>

Kanabis ima široki spektar učinaka na ponašanje te njegova konzumacija može uzrokovati euforiju, osjećaj opuštanja, promjenu percepcije o vremenu, nedostatak koncentracije, te umanjenu mogućnost učenja i pamćenja.<sup>3</sup> Zbog sposobnosti da izazove promjene raspoloženja, konzumacija ove droge može dovesti do ovisnosti.

### 1.4 Terapeutska primjena kanabinoida

U posljednje je vrijeme povećano zanimanje za terapeutske učinke kanabinoida i razvoj kanabinoidnih lijekova. Kanabinoidi su predmet istraživanja za tretman kronične boli, mišićnih grčeva, mučnine, AIDS-a i drugih stanja.<sup>3</sup>

Posljednjih godina bilježe se brojne proturječnosti povezane s korištenjem proizvoda od konoplje koji su se polako integrirali u modernu medicinu. Osim nedostatnih podataka o terapeutskoj učinkovitosti takvih preparata, postoji također zabrinutost oko potencijalnih negativnih učinaka koji su rezultat farmakokinetičkih i farmakodinamičkih međudjelovanja njegovih glavnih komponenata s uobičajenim lijekovima.<sup>8</sup>

Konoplju karakterizira složeni fitokemijski profil koji sadržava više od 400 kemijskih spojeva među kojima je glavna psihoaktivna komponenta upravo THC. Zbog svojih psihoaktivnih svojstava, THC ima visoki potencijal zlouporabe, stoga je u većini zemalja korištenje produkata dobivenih od *C. sativa* još uvijek zabranjeno. Brojni učinci produkata *C. sativa* u ljudskom tijelu čine je privlačnom za samoliječenje u svrhu ublažavanja simptoma proljeva, bolova u abdomenu, mučnina izazvanih kemoterapijom, povraćanja itd.<sup>8</sup>

Većina se navedenih simptoma pojavljuju tijekom terapije protutumorskim lijekom irinotekanom (IRI). Irinotekan ili 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] karboniloksikamptotekin (CPT-11) je jedan od najvažnijih antineoplastičnih lijekova u posljednjem desetljeću. Radi se o polusintetskom analogu biljnog alkaloida kampo-tecina. Iako mu je primarna svrha bila kemoterapija metastatskog kolorektalnog raka, IRI je učinkovit u liječenju raka pluća, jajnika, leukemije i malignog glioma.<sup>9</sup>

IRI je inhibitor topoizomeraze I te reverzibilno stabilizira kovalentnu vezu između DNA i enzima topizomeraze I što dovodi do lomljenja jednog lanca DNA, a time prekida replikacije DNA te posljedično stanične smrti. IRI je jedan od opcija za tretman kod prve i druge linije metastaza i/ili neoperativnog kolorektalnog tumora te značajno poboljšava trajanje i kvalitetu života oboljelih od raka. Zapažen je i odgovor na terapiju IRI-jem kod različitih tipova tumora, uključujući melanom, ne-Hodgkinov limfom, rak želuca, jednjaka, ušća maternice i pluća.<sup>10</sup>

Istraživanja su pokazala da, osim poznatih palijativnih učinaka na simptome povezane s karcinomom, kanabinoidi mogu smanjiti rast i napredovanje tumora u životinjskom modelu.<sup>11</sup>

Iako postoji nekoliko konvencionalnih terapija koje mogu smanjiti neželjene učinke antitumorskih lijekova, suočeni smo s rastućom uporabom pripravaka koji sadrže kanabinoide (ili medicinsku marihuanu) koji se koriste u ovu svrhu. Za razliku od odobrenih i registriranih proizvoda koji

sadrže standardiziranu i definiranu dozu THC-a, nedopušteni proizvodi neispitanog sastava mogu sadržavati veliku koncentraciju THC-a. To vodi korisnike povećanom riziku od štetnih učinaka, kao i potencijalnoj intoksikaciji. Istraživanja upućuju da preparati kanabisa proizvode različite učinke u organizmu, od kojih neki nisu korisni. Oralni kanabinoidi povezani su s većom pojavnošću štetnih učinaka u usporedbi s konvencionalnom antiemetskom terapijom. Kronično izlaganje THC-u povezano je s hepatotoksičnošću i steatozom.<sup>12</sup>

## 1.5 Zakonodavni okvir

Što se tiče uzgoja konoplje u Republici Hrvatskoj, Pravilnik iz 2012. godine propisuje da je dopušteno uzgajati konoplju (*Cannabis sativa L.*) u svrhu proizvodnje hrane i hrane za životinje ukoliko sadržaj THC-a u suhoj tvari biljke ne prelazi 0,2 %.<sup>13</sup>

Lijekovi koji sadrže THC, poput dronabinola i nabilona, mogu se propisivati za ublažavanje tegoba kod multiple skleroze, karcinoma, epilepsije i AIDS-a, a propisuju ih izabrani doktori medicine u djelatnosti opće/obiteljske medicine, zdravstvene zaštite predškolske djece i zdravstvene zaštite žena po preporuci doktora medicine specijalista neurologije, internističke onkologije, onkologije i radioterapije, infektologije i specijalista pedijatra sa subspecijalizacijom iz neuropedijatrije na neponovljivi recept.

Lijekovi se mogu propisivati na recept u količini potrebnoj za liječenje od najviše 30 dana, te ukupna količina propisanog THC-a u tom periodu liječenja ne smije biti veća od 7,5 g.<sup>14</sup>

## 1.6 Analitičke tehnike za određivanje koncentracije THC-a i metabolita u urinu

Vrijeme otkrivanja kanabinoida u urinu ovisi o farmakološkim (dozi, putu unosa u organizam, trajanju i učestalosti primjene, individualnim razlikama u brzini apsorpcije, metabolizmu i izlučivanju) i metodološkim čimbenicima (vrsti matrice, vrsti hidrolize, osjetljivosti metode, itd).<sup>15</sup>

Urin se smatra biološkim uzorkom izbora za identifikaciju i kvantifikaciju kanabinoida. Zbog brzog metaboliziranja kanabinoida, koncentracije metabolita THC-OH i THC-COOH u urinu su puno veće nego u krvi. Uz to, urin, kao biološki materijal, je relativno lako dobiti.<sup>16</sup>

### 1.6.1 Hidroliza i ekstrakcija kanabinoida i metabolita

S obzirom da su kanabinoidi i metaboliti u urinu prisutni uglavnom u obliku konjugata, potrebno je hidrolizirati ove spojeve. Enzimaska hidroliza je učinkovita za cijepanje THC i THC-OH glukuronida, a bazična je učinkovitija za cijepanje THC-COOH glukuronida.<sup>17</sup>

### 1.6.2 Kromatografska analiza

Postupak hidrolize je nužan prije odjeljivanja komponenti prisutnih u analitu plinskom kromatografijom budući da konjugati zbog veličine molekule i polarnosti nisu pogodni za plinsko-kromatografsku analizu. Koristeći tekućinsku kromatografiju moguće je preskočiti korak enzimatskog cijepanja jer pruža mogućnost direktne detekcije konjugata čime je moguće smanjiti zahtjevnost i vrijeme potrebno za analizu te gubitak dijela analita u postupku.<sup>18</sup> Nedvojbenu identifikaciju kanabinoida i metabolita omogućava plinski<sup>3,15</sup> ili tekućinski kromatograf<sup>18,19</sup> spregnut sa spektrometrom masa kao detektorom. Određivanju koncentracije hidroliziranih spojeva instrumentalnim tehnikama prethodi ekstrakcija kanabinoida i metabolita iz urina s ciljem odvajanja željenih analita od složene matrice uzorka. Za ekstrakciju kanabinoida mogu se koristiti



organska otapala (n-heksan, eter, etilacetat i sl)<sup>17</sup>. Kod ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), analit otopljen u odgovarajućem otapalu nakuplja se na sorbentu u koloni, a ostatak uzorka prolazi kroz kolonu bez zadržavanja.<sup>16,17,20</sup>

### 1.6.3 Kromatografske tehnike

Kromatografija je analitička tehnika koja se bazira na raspodjeli uzorka između mobilne i stacionarne faze. Analiti koje treba razdvojiti kreću se kroz sustav nošeni mobilnom fazom. Mobilna faza može biti u plinovitom ili tekućem agregatnom stanju pa se radi o plinskoj, odnosno tekućinskoj kromatografiji.

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC/MS)

Razdvajanje sastojaka iz uzorka u plinskoj kromatografiji se odvija u koloni u kojoj se nalazi stacionarna faza. Kao stacionarna faza često se koristi 5 % fenil- i 95 % metil-polisiloksan (DB-5, HP-5MS, TG-5MS) koji se nalazi u obliku viskozne tekućine na koloni od taljenog silicija. Mobilna faza je inertni plin nosač (najčešće helij). Plinska kromatografija zahtjeva derivatizaciju THC-a, THC-OH i THC-COOH. Sililacija je najčešći postupak derivatizacije koji se koristi za pretvorbu ovih analita u hlapljive i termostabilne spojeve pogodne za plinsko-kromatografsku analizu. Za nedvojbenu identifikaciju analita koristi se detektor spektrometar masa (MS). Razdvojeni sastojci smjese dolaze u detektor gdje u procesu ionizacije nastaju nestabilni molekularni ioni koji se raspadaju na fragmente karakteristične za pojedini analit.<sup>16,19,21</sup>

## 2 Cilj rada

Zbog rastućeg javnog mišljenja o visokom antitumorskom potencijalu proizvoda s THC-om, bilježi se porast onkoloških bolesnika koji, kako bi ublažili nuspojave kemoterapije, nerijetko uzimaju i neregistrirane pripravke koji mogu sadržavati čak do 90 % THC-a. Da bi se moglo pratiti potencijalni učinak kemoterapeutika IRI-ja na metabolizam THC-a, potrebno je odrediti koncentraciju THC-a, te njegovih metabolita (THC-OH i THC-COOH) u 24-satnom urinu štakora kojima je apliciran samo THC te u urinu grupi kojoj je istovremeno apliciran THC i IRI.

U tu svrhu optimirat će se uvjeti hidrolize i ekstrakcije ispitivanih analita te će se provesti razvoj i validacija analitičke metode za istovremeno određivanje koncentracije sva tri analita (THC, THC-OH i THC-COOH) u urinu štakora korištenjem vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa (GC/MS).

Pregledom dosadašnje literature ustanovili smo da postoje optimirane i validirane kromatografske metode samo za određivanje koncentracije kanabinoida i metabolita u ljudskom urinu. S obzirom da se urin štakora razlikuje od ljudskog urina po sastavu, za istraživanje je potrebno osigurati pouzdanu metodu detekcije i kvantifikacije THC-a i njegovih metabolita u urinu štakora.

## 3 Materijali i metode

### 3.1 Kemikalije i priprava standardnih otopina

Standardne otopine  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC), 11-nor-9-karboksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC-COOH) koncentracije 1 g/L, te 11-hidroksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola koncentracije 0,1 g/L kupljene su od tvrtke Lipomed (Austrija). Kao unutarnji standard korišten je 11-hidroksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol-D3 u koncentraciji 0,1 g/L iste tvrtke. Radne standardne otopine THC, THC-OH, THC-COOH i THC-COOH-D3 (1000  $\mu$ g/L) priređene su razrjeđivanjem osnovnog standarda metanolom. Sve standardne otopine su se čuvale na  $-20^\circ\text{C}$ . Korišteni su metanol, toluen i etilacetat za tekućinsku kromatografiju tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka) te N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA) + 1% trimetilklorosilan (TMCS) tvrtke Restek (Bellefonte, PA, SAD).

Enzimi korišteni za hidrolizu ( $\beta$ -glukuronidaza iz bakterije *Escherichia coli* tip IX-A, liofilizirani prah, 1 000 000 – 5 000 000 jedinica/g proteina, te  $\beta$ -glukuronidaza iz puža vinogradnjaka (*Helix pomatia*) tip H-2, vodena otopina,  $\geq 85\ 000$  jedinica/mL) kupljeni su od proizvođača Sigma (St. Louis, MO, SAD). Radna otopina  $\beta$ -glukuronidaze iz *E. coli* pripravljena je otapanjem enzima u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6,8.

Heksan, octena kiselina (min. 99,5 %), kalijev hidroksid i natrijev acetat nabavljeni su od tvrtke Kemika (Hrvatska).

Deionizirana voda pripravljena je korištenjem sustava za pročišćavanje vode Mili-Q tvrtke Milipore (Bedford, MA, SAD).

Irinotekan (u obliku hidroklorid trihidrata) je kupljen od LC Laboratories (Woburn, MA, SAD), a THC u obliku smole nabavljen je od THC Pharm GmbH (Frankfurt, Njemačka). Irinotekan je otopljen u 0,9 %-tnoj otopini natrijevog klorida. Otopina THC-a je pripravljena miješanjem sa sezamovim uljem prethodno zagrijanim na  $70^\circ\text{C}$ .

## 3.2 Pokusne životinje

Za potrebe istraživanja korišteni su štakori soja Wistar uzgojeni u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Štakori su bili muškog spola, starosti 3 mjeseca i prosječne mase 390 g. Životinje su hranjene standardnom certificiranom hranom (Mucedola, 4RF21, Italija), a voda im je bila stalno dostupna *ad libitum*.

Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicine rada u Zagrebu (broj odobrenja: 100-21/16-16). Pokus je proveden u skladu s međunarodnim standardima i nacionalnom legislativom za zaštitu dobrobiti životinja.

## 3.3 Obrada životinja

Štakori su slučajnim odabirom raspodijeljeni u tri grupe od po 5 životinja i stavljeni u metabolički kavez 24 sata radi prikupljanja uzorka urina. Grupa THC primila je u 8:00 gastralnom kanilom THC u dozi od 7 mg/kg jednokratno. Grupa IRI+THC primila je u isto vrijeme intraperitonealno irinotekan u dozi od 100 mg/kg jednokratno te odmah nakon toga 7 mg/kg THC-a jednokratno korištenjem gastralne kanile. Kontrolna skupina tretirana je sezamovim uljem i držana u istim uvjetima. Tijekom 24 sata skupljan je urin u polipropilenske epruvete sa čepovima na navoj.

## 3.4 Instrumentacija

Uzorci urina su analizirani na plinskom kromatografu Trace 1300 (Thermo Scientific, Milano, Italija) spregnutim sa spektrometrom masa ITQ 700 (Thermo Scientific, Austin, TX, SAD) kojemu je detektor ionska stupica. Korištena je kapilarna kolona TG-5MS duljine 30 m i unutarnjeg promjera

0,25 mm, sa stacionarnom fazom 5 % fenil- i 95 % metil-polisiloksana debljine sloja 0,25  $\mu\text{m}$ , proizvođača tvrtke Thermo Scientific (Runcorn, UK).

### 3.5 Priprema uzoraka urina

Uzorci urina su skupljani u polipropilenske epruvete od 10 mL tijekom 24 sata od trenutka primjene ispitivanih supstanci. Uzorci skupljeni od svakog pojedinog štakora tijekom tog vremena su udruženi i pohranjeni na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

Analiti su izolirani postupkom opisanim u poglavlju 3.5.1 *Hidroliza i ekstrakcija na čvrstoj fazi* te analizirani postupkom opisanim u 3.5.2 *Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa*.

Kanabinoidi su identificirani na temelju vremena zadržavanja na plinsko-kromatografskoj koloni u usporedbi s vremenom zadržavanja analitičkog standarda te usporedbom dobivenih spektara masa ispitivanih analita sa spektrima masa u vlastito stvorenoj bazi i komercijalno dostupnoj bazi spektara masa NIST13. Za kvantitativno određivanje analita korištena je metoda unutarnjeg standarda.

#### 3.5.1 Hidroliza i ekstrakcija na čvrstoj fazi

Uzorci urina štakora tretiranih THC-om ili kombinacijom THC-a i IRI-ja (3 mL) pomiješani su sa 6 mL 0,1 M fosfatnog pufera pH 6,8 uz dodatak 60  $\mu\text{L}$  unutarnjeg standarda koncentracije 1000  $\mu\text{g/L}$  i 300  $\mu\text{L}$   $\beta$ -glukuronidaze iz *E. coli* aktivnosti 25 000 U/mL. Za izradu baždarnog pravca korišten je urin štakora iz kontrolne skupine (negativan na ispitivane analite) u koji je dodan pufer, unutarnji standard i enzim u istoj količini te različiti volumeni radnog standarda THC, THC-OH i THC-COOH kako bi se dobio baždarni pravac u rasponu od 3 do 100  $\mu\text{g/L}$ . Masena koncentracija unutarnjeg standarda bila

je 20 µg/L u svim uzorcima. Nakon što smo promiješali uzorke na tresilici, provjeren je pH uzoraka koji je morao biti 6-7. Provedena je enzimska hidroliza uzoraka u sušioniku na 50 °C u trajanju od 2 sata. Nakon hlađenja uzoraka, dodano je 300 µL 10 M KOH, uzorci su promiješani na tresilici te je provedena kemijska hidroliza u sušioniku na 60°C u trajanju od 15 min. Zatim je nakon hlađenja u uzorke dodano 165 µL octene kiseline te 2 mL 0,1 M natrijevog acetata pH 7,0 s 5 %-tnim metanolom. Izmjerene pH vrijednosti su morale biti između 4,5 i 6,5. Uzorci su centrifugirani 15 min na 1400g i supernatant je korišten u daljnjem postupku.

Za ekstrakciju kanabinoida i metabolita iz uzoraka urina korištene su kolone Bond Elut Certify II (Agilent Technologies, SAD) kondicionirane s 2 mL metanola i 2 mL 0,1 M natrijevog acetata pH 7,0 s 5 %-tnim metanolom. Uzorak je propušten kroz kolonu te je kolona zatim isprana s 2 mL smjese metanola i vode (1:1). Kolona je potom sušena 2 min na jakom vakuumu. Analiti su eluirani s 2 mL smjese za eluiranje (heksan:etilacetat:octena kiselina=75:25:1).

Uzorci dobiveni eluiranjem su koncentrirani uparivanjem do suhog ostatka u struji dušika na sobnoj temperaturi. Na suhi ostatak je dodano 0,5 mL toluena i upareno na isti način. Zatim je suhom ostatku dodano 50 µL BSTFA + 1 % TMCS te je uzorak začepljen, promiješan na tresilici i derivatiziran 15 min na temperaturi od 90°C.

Za optimiranje uvjeta hidrolize i ekstrakcije korišten je urin štakora kojemu je aplicirano 20 mg/kg THC-a te je imao mjerljivu razinu sva tri ispitivana analita. Ispitana je učinkovitost hidrolize korištenjem  $\beta$ -glukuronidaze aktivnosti 5000 U/mL podrijetlom iz 1) *E. coli*; 2) *H. pomatia* uz uvjete hidrolize 1) 16 sati na 37 °C i 2) 2 sata na 50 °C. Rezultati su uspoređeni s 1) kemijskom hidrolizom (300 µL 10 M KOH, 15 min na 60 °C) i 2) kombiniranom hidrolizom (kemijska hidroliza nakon hidrolize  $\beta$ -glukuronidazom, aktivnosti 5000 U/mL podrijetlom iz *E. coli*, 2 sata na 50 °C). Ispitan je utjecaj volumena 0,1 M fosfatnog pufera pH 6,8 (3 i 6 mL)

koji se dodaje prije hidrolize, količina  $\beta$ -glukuronidaze iz *E. coli* koja se dodaje u uzorak (5 000 i 7 000 U/mL) te učinak centrifugiranja (15 min, 1400g) uzorka na ekstrakciju prije dodavanja uzorka na SPE kolonu.

### 3.5.2 Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa

Uzorak dobiven nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi idućeg je dana injektiran u GC/MS. U injektor se unosi 1  $\mu$ L uzorka.

Mobilna faza bila je helij s protokom od 1 mL/min. Početna temperatura injektora bila je 40 °C tijekom 0,1 min, a nakon toga je injektor zagrijan na 280°C (3 °C/min). Temperatura međuspoja (eng. *transfer line*) bila je 280 °C. Temperatura kolone od 50° C održavana je 1 min te je povišena na 250 °C, zagrijavanjem od 50°C/min. Nakon 1 min na 250 °C, kolona je zagrijana na 280 °C, porastom od 5°C/min. Na konačnoj temperaturi kolona je ostala 0,5 min. Temperatura ionskog izvora bila je 200 °C. Spektri masa snimani su u rasponu  $m/z$  200-500. Ionizacija je provedena elektronima pri energiji od 70 eV. Praćeni su ioni trimetilsilil (TMS) derivata:  $m/z$  386;371;303 za THC-TMS,  $m/z$  474;371;459 za THC-OH-2TMS,  $m/z$  371;488;473 za THC-COOH-2TMS i  $m/z$  374;491;476 za THC-COOH-D3-2TMS, a za kvantifikaciju su se koristili ioni  $m/z$  371 za THC-TMS, THC-OH-2TMS i THC-COOH-2TMS te  $m/z$  374 za THC-COOH-D3-2TMS.

### 3.5.3 Validacija metode

Granica detekcije (GD) određena je usporedbom kromatografskog pika ciljnog iona i signala šuma osnovne kromatografske linije. U tu svrhu korištena je slijepa proba (urin štakora iz kontrolne skupine) u koju su dodani kanabinoidi masene koncentracije 5  $\mu$ g/L. Za određivanje granice detekcije minimalan omjer signala ciljnog iona i šuma osnovne linije bio je jednak 3.

Linearnost metode ispitana je u koncentracijskim rasponima 3-100 µg/L za sva tri ispitivana analita.

Za ispitivanje ponovljivosti i točnosti plinsko-kromatografskog određivanja kanabinoida i metabolita u urinu pripravljeno je šest uzoraka urina štakora na dvije koncentracijske razine (10 ili 40 µg/L za sva tri analita). Preciznost je određena kao omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine mjerenja pomnožene sa 100. Taj omjer se naziva relativna standardna devijacija (RSD), a izražava se u postocima.

Točnost metode predstavlja odstupanje izmjerene koncentracije od teorijske vrijednosti. Određena je tako da su stvarne koncentracije kanabinoida i metabolita u uzorcima očitane iz baždarnog pravca i izražene u postocima obzirom na teorijsku koncentraciju kanabinoida i metabolita (10 i 40 µg/L, šest replikata za svaku koncentraciju razinu).

#### 3.5.4 Statističke metode

Statistička obrada rezultata provedena je primjenom programa STATISTICA for Windows verzija 13,2 (StatSoft Inc.). Normalnost raspodjele numeričkih podataka ispitana je Shapiro-Wilkovim  $W$  testom. Zbog nesimetrične raspodjele mjerenih parametara, rezultati unutar grupa izraženi su kao medijan i raspon, a za ocjenu značajnosti razlike između pojedinih grupa primijenjen je Mann-Whitneyev  $U$ -test. Kada su koncentracije bile niže od granice detekcije, za statističku analizu koristile su se vrijednosti  $0,5 \times GD$ . Za prag statističke značajnosti određen je  $p < 0,05$ .



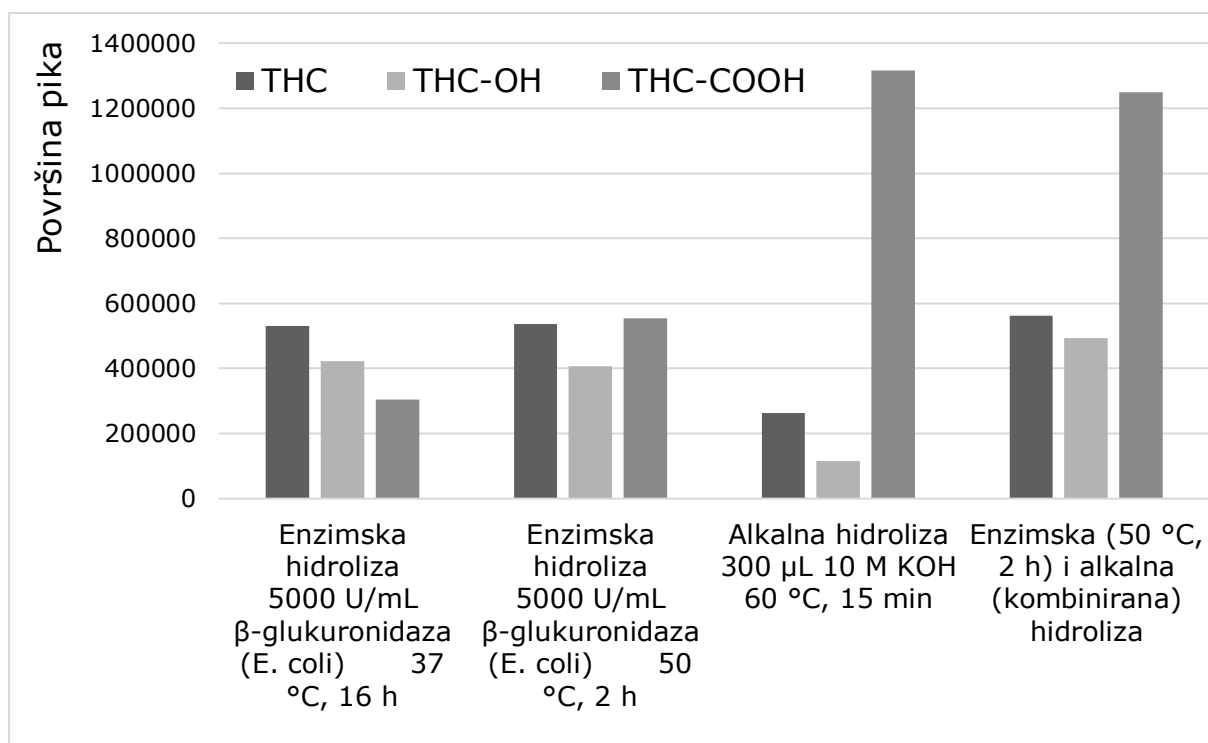
## 4 Rezultati

Razrada analitičkog postupka za određivanje THC-a u urinu uključivala je ispitivanje uvjeta hidrolize i ekstrakcije, prikladnih kromatografskih uvjeta uz koje je moguće djelotvorno razdvojiti odabrane analite, određivanje točnosti i preciznosti, te linearnosti i osjetljivosti odziva detektora. Najveća površina ispod pika analita u ciljnom ionskom kromatogramu odgovarala je najučinkovitijoj hidrolizi i ekstrakciji. Sve analize u ovom radu su provedene u triplikatu.

U prvom je pokusu ispitana učinkovitost dva enzima (*E. coli* i *H. pomatia*) i različiti uvjeti (16 sati na 37 °C i 2 sata na 50 °C) za hidrolizu kanabinoida i metabolita u urinu štakora.

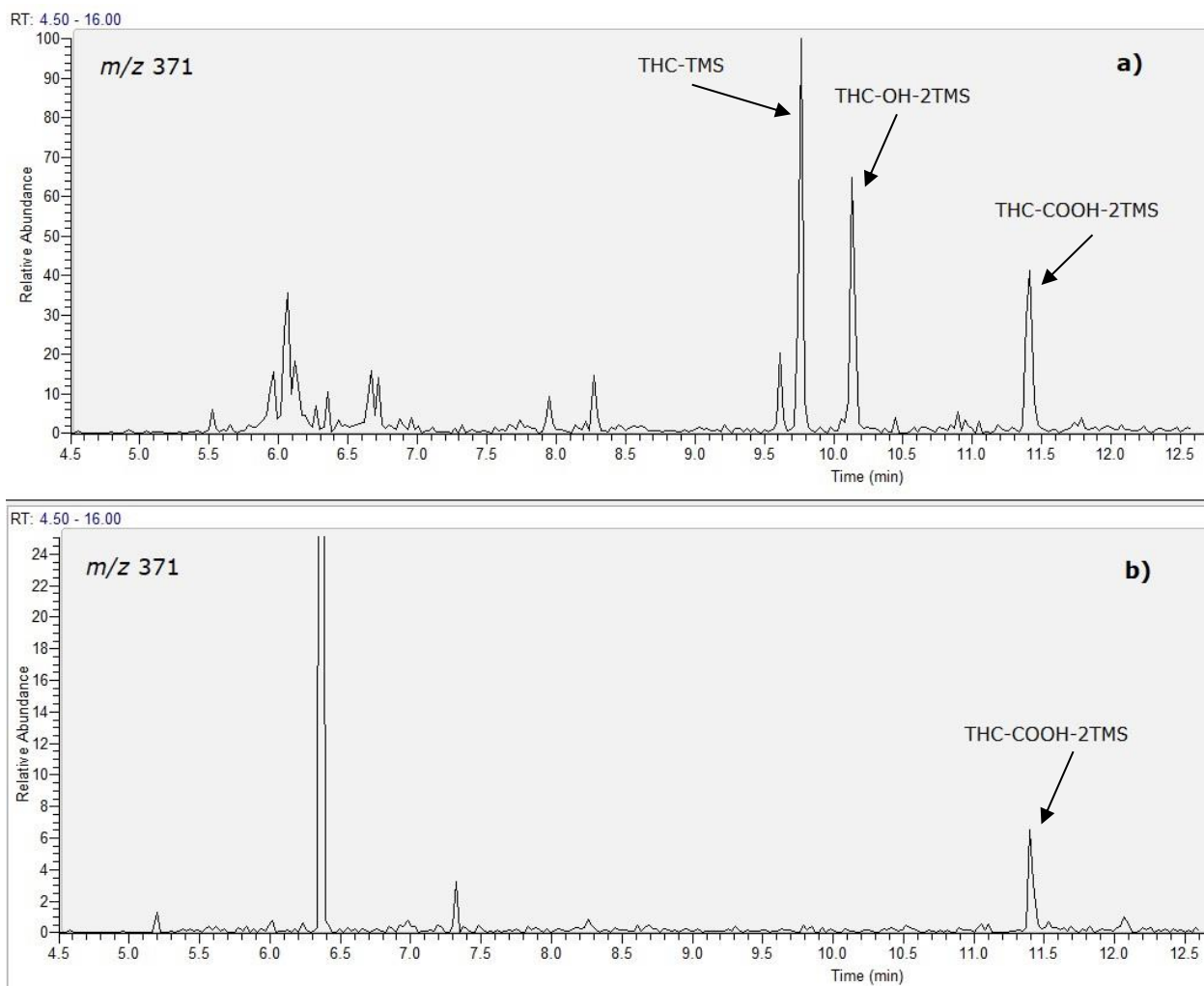
Hidroliza enzimom iz *H. pomatia* nije omogućila detektiranje THC-a, dok su korištenjem enzima iz *E. coli* detektirana sva tri analita na obje ispitivane temperature i oba vremena trajanja hidrolize. Učinkovitost hidrolize za konjugate THC i THC-OH bila je približno jednaka bez obzira na primjenjene uvjete, dok je učinkovitost hidrolize za konjugat THC-COOH bila 45 % veća na većoj temperaturi tijekom kraćeg vremena pa je hidroliza enzimom iz *E. coli* na 50 °C tijekom 2 sata korištena za daljnja ispitivanja uzorka. Za hidrolizu THC-COOH-glukuronida najučinkovitija se pokazala alkalna hidroliza s KOH na 60 °C u trajanju od 15 min. Kombinacijom enzimске i alkalne hidrolize postignuto je najučinkovitije cijepanje konjugata svih triju analita (Slika 1).

U sljedećem je pokusu testiran učinak količine  $\beta$ -glukuronidaze iz *E. coli* (5 000 i 7 000 U/mL) na stupanj hidrolize ispitivanih analita. S obzirom da je hidroliza bila jednako učinkovita korištenjem obje količine enzima, za hidrolizu analita u 3 mL urina u daljnjim je eksperimentima radi uštede korištena manja količina (5 000 U/mL).



Slika 4. Usporedba različitih vrsta hidrolize za cijepanje konjugata THC, THC-OH i THC-COOH.

Također je ispitan utjecaj volumena 0,1 M fosfatnog pufera pH 6,8 (3 i 6 mL) koji se dodaje u uzorak urina prije enzimske hidrolize. Dvostruko manji šum bazne linije kromatograma i 20 % veća površina ciljnih pikova postignuti su korištenjem razrjeđenijeg uzorka (6 mL pufera). Centrifugiranje (15 min, 1400g) prije dodavanja uzorka na SPE kolonu dodatno je smanjilo šum bazne linije kromatograma za 25 %.



*Slika 5. Ionski kromatogrami uzorka urina štakora iz: a) kontrolne grupe koji sadrži 20  $\mu\text{g/L}$  THC, THC-OH i THC-COOH i b) grupe THC s masenom koncentracijom THC-COOH od 15,7  $\mu\text{g/L}$ . THC i THC-OH nisu detektirani. Za kvantifikaciju svih triju analita korišten je ion  $m/z$  371.*

Plinsko-kromatografska analiza kanabinoida i metabolita u urinu uz primjenu uvjeta hidrolize i ekstrakcije opisanih u poglavlju 3.5.1 *Hidroliza i ekstrakcija na čvrstoj fazi* i kromatografskih uvjeta opisanih u poglavlju 3.5.2. *Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa* omogućila je djelotvorno razdvajanje svih ispitivanih analita bez interferencija. Tretman s IRI-jem nije utjecao na kvalitetu dobivenih kromatograma. Da bi se

izbjegla pojava dodatnih pikova pri većim temperaturama kolone zbog nečistoća prisutnih u složenoj matrici uzorka, nakon programiranog zagrijavanja do 280 °C kolona je ostala na toj temperaturi još 0,5 min.

Baždarni pravac napravljen je u rasponu od 3-100 µg/L THC-a, THC-OH i THC-COOH s koeficijentom korelacije ( $R^2$ ) > 0,9986 što upućuje na linearnost odziva detektora u ispitivanom rasponu koncentracija.

*Tablica 1* prikazuje rezultate analitičke validacije metode za određivanje masene koncentracije kanabinoida i metabolita u urinu štakora. Granice detekcije bile su u rasponu 0,8-1,0 µg/L, dok je točnost bila veća od 96 % za obje ispitivane koncentracijske razine. Preciznost, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je < 6 % što upućuje na dobru preciznost mjerenja.

*Tablica 1* Preciznost, točnost i granica detekcije pri određivanju masene koncentracije kanabinoida i metabolita u urinu štakora (n = 6)

<b>Analit</b>	<b>γ (µg/L)</b>	<b>Preciznost (RSD %)</b>	<b>Točnost (%)</b>	<b>Granica detekcije (µg/L)</b>
<b>THC</b>	10	4,4	96,7	0,9
	40	3,9	97,7	
<b>THC-OH</b>	10	5,9	97,6	1,0
	40	4,8	99,1	
<b>THC-COOH</b>	10	5,2	97,3	0,8
	40	4,4	98,2	

n = broj replikata na svakoj koncentracijskog razini; γ - masena koncentracija; RSD - relativna standardna devijacija

Predloženom validiranom metodom analizirano je 10 uzoraka 24-satnog urina štakora od kojih je pet bilo jednokratno tretirano THC-om u dozi od 7 mg/kg, a pet je jednokratno tretirano THC-om (7 mg/kg) i IRI-jem (100 mg/kg). Koncentracije kanabinoida i metabolita u 24-satnom urinu štakora iz skupina THC i IRI+THC prikazane su u Tablici 2. THC nije detektiran niti

u jednom uzorku, THC-OH je detektiran u 50 % uzoraka, a THC-COOH u svim uzorcima. U grupi THC+IRI utvrđena je statistički značajno veća masena koncentracija THC-COOH u urinu u usporedbi s grupom THC.

*Tablica 2. Masene koncentracije kanabinoida i metabolita u 24-satnom urinu štakora iz skupina THC i IRI+THC.*

Analit	Masena koncentracija ( $\mu\text{g/L}$ )	
	Medijan (Raspon)	
	Grupa THC	Grupa IRI+THC
<b>THC</b>	ND	ND
<b>THC-OH</b>	0,5 (ND-8,5)	1,7 (ND-9,3)
<b>THC-COOH</b>	16,6 (15,1-18,4)	18,7* (18,5-22)

\* statistički značajna razlika u usporedbi s grupom THC ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitneyjev U test)

## 5 Rasprava

Urin je najčešće korišteni biološki uzorak za analizu metabolita budući da je lako dostupan i sadrži veće količine metabolita u usporedbi s ostalim tjelesnim tekućinama.<sup>6</sup> Iako je štakor kao eksperimentalni model često korišten za razumijevanje metabolizma droga, detekcija THC-a i metabolita nakon oralne primjene THC-a nije dobro istražena.

Postoji značajna razlika u metaboličkom profilu ljudskog i štakorskog urina. Urin štakora bogatiji je aminokiselinama u odnosu na ljudski, te je time gušći, viskoziji i manje proziran. Aminokiseline prisutne u urinu izlučuju se, ne samo u slobodnom obliku, nego i konjugatima.<sup>22</sup> S obzirom na različitosti u sastavu ljudskog i štakorskog urina, složenosti matrice uzorka te razlike u brzini metaboliziranja THC-a (štakori brže metaboliziraju THC zbog veće količine enzima iz sustava citokroma P450 po gramu tjelesne mase<sup>23</sup>), bilo je potrebno optimirati i validirati GC/MS metodu za određivanje koncentracije THC-a i metabolita u urinu štakora. Prema našim saznanjima, u literaturi se ne može pronaći nijedna validirana metoda koja uključuje plinsko-kromatografsku analizu uz detekciju spektrometrom masa za kvalitativno i kvantitativno određivanje spomenutih analita u štakorskom urinu.

U ovom smo radu optimirali uvjete kvalitativne i kvantitativne analize THC-a te njegovih metabolita THC-OH i THC-COOH u urinu štakora.

U prvom su eksperimentu optimirani uvjeti hidrolize glukuronida. Naime, tijekom metaboliziranja THC-a dolazi do konjugacije THC-a i metabolita s glukuronskom kiselinom i stvaranja glukuronida.<sup>24</sup> S obzirom na polarnost i veličinu metabolita vezanog u obliku glukuronida, nije ga moguće analizirati plinskom kromatografijom. Iz tog je razloga potrebno odvojiti analit od glukuronske kiseline postupkom hidrolize. U optimiranju uvjeta hidrolize značajnu ulogu imaju odabir sredstva za hidrolizu (enzimi  $\beta$ -glukuronidaze izolirani najčešće iz bakterije *E. coli* odnosno iz puža *H. pomatia* ili alkalno

sredstvo poput KOH) te vrijeme i temperatura hidrolize.<sup>25</sup> Enzim  $\beta$ -glukuronidaza izolirana iz *E. coli*, pokazala je bolju hidrolitičku aktivnost u usporedbi s istim enzimom izoliranim iz puža *H. pomatia*, što ukazuje na ovisnost glukuronidazne aktivnosti o izvoru enzima, a što je u skladu s podacima iz literature koji upućuju na slabu hidrolitičku aktivnost enzima iz puža *H. pomatia* naspram glukuronida THC-a i THC-COOH.<sup>25</sup>

Praćena je učinkovitost enzimске hidrolize korištenjem *E. coli* tijekom dva vremenska intervala na različitim temperaturama (16 sati na 37 °C i 2 sata na 50 °C), neenzimske alkalne hidrolize kalijevim hidroksidom te kombinirane hidrolize (alkalna nakon enzimске). Dok su obje enzimске hidrolize dale slične rezultate, s nešto većom detektiranom koncentracijom THC-COOH na 50 °C tijekom 2 sata naspram enzimске hidrolize na 37 °C tijekom 16 sati, hidroliza kalijevim hidroksidom pokazala je najviše koncentracije THC-COOH, uz izrazito niže vrijednosti THC-OH i THC, što sugerira da kalijev hidroksid ne hidrolizira etersku vezu prisutnu u glukuronidima THC-a i THC-OH, već samo estersku vezu prisutnu kod glukuronida THC-COOH. Za cijepanje eterske veze pogodnija je enzimska hidroliza. Najboljom hidrolizom se pokazala kombinirana hidroliza, nakon koje su detektirane najveće koncentracije svih analita, s naglaskom na koncentraciju THC-COOH koja je bila veća u usporedbi s pojedinačnim hidrolizama. Stoga se kombinirana hidroliza, enzimom iz *E. coli* na 50 °C tijekom 2 sata, te zatim alkalna na 60 °C tijekom 15 min pokazala najboljom s najvećim detektiranim koncentracijama svih analita.

Prilikom hidrolize, za pripremu uzorka urina ispitan je utjecaj volumena 0,1 M fosfatnog pufera pH 6,8 (3 i 6 mL) koji se dodaje prije hidrolize radi razrijeđenja gustog urina štakora. Zaključeno je da je veće razrijeđenje pogodnije za daljnju obradu uzorka na SPE kolonama što je rezultiralo manjim šumom bazne linije kromatograma i većom površinom ciljnih pikova. Učinkovitost ekstrakcije je povećalo i centrifugiranje uzorka kojim se uklanjaju sitne čestice podrijetlom iz enzima, a koje znatno narušavaju

kvalitetu kromatograma. Hidroliza je bila učinkovita i s manjom količinom enzima (5000 U/mL) i takvi su rezultati u skladu s literaturom.<sup>25</sup>

Ekstrakcija uzorka neophodna je kako bi se odstranili neželjeni sastojci u uzorku, a koji bi smetali pri kromatografskoj analizi. Postupak ekstrakcije je prilagođen prema metodi prethodno optimiranoj za određivanje masene koncentracije THC-COOH u urinu ljudi.<sup>26</sup>

Plinsko-kromatografska analiza kanabinoida i metabolita u urinu uz primjenu opisanih uvjeta hidrolize i ekstrakcije omogućila je djelotvorno razdvajanje svih ispitivanih analita.

Osjetljivost (GD = 0,8-1 µg/L), točnost (> 96 %) i preciznost optimirane i validirane GC/MS metode slične su vrijednostima koji su dobili drugi autori pri validaciji GC/MS<sup>3</sup> i LC/MS<sup>19,27</sup> metoda za određivanje kanabinoida i metabolita u ljudskom urinu.

Optimiranom i validiranom GC/MS metodom analizirano je 10 uzoraka 24-satnog urina štakora od kojih je pet bilo jednokratno tretirano THC-om u dozi od 7 mg/kg, a pet je jednokratno tretirano THC-om (7 mg/kg) i IRI-jem (100 mg/kg). Grupa koja je primala THC i IRI imala je statistički značajno veću koncentraciju THC-a naspram grupe koja je primala isključivo THC. Moguće objašnjenje ovog rezultata je potencijalna preraspodjela THC-a iz masnog tkiva u krv radi međudjelovanja s IRI-jem<sup>2</sup> ili gubitka masnog tkiva povezanog s aplikacijom IRI-ja čime se također može povećati slobodna frakcija THC-a u krvi raspoloživa za metaboliziranje.<sup>28</sup>



## 6 Zaključak

Povećanjem broja korisnika pripravaka koji sadrže THC za ublažavanje nuspojava kemoterapije, te željom za razumijevanje njegovog metabolizma u međudjelovanju s kemoterapeutikom irinotekanom, nužno je pronaći prikladan model na kojem je moguće provesti istraživanje.

U sklopu ovog rada optimirani su uvjeti analize THC-a i njegovih metabolita u urinu štakora primjenom ekstrakcije analita na čvrstoj fazi uz detekciju i kvantifikaciju analita GC/MS-om. Metoda je osjetljiva, točna i precizna te je stoga prikladna za kvantifikaciju THC-a i njegovih metabolita u urinu štakora. Primjenom ove metode moguća su daljnja istraživanja metabolizma kanabinoida u urinu štakora.

## 7 Literatura

- 1 Guy G.W., Whittle B.A., Robson P.J. The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids. *Pharm Hospital* 2008; **43**: 56–57.
- 2 Grotenhermen F. Clinical pharmacokinetics of cannabinoids. *J Cannabis Ther* 2003; **3**: 3–51.
- 3 Abraham, T. T., Lowe, R. H., Pirnay, S. O., Darwin, W.D., Huestis, M. A. Simultaneous GC-EI-MS Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in human urine following tandem enzyme-alkaline hydrolysis. *J Anal Toxicol* 2007; **31**: 477–485.
- 4 McGilveray I.J. Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Res Manage* 2005 2005; **10(Suppl A)**: 15A–22A.
- 5 Sharma P., Murthy P., Bharath M.M.S. Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iran J Psychiatry* 2012; **7**: 149–156.
- 6 Musshoff F., Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit* 2006; **28**: 155–163.
- 7 Komorowski J., Stepień H. The role of the endocannabinoid system in the regulation of endocrine function and in the control of energy balance in humans. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; **61**: 99–105.
- 8 Atakan Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012; **2**: 241–254.
- 9 Lucić Vrdoljak A, Fuchs N, Mikolić A, Žunec S, Brčić Karačonji I, Jurič A et al. Irinotecan and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: a preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. *Molecules* 2018; **23**: 1332.
- 10 Jong F. *A Roadmap to Individualized Irinotecan Dosing*. 2006<https://repub.eur.nl/pub/8025/> (accessed 19 Apr 2017).
- 11 Velasco G., Sánchez C., Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 436–444.
- 12 Bridgeman M.B., Abazia D.T. Medicinal cannabis: history, pharmacology, and implications for the acute care setting. *P T* 2017; **42**: 180–188.

- 13 Petrović M., Katalenić M., Medić Šarić M., Kalodera Z., Žuntar I., Pospišil M *et al.* Znanstveno mišljenje o utjecaju na zdravlje različitih vrsta hrane od sjemenki i koja sadrži sjemenke industrijske konoplje. Hrvatska agencija za hranu HAH: Zagreb (Croatia), 2015.
- 14 Ministarstvo zdravlja. Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept. Ministarstvo zdravlja: Zagreb (Croatia), 2015.
- 15 Lowe R.H., Abraham T.T., Darwin W.D., Herning R., Cadet J.L., Huestis M.A. Extended urinary  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. *Drug Alcohol Depend* 2009; **105**: 24–32.
- 16 Đorđević S., Krstić N., Kilibarda V., Šulić K., Jovanović B. Prikaz metoda za dokazivanje i određivanje kanabinoida u biološkom materijalu. *Medical Data* 2011; **3**: 063–068.
- 17 Battista N, Sergi M, Montesano C, Napoletano S, Compagnone D, Maccarrone M. Analytical approaches for the determination of phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices: phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices. *Drug Test Anal* 2014; **6**: 7–16.
- 18 Felli M., Martello S., Chiarotti M. LC–MS–MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: application to workplace confirmation tests. *Forensic Sci Int* 2011; **204**: 67–73.
- 19 Teixeira H., Verstraete A., Proença P., Corte-Real F., Monsanto P., Vieira D.N. Validated method for the simultaneous determination of  $\Delta$ 9-THC and  $\Delta$ 9-THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Sci Int* 2007; **170**: 148–155.
- 20 Huq S., Dixon A., Kelly K., Kallury K.M.R. Novel solid-phase extraction protocol for 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol from urine samples employing a polymeric mixed-mode cation-exchange resin, Strata-X-C, suitable for gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A* 2005; **1073**: 355–361.
- 21 Kemp P.M., Abukhalaf I.K., Manno J.E., Manno B.R., Alford D.D., Abusada G.A. Cannabinoids in humans. I. Analysis of delta 9-tetrahydrocannabinol and six metabolites in plasma and urine using GC-MS. *J Anal Toxicol* 1995; **19**: 285–291.

- 22 Jung J., Meyer M.R., Maurer H.H., Neusüß C., Weinmann W., Auwärter V. Studies on the metabolism of the  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol precursor  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta$ 9-THCA-A) in rat using LC-MS/MS, LC-QTOF MS and GC-MS techniques. *J Mass Spectrom* 2009; **44**: 1423–1433.
- 23 Martignoni M., Groothuis G.M.M., de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006; **2**: 875–894.
- 24 Brenneisen R., Meyer P., Chtioui H., Saugy M., Kamber M. Plasma and urine profiles of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol and its metabolites 11-hydroxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol after cannabis smoking by male volunteers to estimate recent consumption by athletes. *Anal Bioanal Chem* 2010; **396**: 2493–2502.
- 25 Kemp P.M., Abukhalaf I.K., Manno J.E., Manno B.R., Alford D.D., McWilliams M.E. *et al.* Cannabinoids in humans. II. The influence of three methods of hydrolysis on the concentration of THC and two metabolites in urine. *J Anal Toxicol* 1995; **19**: 292–298.
- 26 Karačić V., Skender LJ. Analysis of drugs of abuse in urine by gas chromatography/mass spectrometry: experience and application. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000; **51**: 389–400.
- 27 Schaefer N., Kettner M., Laschke M.W., Schlote J., Peters B., Bregel D. *et al.* Simultaneous LC-MS/MS determination of JWH-210, RCS-4,  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, and their main metabolites in pig and human serum, whole blood, and urine for comparing pharmacokinetic data. *Anal Bioanal Chem* 2015; **407**: 3775–3786.
- 28 Coskun Z.M., Bolkent S.E. Evaluation of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol metabolites and oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Iran J Basic Med* 2016; **19**: 154–158.

# Zahvala

*Željela bih se zahvaliti prof. dr. sc. Ani Lucić Vrdoljak, koja me kroz kolegij Toksikologije zainteresirala, a zatim i odobrila moj dolazak na Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada.*

*Veliko hvala mojoj dragoj mentorici, dr. sc. Ireni Brčić Karačonji, na pristupačnosti i stručnosti koju je iskazala. Hvala na pomoći, strpljenju i vodstvu bez koje ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Također, hvala djelatnicima Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, s kojima mi je bilo zadovoljstvo učiti i raditi.*

*Naposljetku, hvala obitelji i prijateljima čija mi je potpora puno značila.*

## PERSONAL INFORMATION

## Alena Miljanić



📍 Primorska 36, 51000 Rijeka (Croatia)

☎ +385 95 853 5076

✉ alena.miljanic@gmail.com

💬 Skype alena.miljanic3

## WORK EXPERIENCE

10/2017–04/2018

## Erasmus+ Traineeship

Sveučilište u Varšavi, Varšava (Poljska)

Fakultet biologije; Imunološki odjel

- Uzgoj primarnih stanica i staničnih linija kultura in vitro
- Aplikacija protočne citometrije i tehnika molekularne biologije u evaluaciji humanih i mišjih imunoloških stanica
- Osnovne molekularne tehnike evaluacije signaliranja molekula
- Rad u grupi u internacionalnom okruženju

03/2017–08/2017

## Stručna praksa

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb (Hrvatska)

Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam

Diplomski rad na temu: "Optimiranje uvjeta analize tetrahidrokanabinola i metabolita u urinu štakora primjenom vezanog sustava plinski kromatograf-spektrometar masa"

11/2016–02/2017

## Vanjski suradnik

L'Oréal Paris Hrvatska, Zagreb (Hrvatska)

- Edukacija potrošača
- Ispitivanje tipa kože i sugestiranje korištenja primjerenog proizvoda

04/2015–12/2015

## Vanjski suradnik

Salvus d.o.o, Rijeka (Hrvatska)

- Suradnik pri mjerenju vitamina i minerala u lijekovima
- Sugeriranje pri kupnji dodataka prehrani brenda Solgar

08/2014–07/2014

## Obavezna praksa

Jadran Galenski laboratorij d.o.o, Rijeka (Hrvatska)

Odjel kontrole kvalitete

- Dissolution, UV / VIS spektrofotometrija, GC analiza
- Uzorkovanje sirovina, proizvoda i ambalaže za procjenu kvalitete
- Analiza kontaktne ambalaže
- Ažuriranje SOP-ova bazirano na smjericama Europske Pharmacopoeia 8.0

## EDUCATION AND TRAINING

10/2015–Present

## Diplomski sveučilišni studij "Medicinska kemija"

EQF level 7

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

-120 ECTS-a Diplomski sveučilišni studij: "Medicinska kemija"

09/2011–10/2015	<b>Baccalaurea Biotehnologije i istraživanja lijekova</b> Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska) - 180 ECTS-a Preddiplomski sveučilišni studij; "Biotehnologija i istraživanje lijekova"	EQF level 6
2007–2011	<b>Opća gimnazija</b> Gimnazija Andrije Mohorovičića u Rijeci, Rijeka (Hrvatska) - 4.2 razina - državna matura nakon četverogodišnjeg srednjoškolskog programa	EQF level 4

#### PERSONAL SKILLS

Mother tongue(s) Hrvatski

Foreign language(s)

	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken Interaction	Spoken production	
Engleski	C2	C1	C1	C1	C1
Jezik struke					
Njemački	C1	C1	B2	C1	C1
Deutsches Sprachdiplom der Kulturministerkonferenz					

Levels: A1 and A2: Basic user - B1 and B2: Independent user - C1 and C2: Proficient user  
Common European Framework of Reference for Languages

Communication skills - komunikacijske vještine stečene u poslovima prodaje

Organisational / managerial skills - Voditeljica tima; Projekt "StartUp 3. Generacije" 2014./2015.  
- Voditeljica tima; Projekt "Case Study" 2014.  
- Organizacija brucosijade Odjela za biotehnologiju 2013. i 2014.  
- Uredništvo fakultetskog časopisa *Biotech* 2013.

Digital skills

SELF-ASSESSMENT				
Information processing	Communication	Content creation	Safety	Problem solving
Independent user	Proficient user	Independent user	Independent user	Independent user

Digital skills - Self-assessment grid

Driving licence B

#### ADDITIONAL INFORMATION

- Courses**
- Ljetna škola "Pathophysiology and public health issues" - suradnja Odjela za biotehnologiju u Rijeci i St. Cloud State University, Minnesota (USA) (2016.) Capstone experience
  - Rad sa programima za molekularno modeliranje (Chimera, Avogadro, PyMOL, MacMolPlot, VMD, SciDAVis, KinTek) (2015. i 2016.)
  - ADRIATinn 1st Startupweekend (2014.)
- Projects**
- Projekt "Optimizacija uzgoja jestivih gljiva na celuloznoj podlozi s anorganskim ionskimizmjenjivačima" (2014.) - prijavljen u StartUp Inkubator 2015.

**Memberships**

- Volontiranje na projektu "Tetragon" (2013.)
- Volontiranje na događaju "Dani otvorenih vrata Odjela za biotehnologiju" (2013. i 2014.)
- Volontiranje na Festivalu znanosti (2013. i 2014.)
- Volontiranje na Gong-ovom projektu "Dan akcije" (2010.)