

**DELTA-9-TETRAHÜDROKANNABINOOLI ANALÜÜSI SPETSIIFILISUS
SUUVEDELIKUS**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Alesja Nehhožina

Juhendaja: Jelena Gorbatšova, KBI, teadur

Kaasjuhendaja: Jekaterina Mazina-Šinkar, KBI, teadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



SPECIFICITY OF THE DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL ANALYSIS IN ORAL FLUID

Bachelor Thesis

Student: Alesja Nehhožina

Supervisor: Jelena Gorbatšova, KBI, researcher

Jekaterina Mazina-Šinkar, KBI, researcher

Study programm: Applied Chemistry, Food and Gene Technol

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Alesja Nehhožina
/allkirjastatud digitaalselt/ 11.01.2023

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Jelena Gorbatšova
/allkirjastatud digitaalselt/ 11.01.2023

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Vello Tõugu
/allkirjastatud digitaalselt/ 11.01.2023

SISUKORD

Autorideklaratsioon	3
LÜHENDITE LOETELU.....	6
SISSEJUHATUS	7
1 TEOREETILINE OSA	9
1.1. Kanep ja kannabinoidid	9
1.2. THC molekul.....	9
1.3. THC määramismeetodid süljes	10
1.3.1. ELISA meetod	10
1.3.2. GC-MS meetod	10
1.3.3. LC-MS-MS meetod	10
1.4. Kapillaarelektroforees	11
1.4.1. Kapillaarelektroforeesi tööpõhimõte.....	11
1.4.2. Kapillaarelektroforeesi aparatuur	13
1.4.3. Proovi sisestamine	13
1.4.4. Detekteerimine fluorestsentsdetektoriga	13
1.5. THC analüüs kapillaarelektroforeesi meetodiga	14
1.5.1. THC laengu sõltuvus BGE pH-st.....	14
1.5.2. Analüüdi struktuur FLU analüüsimiseks	15
1.5.3. Süljeproov THC analüüsimisel	16
1.6. Sisestandard	16
1.6.1. Sisestandardi kasutamine	16
1.6.2. Sisestandardi valimine	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1. Aparatuur ja töövahendid	19
2.1.1. 3D-FLU aparatuur	19
2.1.2. CE-FLU aparatuur	19
2.2. Katsete läbiviimise tingimused	19
2.3. Proovid, kemikaalid ja reagensid	20
2.4. Proovide ettevalmistus.....	21
3 TULEMUSED JA ARUTELU.....	23
3.1. THC fluorestsents.....	23
3.2. Spektraalkujundite meetod	23
3.3. CE-FLU.....	26
3.3.1. Sisestandardi leidmine	26
3.3.2. Selektiivsus ja spetsiifilisus.....	27
3.3.3. Muud ravimid ja reagensid	28

KOKKUVÕTE	30
ABSTRACT.....	31
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	32
LISAD	36
Lisa 1 – analüüsitava ainete SFS pildid	36

LÜHENDITE LOETELU

analüüt	testitavas proovis olev aine (komponent)
THC	delta-9-tetrahydrokannabinool ehk THC
KE ehk CE	Kapillaarelektroforees ehk <i>Capillary Electrophoresis</i>
EOF	<i>Electroosmotic Flow</i> ehk Elektroosmootne voog
BGE	<i>Background Electrolyte</i> ehk Taustelektrolüüt
3D-FLU	<i>3D Fluorescence Spectroscopy</i> ehk 3D-FLU
CE-FLU	<i>Capillary Electrophoresis with Fluorescence Detection</i> ehk Kapillaarelektroforees fluorestsentsdetektoriga
GC-MS	<i>Gas chromatography with mass spectrometry</i> ehk Gaasikromatograafia-massispektromeetria
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography with tandem-mass Spectrometry</i> ehk Vedelikkromatograafia tandem-massispektromeetria
IS	<i>Internal Standard</i> ehk Sisestandard

SISSEJUHATUS

Kannabinoidid on looduslikke ühendite perekond, mis leidub kanepi ehk *Cannabis sativa* taimes. Osa nendest omavad psühhoaktiivset efekti ja mõjutavad kesknärvisüsteemi, tekitades inimese sõltuvust. Kõige levinum ja taimes kõige suuremas kontsentratsioonis leiduv kannabinoid delta-9-tetrahydrokannabinool ehk THC omab just narkootilist efekti. Kanepit suitsetatakse nii puhtal kujul kui ka segatuna tubakaga, vahel manustatakse ka toidu kaudu – küpsetatuna kookide või küpsiste sees.

Mõnedel riikides kanepi tarvitamine on legaliseeritud, kuid enamasti ja ka Eestis on see esimene keelatud uimasti. Kõige uuem 2020. aasta rahvastiku tervisekäitumise uuring näitab, et viimase 30 päeva jooksul oli kanepit tarvitanud ligi 5% vastanutest (mehed 7% ja naised 3%), kusjuures vanusegrupis 16–24 aastat oli seda teinud 21% meestest ja 10% naistest, kuna vahendajate kaudu on see küllalt kergesti kättesaadav. (1)

Kuid kanepi metaboliidid on tänapäevaste testidega organismis tuvastatavad umbkaudu 30 päeva jooksul pärast tarvitamist, seega on tungiv vajadus kiirete, kuid tundlike uuringute meetodite järele töökohal, autojuhtimise või uimastiravi ajal. (2)

Mitmed klassikalised kannabinoidide mõõtmise meetodid (näiteks gaasikromatograafia) omavad piisavalt puudusi kannabinoidide efektiivselt analüüsiks. Need meetodid on kallid, ei ole keskkonnasõbralikud, aega nõudvad ja tänu pikale proovi ettevalmistus protseduurile omavad suurt süstemaatilise vea panust tulemustesse. Illegalne kanepi laialdane tarvitamine on üldiselt põhjuseks, miks kannabinoide uuritakse intensiivselt ning uute meetodite otsimine tarvitamise määramiseks on muutunud üha populaarsemaks viimasel ajal. Antud töös THC määramiseks proovides kasutati üht konkurentsivõimelist alternatiivset meetodit – kapillaarelektroforees (inglise keeles *Capillary Electrophoresis* ehk CE) fluorestsents detektoriga. Selle meetodi eeliseks on kõrge selektiivsus kannabinoidide analüüsil, samuti lühike analüüsi teostamise aeg, väikesed proovikogused, aparatuuri lihtsus ja mobiilsus.

Antud töö tulemused on seotud pikkajalise Eesti Politseiameti ja Tallinna Tehnikaülikooli koostööprojektiga, mis sai alguse 2016 ja kehtib ühel või teisel kujul siamaani. Seega antud töös on esitatud ainult neid uuringud, mida autor tegi ise.

Töö eesmärgid:

- Huvipakkuvate kemikaalide 3D-FLU spektre leidmine.
- Huvipakkuvate kemikaalide analüüs CE-FLU meetodiga sisestandardi leidmiseks.
- Huvipakkuvate kemikaalide analüüs CE-FLU meetodiga analüüsi valepositiivse vastuse ohu täpsustamiseks.

Töö on jaotatud kolmeks peatükiks: esimene peatükk annab kanepi ja kannabinoidide ülevaade, samuti vaadatakse THC analüüsi meetodid, kirjeldatakse ka kapillaarelektroforeesi meetodi (CE) fluorestsents detektoriga (FLU) tööpõhimõtte ning THC analüüs selle meetodiga. Samuti on ära toodud kasutatud arvutusvalemid ning peamised põhimõtted. Teine peatükk käsitleb töö

eksperimentaalses osas kasutatud materjale, proovide valmistamise meetodikat ja analüüside teostamise tingimused. Kolmandas peatükis kirjeldatakse ning analüüsitakse eksperimentaalse töö käigus saadud tulemusi, tehakse neist järeldusi. Kõikide analüütide SFS pildid on kättesaadavad pilvelingiga lisa Lisa 1, osa katsete tulemused on lisanud töö sisus.

TEOREETILINE OSA

1.1. Kanep ja kannabinoidid

Kanep ehk Cannabis sativa on laialt levinud üheaastane 2 – 5 meetri kõrgune põõsataoline taim, mis kasvab nii parasvöötmes kui ka troopilises vööndis. Kanepil on erinevaid liike (harilik kanep, india kanep jm) ja hulk kasutusalasid – köie tegemine, toidu valmistamine, ravimite tootmine ja illegaalselt mõnuainena suitsetamine.. (1)

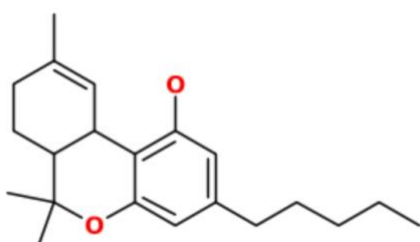
Kannabinoidid on looduslikke ühendite klass, mida leidub kanepis ja selle töötlemisproduktides. Looduslikke kannabinoidide klassi nimetatakse ka fütokannabinoidideks. Keemiliselt kannabinoidid kuuluvad aromaatsete terpenoidide rühma. Kanep võib sisaldada mitut sada (üle 400) farmakoloogiliselt aktiivset ühendit, nende hulgas on umbes 60 – 70 kannabinoidi. (2)

1.2. THC molekul

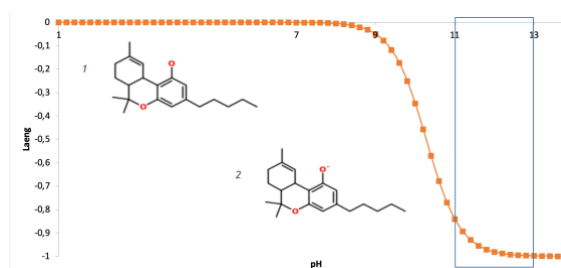
Kõige tuntum kannabinoid on delta-9-tetrahydrokannabinool ehk Δ^9 -THC ehk THC (edaspidi: THC), sest just see aine leidub taimes kõige suuremas kontsentratsioonis ja praeguseks ajaks on kõige rohkem uuritud. THC on peamine psühhoaktiivne aine kanepis, mis mõjutab kannabinoisetele CB1 retseptoritele, mis asuvad enamasti aju närvirakkudes ja CB2 retseptoritele, mis asuvad leukotsüütides ja ka paljudes teistes kudedes, kuid vaatamata sellele esineb tal ka raviomadusi nagu näiteks valuvaigisti, põletiku- ja iiveldus vastane toime. (2,3)

THC molekuli valem on $C_{21}H_{30}O_2$ (Joonis 1), molaarmass on 314,5 g/mol ja pKa väärtus on 10,6, seega kõrge pH juures THC molekul on ioniseeritud. Molekuli CAS number on 1972-08-3 ja kanooniline SMILES – CCCCC1=CC(=C2C3C=C(CCC3C(OC2=C1)(C)C)C)O. (4)

Alustelistes tingimustes tekib elektroni negatiivne laengu loovutamist fenooli hapnikule. (Joonis 2) Hüdroksüülrühmade deprotoneerimise tulemusena tekib THC molekulil üht negatiivset laengut. THC hästi lahustub metanoolis, etanoolis, atsetonitriilis ja dimetüülsulfoksiidis, kuid halvasti lahustub vees. (5)



Joonis 1. THC keemiline struktuur (36)



Joonis 2. THC molekuli laeng pH sõltuvuses (4)

1.3. THC määramismeetodid süljes

Kannabinoidide määramiseks süljes kasutatakse erinevaid analüütiliseid meetodeid. Neid võib jagada kahte rühma: skriiningu meetodid (immunoloogilised kiirtestid), mida on võimalik teostada välitingimustel ja tõestavad meetodid laboris (gaaskromatograafia (inglise keeles *Gas Chromatography* ehk GC), vedelikkromatograafia (inglise keeles *Liquid Chromatography* ehk LG), massispektroskoopia (inglise keeles *Mass Spectroscopy* ehk MS) ja nende kolme erinevad kombinatsioonid nagu GC-MS, LC-MS. Tõestavaid meetodeid kasutatakse sel juhul, kui skriiningu testi tulemus on positiivne.

1.3.1. ELISA meetod

Immuunanalüüsi peamine puudus on kõrge valepositiivsete tulemuste tõenäosus. Proov, mille tulemus on positiivne nõuab alati teist meetodit testi kinnitamiseks.

2013. aastal National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers koguti juhtidelt 1 ml suuvedeliku proovi. THC olemasolu suuvedelikus skriiniti esmalt immuunoensüümmeetodi (ELISA) abil. Selle meetodiga analüüsimisel THC minimaalne tuvastatav skriinimiskontsentratsioon suukauses vedelikus oli 4 ng/ml. Proove, mille THC kontsentratsioon ≥ 4 ng/ml testiti täiendavalt, kasutades LC-MS-MS tehnoloogiat minimaalse tuvastatava THC kontsentratsiooniga suukauses vedelikus 2 ng/ml. (6)

1.3.2. GC-MS meetod

Gaasikromatograafia puhul on vajalik kannabinoidide eelnev derivatiseerimine THC koguse analüüsimisel, sellele sobiks näiteks metüleerimine, atsetüleerimine ja silüülimine. Derivatiseerimisagendid reageerivad kannabinoidide –OH rühmadega (nii alkoholiga kui karboksüülhappega), muutes kannabinoidid lenduvaks ning termiliselt stabiilemaks. Gaasikromatograafia detektoriteks sobivad leekionisatsioonidetektor (FID) ja massispektromeetria (MS) ning kolonniks sobib kitsa läbimõõduga kapillaarkolonn. (7)

Näiteks, 2018. aastal Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) ajakirjas Itaalia teadlased avaldasid oma pilootuuringu tulemusi, mida käsitlesid kannabinoidide määramist kuue inimese suuvedeliku proovi pärast 1 g "kerge kanepi" (THC sisaldus < 0,2 %) suitsetamist. THC kvantifitseerimiseks rakendati valideeritud gaasikromatograafia-massispektromeetria (GC-MS) meetodit. Tulemusena said, et suuvedeliku proovi THC kontsentratsioon oli esimese 30 minuti jooksul pärast suitsetamist vahemikus 2,5 – 21,5 ng/ml ja seejärel vähenesid väärtused aeglaselt. (8)

1.3.3. LC-MS-MS meetod

Vedelikkromatograafias saab määrata THC ilma derivatiseerimiseta. Analüüs toimub üldiselt pöördfaasikolonnis, detektoriks kasutatakse üldjuhul fotodiodmaatriks detektorit ning valguse absorptsiooni registreeritakse lainepikkustel 220 nm ja 240 nm. (7,9)

Näiteks, 2020. aastal Garnet McRae ja Jeremy E. Melanson töötasid välja kvantitatiivse vedelikkromatograafia-tandemmassspektromeetria meetodi, mis on lihtne, usaldusväärne, spetsiifiline ja täpne kanepis ja kanepis sisalduva 17 kannabinoidi analüüsimiseks. Vedel-tahke proovi ekstraheerimine koos lahjendamisega kalibreerimisvahemikus 10 – 10 000 ng/mL and LC-MS/MS-analüüs võimaldab maatriksis mõõta 0,002 – 200 mg/g (0,0002 – 20,0%) proove. (10)

1.4. Kapillaarelektroforees

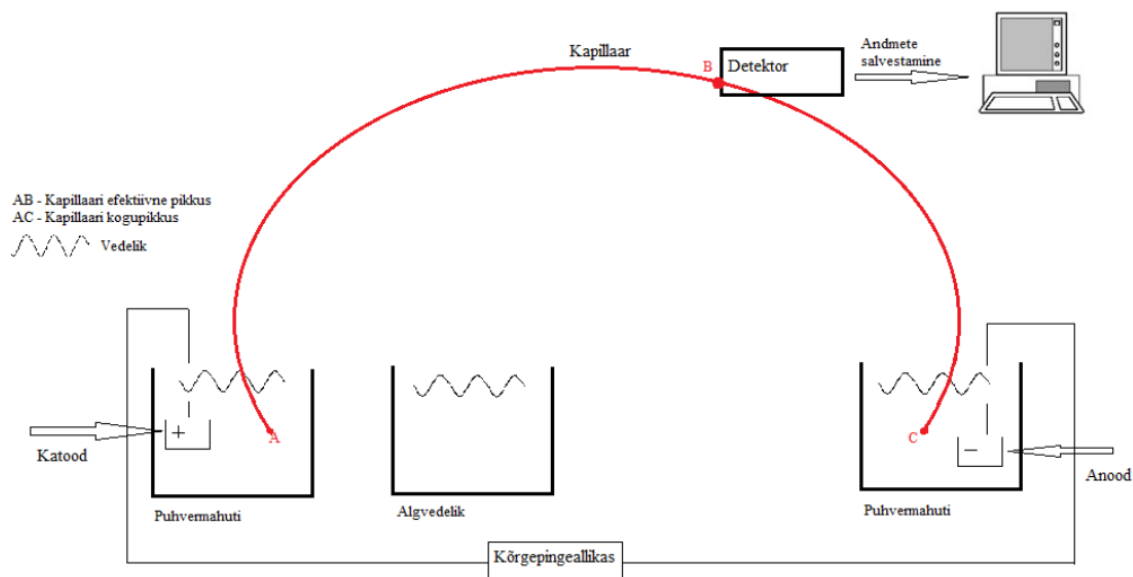
Kapillaarelektroforees ehk KE on lahutusmeetod, mis põhineb laetud osakeste liikumisel erineva kiirusega elektrivälja mõjul kapillaarkolonnis. (11)

Tänapäeval see on üks populaarsematest analüütilistest lahutusmeetoditest maailmas. Efektive lahutamine lühikese aja jooksul, minimaalne reaktiivide ja proovi kogus, seadme mobiilsus ja automatiseerimise võime – kõik see tagab suurepärase võimalused kohapealse analüüsi teostamiseks. Selle meetodi abil saab uurida anorgaanilisi ioone, valke, oligosahhariide, vitamiine ja teisi aineid. (11)

1.4.1. Kapillaarelektroforeesi tööpõhimõte

Kapillaarelektroforeesi metodika ühendab omavahel kolonnkromatograafia ja geel elektroforeesi. Kapillaarelektroforees viiakse läbi kapillaaris, mis on täidetud elektrolüüdiga ehk puhvriga ning laetud analüüdiga ehk prooviga. Rakendades elektrilist kõrgepinget (10 – 30kV) kapillaari otstesse, analüüt migreerub ja on detekteeritav detektoriga. Kapillaari otsad on asetatud puhvriga täidetud anumatesse, millest üks on anood ja teine vastavalt katood. (Joonis 3) (12)

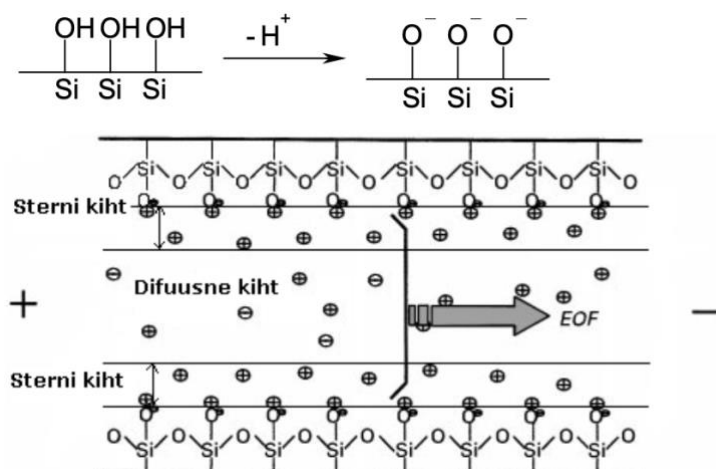
Analüüdid omavad sõltuvalt keskkonna pH-st kas negatiivset või positiivset laengut. Kõrgepinge rakendamisel kapillaarile, hakkavad katioonid (positiivselt laetud ionid) liikuma katoodi suunas (negatiivselt laetud elektrood) ja anioonid (negatiivselt laetud ionid) liiguvad anoodi poole (positiivselt laetud elektrood). Iooni sisaldava lahuses hakkavad ionid liikuma, kui sellele lahusele rakendada elektripotentsiaali. Erinevatel ionidel on erinev liikuvus elektriväljas. Liikuvus on laenguga osakeste omadus, mis iseloomustab, kui kiiresti liigub ion puhvri ja elektrivälja kindla tugevuse juures. Lahutamine toimub laengu ja massi suhte järgi – mida suurema laenguga ning väiksema massiga ion, seda kiiremini ta jõuab detektorini ning väljub kapillaarist. (11,13)



Joonis 3. Kapillaarelektroforeesi skeem.

Elektroforeetilist lahutamist sõltub ka viskoosusest, temperatuurist ja puhvi elektroosmoosse voo kiirusest (EOF). Pingestatud kapillaaris liiguvad mitte ainult analüüsivad ioonid, vaid ka puhver. Seda nähtust nimetatakse elektroendoosmoosiks ehk EOF-ks, kus kogu puhver liigub normaaltingimustes anoodilt katoodile. Elektroosmoos on kiirem, kui ionide liikumine ning avaldab suurt mõju kõikidele lahutatavale ionidele. Neutraalsed ioonid ei lahutu, vaid migreeruvad EOF-ga kaasa. Kuna EOF-ga ületab tavaliselt jõu, mis tõmbab anioone anoodile, anioonid hakkavad migreeruma anoodilt katoodi suunas. Seega on ainete väljumise järjekord selline: kõigepealt väljuvad katioonid, siis neutraalsed ained ja lõpuks anioonid. (11)

Liikumine on põhjustatud sellest, et räni pind kvartstorus on kaetud hüdroksüülrühmaga (-Si-OH), mis pH > 4 juures deprotoneeruvad, ning kapillaari sisepind omandab negatiivse laengu. Puhvis olevad protonid kogunevad difuusse kihina kapillaari sisepinna lähedale. Pingestamisel hakkavad protonid liikuma katoodi poole ning tõmbavad kaasa kogu puhvi. EOF-i kiirus pH = 7 juures saavutab platoo, kus kõik -OH rühmad on deprotoneeritud. (Joonis 4) (11)



Joonis 4. Skemaatiline joonis EOF tekkimisest.

Kapillaarelektroforeesis on tähtis lahutada aineid väikeste erinevuste korral. Ferrogrammil need avalduvad eraldi piikidena. Selleks on vaja, et ainetsoonid kapillaari sees oleksid võimalikult kitsad. Liikumisel elektroosmoosis voolu korral tsooni laienemist ei toimu, kapillaari seinad indutseerivad voolu ja sunnivad kogu vedeliku liikuma, kõik punktid toru ristlõikes liiguvad ühesuguse kiirusega. Erandiks on difuusne kiht kapillaari seina lähedal, mis liigub natuke aeglasem. Tulemusena on KE-s kitsad piigid ning suur kapillaarkolonni efektiivsus. Teine juhtum on liikumine rõhu all kapillaris. Kiirus kasvab nullist seina juures kuni maksimaalseni voolu keskel. Tulemusena on tsoonide laienemine ning madal kapillaarkolonni efektiivsus. (11)

1.4.2. Kapillaarelektroforeesi aparatuur

Kapillaariks on polümeeriga kaetud kvartsist valmistatud toru. Polümeerikate on umbes 15 µm ja toru sisemine diameeter 10-100 µm. Selline kitsas sisediameeter on eriti efektiivne ainete lahutamiseks ning polümeerikate vähendab kvartstoru haprust. Kapillaar jaguneb efektiivseks pikkuseks ning kogu pikkuseks. Efektiivne pikkus on pikkus anoodilt kuni detektorini. Detektoriks on üldiselt UV-detektor või fluorestsentsdetektor. Anumaid on kaks ning need on täidetud sama koguse puhvriga, mis on omavahel ühendatud kapillaariga. Sama puhvri kogus on oluline, et vähendada tasakaalutust, mida tekitab hüdrostaatiline vool. Üks puhvri anum on positiivse laenguga (anood) vasakul ja teine negatiivse laenguga (katood) paremal (Joonis 2). (12) Pingeallikas juhib pinget läbi plaatina elektrootide, mis sukelduvad puhvri anumatesse. Pingeallikas peab hoidma stabiilset pinget (0 - 45 kV) või andma sellele pingele vastavat stabiilset voolu. Voolutugevus on üldiselt 10-100 µA. (11)

1.4.3. Proovi sisestamine

Kapillaarelektroforeesi analüüdi sisestamiseks peamiselt on kaks viisi: kas hüdrodünaamiliselt või elektrokineetiliselt. Hüdrodünaamilise meetodi puhul tõstetakse proovi anum kõrgemale (0,1 – 0,3 m) võrreldes elektrolüüdi anumaga 10-25 sekundiks. Rõhkude vahe tõttu siseneb proov kapillaari. Elektrokineetilise meetodi puhul üks kapillaari ots paigutatakse proovi anumasse ja teine elektrolüüdi anumasse. Rakendatakse kõrgepinget teatud aega ning proov siseneb kapillaari elektroforeesi ja elektroosmoosi teel. Sellel viisil sisenevad kiirema liikuvusega ioonid ehk kui elektroosmootne voog on suunatud katoodile, siis eelistatult kapillaari katioonid. (14)

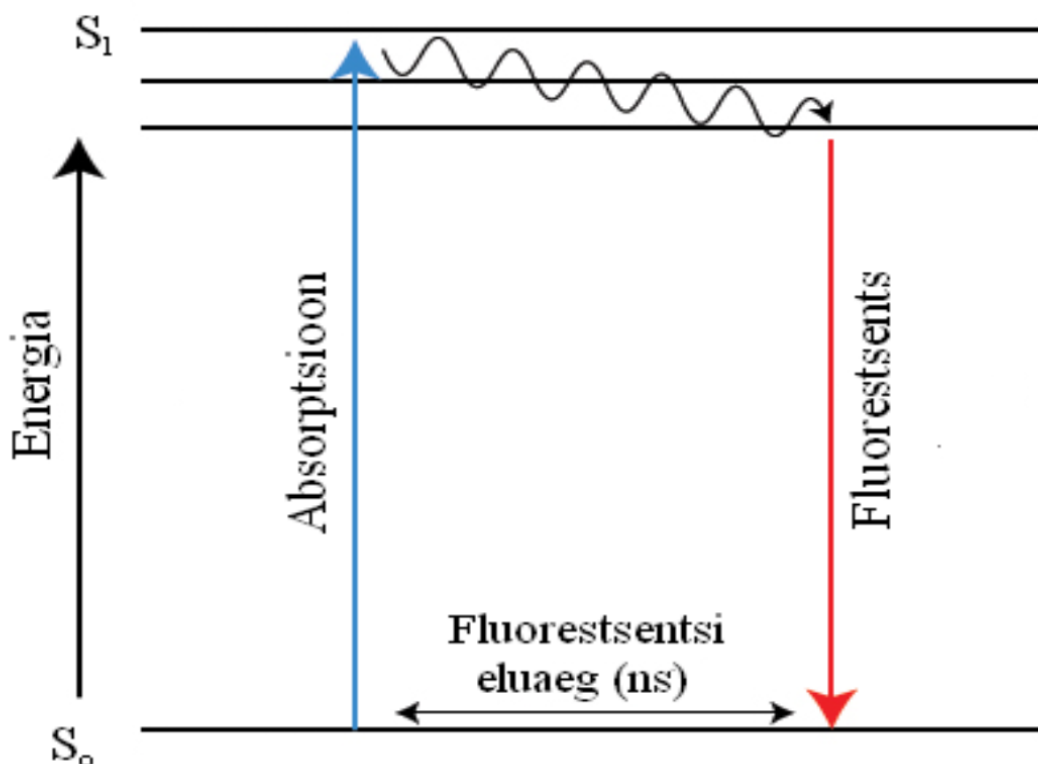
1.4.4. Detekteerimine fluorestsentsdetektoriga

Kapillaarelektroforeesi meetodi puhul kasutatakse kõige enam UV-detektoreid, lisaks ka juhtivusdetektorit, fluorestsentsdetektorit, elektrokeemilisi detektoreid. Detektori tuleks valida huvipakkuva analüüdi omaduste järgi. Antud töös analüütide detekteerimist teostati fluorestsentsdetektoriga.

Fluorestsents on luminesentsi tüüp, mille korral toimub lühiajalist footoni emissiooni. Põhiolekus molekul absorbeerib energiat footoni näol, mistõttu toimub molekuli ergastumine kõrgemale ergastuse astmele. Tavaliselt mõne nanosekundi kuni mikrosekundi möödudes osakesed deergastuvad ehk lähevad tagasi tavaolekusse ja vabastavad energiakvandi kõrgemal lainepikkusel võrreldes ergastuslainepikkusega. (Joonis 5) Ergastunud molekul on seotud teise elektroniga tavaolekus, kusjuures elektronide spinnid on vastassuunalised. Seega on elektrooni naasemine

põhiolekusse spinnide poolt lubatud ning toimub footoni emissioon. Selle energiakvandi registreerib ja salvestab tavaliselt fotokordisti (PMT). Kuid enne sisenemist fotokordistisse, läbib valgus monokromaatorit või filtrit vajaliku emissiooni valguse saamiseks. Tulemused registreeritakse arvutis. (15,16)

Florestsentsdetektor kujutab endast fluoromeetrit, kus vastavas kohas on kapillaari polümeer eemaldatud põletamise teel. Detektor on väga selektiivne ja tundlik, kuna florestseeruvad madalmolekulaarseid aineid ei ole palju. (11) Kasutades eelnevalt 3D spektrofluoromeetrit saab teada, mis lainepikkustel analüüt florestseerub.



Joonis 5. Energia tasemete diagrammis molekuli üleminek põhiolekust S_0 ergastunud olekusse – S_1 . Absorptsiooni ja florestsentsi esinemine ning florestsentsi aeg nanosekundites. (15)

1.5. THC analüüs kapillaarelektroforeesi meetodiga

Antud töös kasutatakse kapillaarelektroforees florestsents detektoriga (CE-FLU) ühe peamise marihuaana kannabinoidi – THC kvantifitseerimiseks suuvedelikus. Teatud meetod võimaldab illegaalset kanepi tarbimist hinnata ligikaudu 10 minutiga, sealhulgas süljeproovide kogumist, proovi ettevalmistus protseduuri ja kapillaarelektroforeesi (CE-FLU) analüüsi.

1.5.1. THC laengu sõltuvus BGE pH-st

Molekul või molekulis olev aatomirühm võib prootoni kaotada või juurde saada, kui molekul asetatakse vesilahusesse. Molekuli protoneerimine või deprotooneerimine sõltub molekuli pKa-st ja lahuse pH-st. (11) pH-väärtus väljendab H^+ ionide sisaldust. pKa väärtus on selline pH väärtus, mille puhul pooled analüüdi molekulidest on ioniseeritud.

Pooled molekulid kaotavad prootoneid, kui lahuse pH = pKa. Mida kõrgem on pH väärtus, seda tõenäolisemalt molekul kaotab prootoni. Lahuse prootonite kontsentratsioon muutub kõrgema pH korral madalamaks, võimaldades seeläbi vastu võtta rohkem prootoneid. (11)

Teades analüüsitavate ainete pKa väärtusi on võimalik leida sobivat BGE pH väärtust Henderson – Hasselbalch-i võrrandi (2) järgi:

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (2)$$

kus

[AH] on dissotseerimata aine (antud juhul kannabinoidi) hulk;

[A⁻] on dissotseerunud aine hulk. (17)

Seega mida lähemal on kannabinoidi pKa väärtus BGE pH väärtusele, seda rohkem on analüüsitav aine ioniseeritud, mis võimaldab kannabinoide paremini lahutada. Samuti tuleb arvestada sellega, et ühendite pKa-d orgaanilistes solventides võivad muutuda, nt happeliste ühendite pKa-d MeOH-s reeglina suurenevad. (17)

Kui pKa = pH, siis pooled molekulidest on dissotsieerunud ning poolmolekuli ei ole ehk 50% / 50%. Mida kõrgem on pH väärtus, seda rohkem molekul on deprotoneeritud. (17)

Molekuli deprotoneerimise/protoneerimise vormi kohta konkreetse pH juures saab teada, kasutades nii nimetatud Thumbi ionisatsiooni % reeglit:

- Kui pH ≥ pKa + 2 aine on oma deprotoneeritud vormis (99%);
- Kui pH = pKa 50%/50% protoneeritud/deprotoneeritud vormis;
- Kui pH ≤ pKa - 2 aine on protoneeritud vormis (99%). (17)

1.5.2. Analüüdi struktuur FLU analüüsimiseks

Fluorestseeruvad molekulid ja materjalid on igasuguse kuju ja suurusega. Mõned neist on oma olemuselt fluorestseeruvad, näiteks klorofüll ja aminohappejääk trüptofaan (Trp). Teised on molekulid, mis on sünteesitud spetsiaalselt stabiilsete orgaaniliste värvainete või määrgistena, mis lisatakse muidu mittefluorestseeruvatele süsteemidele. (18)

Fluorestsentsi nähtus esineb enamasti molekulidel, mis sisaldavad aromaatsset tuuma või mitut konjugeeritud sidet, millel on kõrge resonantsi stabiilsus. Mõlema aineklassi puhul on olemas delokaliseeritud π-elektronid, mida saab viia ergastatud olekusse. (19)

Mitme kondenseerutunute tsüklitega ühenditel on fluorestseeruvad omadused. Elektroone loovutavad rühmad nagu NH₂, OH ja OCH₃ suurendavad fluorestsentsi, samas kui elektrone eemaldavad rühmad nagu COOH, -N=N- kipuvad seda vähendama. Konjugeeritud kaksiksideme struktuurid kombinatsioonis alifaatsete või alitsükliliste ainetega näitavad fluorestsentsi. (20)

1.5.3. Süljeproov THC analüüsimisel

Sülj on muutunud populaarseks ja tähtsaks alternatiivseks bioloogiliseks maatriksiks (näiteks veri, uriin) narkootikumide tuvastamisel, kuna omab rida eeliseid, mida teistel bioloogilistel vedelikkudel pole. Sülje proovi võtmine on väga lihtne, ohutu ning mitte invasiivne vere prooviga võrreldes. Samuti sülj võib olla kogutud avalikult, mis omakorda vältib võltsimist.

Puhas sülje maatriks sisaldab 99,5% vett, 0,3% valku ning 0,2% anorgaanilisi ja orgaanilisi aineid. Kõige peamised anorgaanilised koostisosad on naatrium, kaalium, kaltsium, magneesium, kloriidid ja karbonaadid, samas kui orgaanilised komponendid on amülaasid, peroksidaasid, lipaasid, mutsiinid, lüsoosüüm, laktoferrin, kallikreiinid, tsüstatiinid, hormoonid ja kasvufaktorid. (21)

Kõige paremini süljes detekteerimiseks sobivad keelealuselt ja suitsetamise teel manustatavad ained, kuna süljes detekteeritakse pigem narkootikumi aktiivset vormi, mis on just joobe indikaatoriks, aga mitte selle metaboliite. (22)

Kannabinoide manustatakse suitsetamise teel või keelealuse pihustina ning sülje mukoos kohe imab kannabinoide aurudest enda sisse. Lisaks kannabinoidid süljes ei metaboliseeru kiiresti ning esimesed 1-2 tundi pärast suitsetamist nende sisaldus süljes on kõrge. THC 6,8% sisaldusega sigaretti suitsetamist THC sisaldus süljes võib ulatuda kuni 22370 µg/l (30 minutit pärast suitsetamist). Kannabinoide kontsentratsioon süljes järsult langeb 2 tundi möödudes, iga tunniga 10-kordses ulatuses. (23)

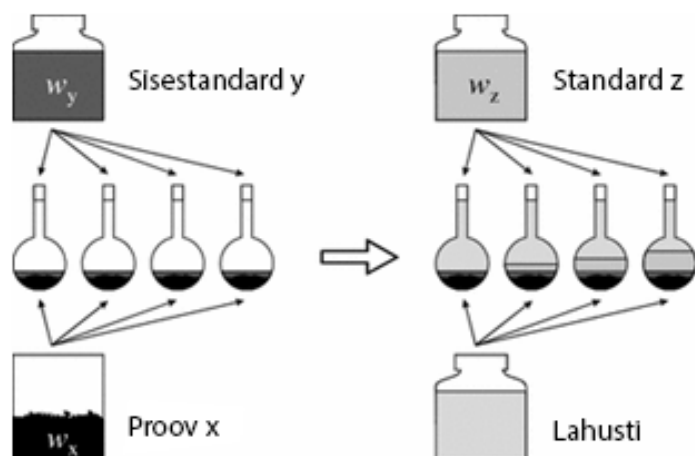
1.6. Sisestandard

Kapillaarelektroforeesi meetodil kasutatakse täpsemate tulemuste saamiseks sisestandardeid (inglise keeles *Internal Standard* ehk *IS*), mis kujutavad endast analüüsitavatele ainetele lähedaste omadustega aineid, mis lisatakse uuritavatele proovidele nende analüüsiks ettevalmistamise käigus. (24)

See meetod põhineb asjaolul, et sisestandardi ja analüüdi kontsentratsiooni suhe jääb konstantseks isegi siis, kui näiteks instrumendi triiv või proov kaob töötlemise ajal või ei ole täielikult seadmesse sisestatud. Nendel asjaoludel lähevad kaotsi nii proov kui ka sisestandard, kuid kontsentratsioonide suhe (analüüdi kontsentratsioon / sisestandardi kontsentratsioon) jääb konstantseks ja seega jääb signaalide suhe konstantseks (analüüdi signaal / sisestandardi signaal). (25)

1.6.1. Sisestandardi kasutamine

Kui instrumentaalne signaal või katseprotseduur võib tulemustesse muudatusi tuua, siis tohib nende probleemide kompenseerimiseks kasutada sisestandardit.



Joonis 6. Sisestandardi sarnane kogus lisatakse proovidele ning maht täiendatakse lahustiga.

Esimesena valmistatakse analüüdi teadaoleva kontsentratsiooniga lahused. Sarnane kogus sisestandardit lisatakse ka proovidele ning maht täiendatakse lahustiga. (Joonis 6) Registreeritakse analüüdi ja sisestandardi instrumentaalne signaal. Analüüdi signaali ja sisestandardi signaali suhe kantakse graafikule analüüdi kontsentratsiooni suhtes standardlahustes. Arvutatakse analüüsitava aine signaali suhe proovis / sisestandardis. Saadakse lineaarvõrrand $y = mx + b$. Analüüdi kontsentratsioon arvutatakse, lahendades x , kui y on analüüdi signaali ja sisestandardi signaali suhe tundmatus proovis. Kalibreerimiskõvera loomiseks võib kasutada üht standardit või mitut standardit. (26)

1.6.2. Sisestandardi valimine

Kui tehakse kindlaks, et sisestandardi kasutamine tõenäoliselt parandab andmete kvaliteeti, tuleb IS-i jaoks valida sobiva ühendi. Kapillaarelektroforeesi meetodi kasutades saab piikide migratsiooniaja ennustada, kuna nende migratsiooniaeg sõltub analüüdi suuruselt ja laengust.

Sisestandardi valimise peamine nõue on see, et aine annaks hea piigi kuju ja eraldataks huvipakkuvatest analüütidest ja mis tahes muudest eraldamise piigidest. Lisaks sisestandard peaks olema piisavalt stabiilne lahustis, et vältida lagunemissaaduste teket, mis võiksid tulemusi segada. Ka sisestandard ei pea proovi ettevalmistamise või analüüsi käigus lagunema. See omadus tähendab rohkem mugavust, nii et standardlahused hoitakse kauem, ei pruugi olla vaja jahutamist või külmutamist. Toksilisus peaks olema minimaalne, et vähendada võimalikke riske. Sisestandard peaks ka piisavalt odav olema ja kergesti kättesaadav. (27) Mängib rolli ka detektori piisav vastus. See ei pea aga olema analüüdi sarnast, kuid see peab olema kergesti tuvastatav.

Sisestandardil peavad olema sarnased omadused analüüdiga – need on retentsiooniajad, stabiilsus ja detektori reaktsioon, seega on väga tõenäoline, et tegemist on sarnase struktuuriga ühendiga. Enamik sisestandardeid on olemasolevad ühendid, millel on analüüdiga tihe struktuurne seos, analüüdi spetsiaalselt sünteesitud modifikatsioonid või konkreetse meetodi jaoks stabiilse määrgistusega ühendid, kus määrgistamata analüüdis on asendatud mitu süsinik või deuteeriumi aatomit. (27)

Ideaalis sisestandardi väljumiseaeg peaks olema kauem, kui analüüdil, kuid see on pigem soovitus kui vajadus. Kui sisestandard elueeritakse pärast analüüdi, võib see pakkuda lisateavet eraldamise kvaliteedi kohta. Näiteks kui sisestandardi retentsiooniaeg on õige, siis kapillaarelektroforeesi tingimused on õiged kuni selle punktini ferogrammil, ja sama on õiged kõike varem elueeritud piikide retentsiooniaega. Kui soovitatakse sisestandardi väljumine enne uuritava analüüdi madala pH juures, siis vajatakse sisestandard vähema molekulaarmassi või suurema arvu positiivsete laengutega. (27,28)

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Aparatuur ja töövahendid

Lahuste tegemiseks kasutati 10 µl, 20 µl, 200 µl ja 1000 µl mahuga kalibreeritud automaatpipette. Proove kaaluti analüütilistel kaaludel.

2.1.1. 3D-FLU aparatuur

Spektraalkujundite meetod ehk SFS on üheks fluorestsentsi meetodiks, antud töös SFS mõõtmised viidi läbi NarTest NTX2000 analüsaatoriga. SFS saadakse liites omavahel uuritava aine emissioonispektrid erinevatel ergastuse lainepikkustel. Tulemused salvestatakse fluorestsentsi intensiivsuse maatriksisse, kus koordinaatideks on emissiooni- ja ergastuse lainepikkused konkreetses „aknas“ – standardakna puhul ergastus lainepikkustega 230 – 350 nm ning emissiooni lainepikkustega 250 – 565 nm. (15)

NarTest NTX2000 analüsaatori valgusallikaks on impulss-Xe lamp võimsusega 5W, mis läbib enne ja pärast proovi ergastusmonokromaatori ja seepärast saabub detektori. Mõõtmised teostati 10 ml ruumalaga kvartsaknaga küvetis toatemperatuuril. Tööpõhimõte põhineb proovi fluorestsentsi erinevatel ergastus- ja emissiooni lainepikkustel intensiivsuse mõõtmisel. Protsess toimub automaatselt ja võtab 5-15 minutit. (29)

Andmete interpreteerimiseks ja analüüsiks kasutati NarTest NTX2000 analüsaatori tarkvara, Microsoft Excel, Microsoft Word.

2.1.2. CE-FLU aparatuur

Katsete teostamiseks kasutati Tallinna Tehnikaülikooli Keemia ja biotehnoloogia instituudi (TalTech, Eesti) poolt välja töötatud teise põlvkonna Drug Hunter narkoanalüsaatori, mis on varustatud fluorestsents detektoriga (TalTech, Eesti).

Kapillaariks on polümeeriga kaetud kvartsist valmistatud toru. Installeeritud kapillaarikasetis kvartskapillaari (Polymicro) dimensioonid: totaalne pikkus = 38 cm, efektiivne pikkus = 20 cm, sisediameeter = 75 µm, välisdiameeter = 350 µm. Optimeeritud TE sisaldas 25 mM NaOH, 8,5 mM H₃PO₄ ning 60% MeOH (pH 11,5).

Piikide identifitseerimise viidi läbi DH-sse integreeritud ekspertsüsteemi poolt ja analüüsimiseks kasutati Microsoft Excel.

2.2. Katsete läbiviimise tingimused

Kvartskapillaari üldpikkuseks oli 38 cm, efektiivne pikkus 20 cm ning sisediameeter 75 µm. Kapillaarile rakendatav pinge oli 25 kV ning voolutugevus 35 µA. Proov sisestati automaatselt, hüdrodünaamiliselt meetodil, 40 mbars*s. Analüüs viidi läbi koos termostabiliseerimisega ehk kapillaarikasetis oli 20°C.

Uus kapillar pesti enne analüüsi 3 minutit MeOH, seejärel 1 minutit 0,1 M HCl lahusega, 2 minutit Milli-Q veega, 3 minutit 0,1 M NaOH lahusega, 3 minutit Milli-Q veega ja 3 minutit kasutatava puhvriga. Katsete vahel kapillaari pesti 1,5 minutit 0,1 M NaOH lahusega, 1 minutit Milli-Q veega ja 1 minutit kasutatava puhvriga. Kõik etapid teostati 40 mbars*s rõhu all. Puhvri vialid uuendati enne iga järgmist katset.

2.3. Proovid, kemikaalid ja reagentid

Puhvri valmistamiseks ja kapillaari pesemiseks kasutati 0,1 M soolhape (HCl) (*Fluka*), 0,1 M naatriumhüdrosiidi (NaOH) (*Fluka*), atsetonitrili (ACN) (*CHROMASLOV*), metanool (MeOH) (*CHROMASLOV*) ja fosforhapet (H₃PO₄) (*Fisher Scientific*, 85%). Deioniseeritud vesi (*Milli-Q*) andis Milli-Q integreeritud veepuhastussüsteem.

Töös kasutatud ravimite ja reagentide lahused on jaotatud ravimregistri vastavalt sobiva kategooriasse:

- **Seedekulga ja ainevahetus:** Faringodol (koliinsalitsülaat), Nexium (esomeprasool), Controloc (pantoprasool), Imodium Instant (loperamiid), Nolpaza (pantoprasool), Magnesium-Diasporal 400 (magneesiumtsitraat, magneesiumoksiid), Panangin (kaaliumaspartaat, magneesiumaspartaat), Рибоксин (inosiin), Спазмалгон (pitofenoon, Naatriumi metamisool, fenpiveriinbromiid), Аскорутин (rutiin, askorbiinhape), Milgamma N-süstelahus (tiamiin, püridoksiin), Gum Paroex (kloorheksidiin diglükonaat), Elmex (naatrium-monofluorofosfaat), Parodontax EXTRA Fresh (naatriumfluoriid), Dentalux Complex 3 (hüdreeritud ränidioksiid), Colgate Plax Cool Mint (naatriumfluoriid), Rainbow suuvesi (naatriumfluoriid), ProntOral (polüaminopropüül-biguaaniid), Eludril Classic (kloorheksidiin, klorobutanool), Aktiveeritud süsi.
- **Veri ja vereloomeorganid:** Hjertemagnyl (atsetüülsalitsüülhape, magneesiumoksiid), Кардиомагнил (aspiriin, magneesiumoksiid).
- **Kardiovaskulaarsüsteem:** Dopamine (dopamiin), Co-Ramicor (ramipriil, hüdroklorotiasiid), MoxonidinHEXAL (moksonidiin), Nitresan (nitrendipiin), Roxardio (rosuvastatiin), Propanorm (propafenoon), Troxevasin (trokserutiin), Corinfar retard (nifedipiin), Cordarone (amiodaroon), Nolitrex (perindopriil), Enelbin 100 retard (naftidrofurüül), Adelphane-Esidrex (reserpiin, dihüdralasiin, hüdroklorotiasiid), MetoZok (metoprolol), Sortis (atorvastatiin), Propra-Ratiopharm (propranolool), Renitec (enalapriil), Верапамил (verapamiil), Капотен (каптоприл), Конкор (bisoprolol).
- **Dermatoloogias kasutatavad ained:** Sulfargin (hõbesulfadiasiin), Фурацилин (nitrofuraal), Супрастин (kloropüramiin), Гидроперит (karbamiidperoksiid), Левомеколь (kloramfenikool, 6-metüüluratsiil).
- **Infektsioonivastased ained süsteemseks kasutamiseks:** Amoksiklav (amoksitsilliin, klavulaanhape), Valtrex (valatsikloviir), Фурадонин (nitrofurantoiin), Klotrimasool GSK (klotrimasool), Cycloferon (Meglumiinakridoonatsetaat), Мазь фурацилиновая (nitrofuraal).
- **Süsteemsed hormoonpreparaadid, v.a. suguhormoonid ja insuliinid:** Hydrocortisone DAK (hüdrokortisoon)

- **Skeleti-lihassüsteem:** Nalgesin S (naprokseen), Ibumax (ibuprofeen), Diclofenac-Ratiopharm (diklofenak), Dolmen (deksketoprofeen), Meloxican-ratiopharm (meloksikaam), Betiral (atseklofenak), Кетонал (ketoprofeen), Кетанов (ketorolak), Травмостоп (taimeekstraktid), Гель для массажа радикулитный бальзам.
- **Närvisüsteem:** Upsarin C (atsetüülsalitsüülhape, askorbiinhape), Betahistine Actavis (beetahistiin), Co-Codamol (paratsetamool, kodeiin), Diazepex (diaseraam), Винпоцетин-Акри (vinpotsetiin), Циннаризин (tsinnarisiin), Корвалол (fenobarbitaal, etüül 2-bromovaleraat), Ханак (alprasolaam), Пенталгин-Н (Metamisool naatrium).
- **Hingamissüsteem:** Neo-Angin (amüülmetakresool, diklorobensüülalkohol, levomentool), Strepsils Honey & Lemon (amüülmetakresool, diklorobensüülalkohol), Loratidine (loratidiin), Brontex (ambroksool), Zyrtec (tsetirisiin), Tavegil (klemastiin), Ореха (bilastiin), Jox (joodpovidoon, allantoiin), Bromhexine-Grindeks (broomheksiin).
- **Meeleelundid:** Artelac (hüpromelloos).
- **Varia:** Vertigoheel (homöopaatilised preparaadid), Nervostrong (Mg, L-trüptofaan, naistepuna, viirpuu, palderjan), Норкин жир (hüdrogeenitud kastoorõli), Senade (senna lehtede ekstrakt), Доктор Носов здоровое дыхание (taimeekstraktid).
- **Reagendid:** Briljantsinine, *Basilen Blue E-36*, Reaktiivoranž 14, Reaktiiv roheline 5, Reaktiiv punane 120, Happeroheline 50, Reaktiiv sinine 4, Resortsinool, Kvertsetiin, Dinaatrium 4-nitrofenüülfosfaat heksahüdraat, Nitrofenool, Ftaalhape, Antraniilhape, 3,5-Dinitrobensoehape, 4-tert-butüülfenool, 4-Hüdrosübensoehape, p-Kumaarhape, 2,6-di-tert-butüül-4-metüülfenool, Eugenool, Fenoolftaleiin, 3,5-ksülenool, Dibensüülfosfaat, L-fenüülalaniin, Klorotümoool, 1,2,4,5-tetra benseenkarboksüülhape, Pürogallool, Naringiin, Kohvhape, α -tsüano-4-hüdrosükaneelhape, Kurkumiin, 2-kloroetüül-p-tolueensulfonaat, Katekool, DEAE-dekstraan, Klorogeenhape, Floroglütsinool, 4-propüülresortsinool, 2-naftool, Karvakrool, Hüdrokiinon, 4-aminobensoehape, Fluorestseiin. (30)

2.4. Proovide ettevalmistus

Apteegist saadud tabletti valmistati vastavalt toimeaine sisalduse ühes pillis. Toimeaine sisalduse korral < 100 mg kasutati 15 ml tsentrifuugituube, suurema sisalduse korral kasutati 50 ml tsentrifuugituube.

Terve(d) pill(id) lahustati H₂O-s ja anti 10 minutit seisma, mille pärast vortexiga kokku segati. Lisati lahusele MeOH ja uuesti segati kokku vortexi-ga. Lõpuks lisati 1 M NaOH lahust ja panti seisma 30 minutiks toatemperatuuril. Tahkete ainete, hambapastade, kreemide ja salvide korral kaaluti analüüdi soovitud kogus analüütilistel kaaludel, vedeliku ainete korral võeti vajalikku mahtu, edasi lahuseid tehti samamoodi nagu tervete pillidega.

Kuna peaaegu kõik tabletid sisaldavad lahustumatuid abiaineid nagu tärklis, maisitärklis, talk jm, ka tabletide kate mängib lahustuve protsessis rolli, seega peaaegu alati osa tabletist jäi lahustamata.

Alglahusest valmistati edasised lahused kontsentratsiooniga 2 mg/mL või 1:10 lahjendus või 5:5 lahjendus (väga väikeste kontsentratsioonide korral). SFS mõõtmised tehti 3 erineval viisil:

- analüüt + MeOH
- analüüt + 25 mM NaOH + 8,5 mM H₃PO₄ + 60% methanol (pH 11,5)

- analüüt + 25 mM NaOH + 8,5 mM H₃PO₄ + 60% methanol + NaCl (pH 11,5)

Edasi tehti tõestav meetod CE-FLU, kui SFS mõõtmisel analüüt fluorestseerus vahemikus 260 x 305 nm lainepikkustel.

Enne kapillaarelektroforeesi katsete läbiviimise pesti kapillaar. Süljeproovi võtmine algas doonori suu loputamisega 5 ml füsioloogilise lahusega (NaCl). Pärast 10 – 20 sekundit sülitatakse proovi süljetopsi. 5 ml viaali lisati 1 ml sülge, 1 ml sisestandardi ja analüüdi vajalik kogust. Seejärel segu võeti süstlaga, voolutati segu läbi tahke faasi ekstraktsiooni (inglise keeles *solid phase extraction* ehk SPE) padrundi ja saadeti analüüsiks.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. THC fluorestsents

Paljud kannabinoidid on fluorestseeruvad ained. Seda põhjustavad nende koostises olevad kaksiksidemeid ja aromaatsset tsüklit –OH rühmadega, mis delokaliseerivad π -elektrone ja on võimelised ergastuma selle toimet.

Kirjanduses leiti, et THC omab kaks ergastusmaksimumi $\lambda_{1ex/em} = 230/305$ nm ja $\lambda_{2ex/em} = 260/305$ nm, kus λ_{ex} – ergastuskiirguse lainepikkus (inglise keeles *excitation wavelength*) ja λ_{em} – emissiooni kiirguse lainepikkus (inglise keeles *emission wavelength*). (31)

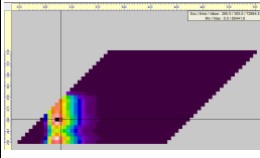
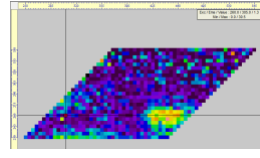
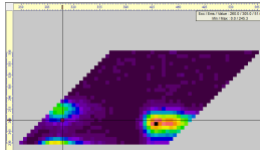
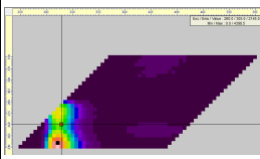
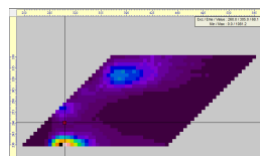
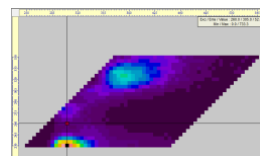
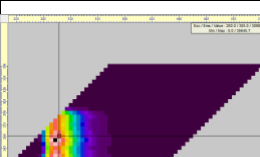
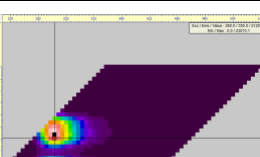
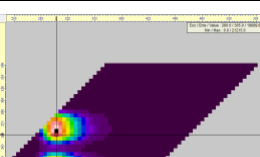
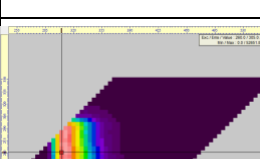
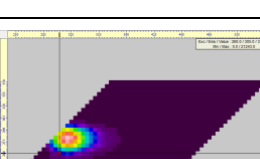
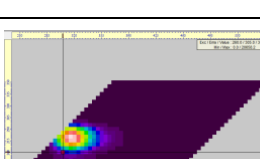
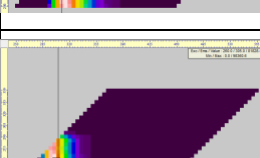
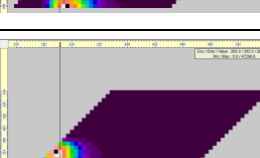
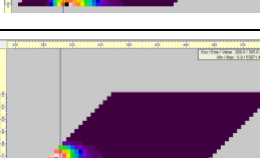
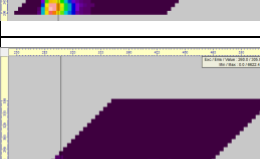
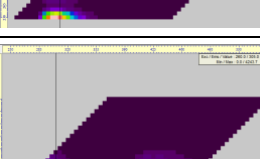
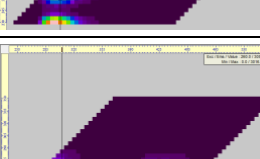
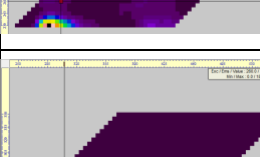
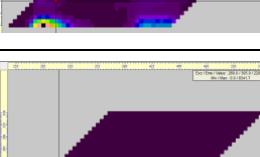
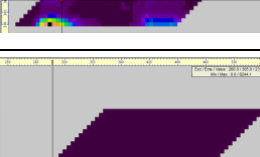
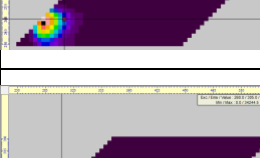
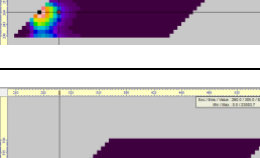
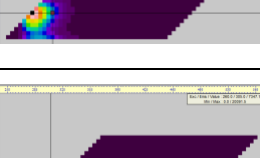
Antud töös kannabinoidide detekteerimine teostati teisel maksimumil 260/305 nm.

3.2. Spektraalkujundite meetod

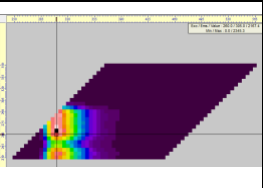
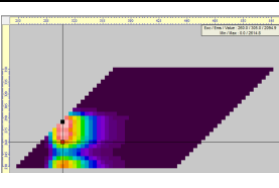
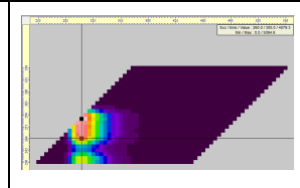
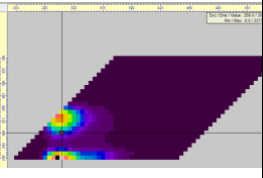
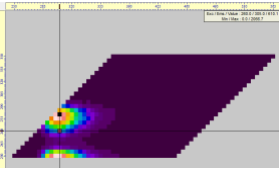
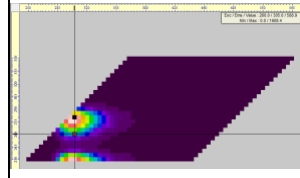
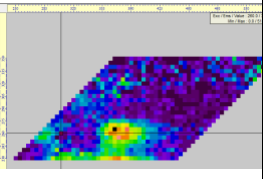
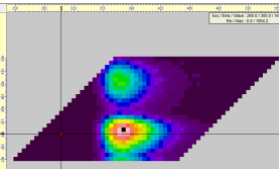
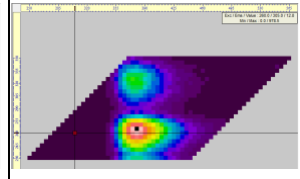
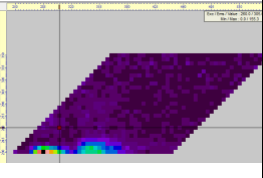
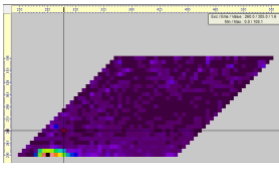
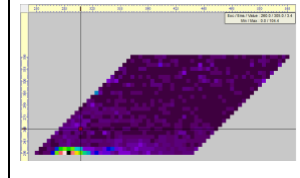
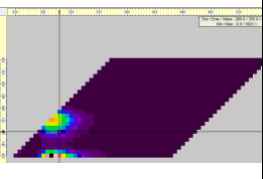
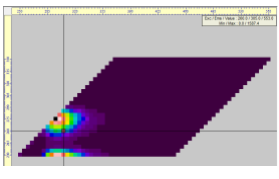
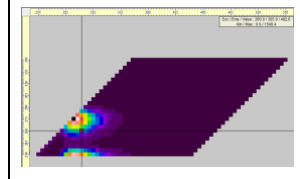
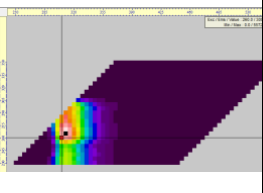
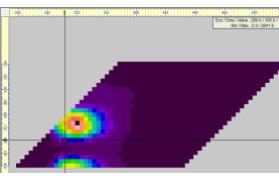
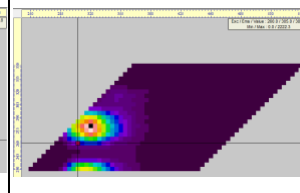
Tuvastati erinevate reagentide ja ravimite iseloomulik spektraalkujund SFS ning määrati vastavate ainete intensiivsemad punktid, kus horisontaalteljel on emissiooni lainepikkus nanomeetrites ning vertikaalteljel ergastuse lainepikkus nanomeetrites.

Iga aine jaoks määrati iseloomulik fluorestsentsi spektr (Tabel 1). SFS spektraalkujundid on saadaval töö lõpus lingiga (Lisa 1). Tabeli on lisatud vaid need ained, mis fluorestseeruvad vahemikus 260 x 306 nm lainepikkustel.

Tabel 1. Fluorestseeruvate 260/305 nm lainepikkustel ainete SFS pildid.

Analüüt (toimeaine), kontsentratsioon	SFS pildid		
	Analüüt MeOH lahuses	Analüüt 25 mM NaOH + 8,5 mM H ₃ PO ₄ + 60% MeOH lahuses	Analüüt 25 mM NaOH + 8,5 mM H ₃ PO ₄ + 60% MeOH + NaCl lahuses
Karvakrool, 2 mg/ml			
Amoksitsilliin, 2 mg/ml			
Resortsinool, 2 mg/ml			
Eugenool, 2 mg/ml			
3,5-ksüleenool, 2 mg/ml			
Dibensüülfosfaat, 2 mg/ml			
β-Phenyl-α-alanine, 2 mg/ml			
2-kloroetüül-p- tolueensulfonaat, 2 mg/ml			

Tabel 1. Fluorestseeruvate 260/305 nm lainepikkustel ainete SFS pildid.

<p>2,6-di-tert-butüül-4-metüülfenool, 2 mg/ml</p>			
<p>2,4-diklorobensüülalkohol, 0,024 mg/ml</p>			
<p>Reaktiivoranž 14, 2 mg/ml</p>			
<p>Reaktiiv punane 120, 2 mg/ml</p>			
<p>4-tert-butüülfenool, 2 mg/ml</p>			
<p>Klorotüümol, 2 mg/ml</p>			

3.3. CE-FLU

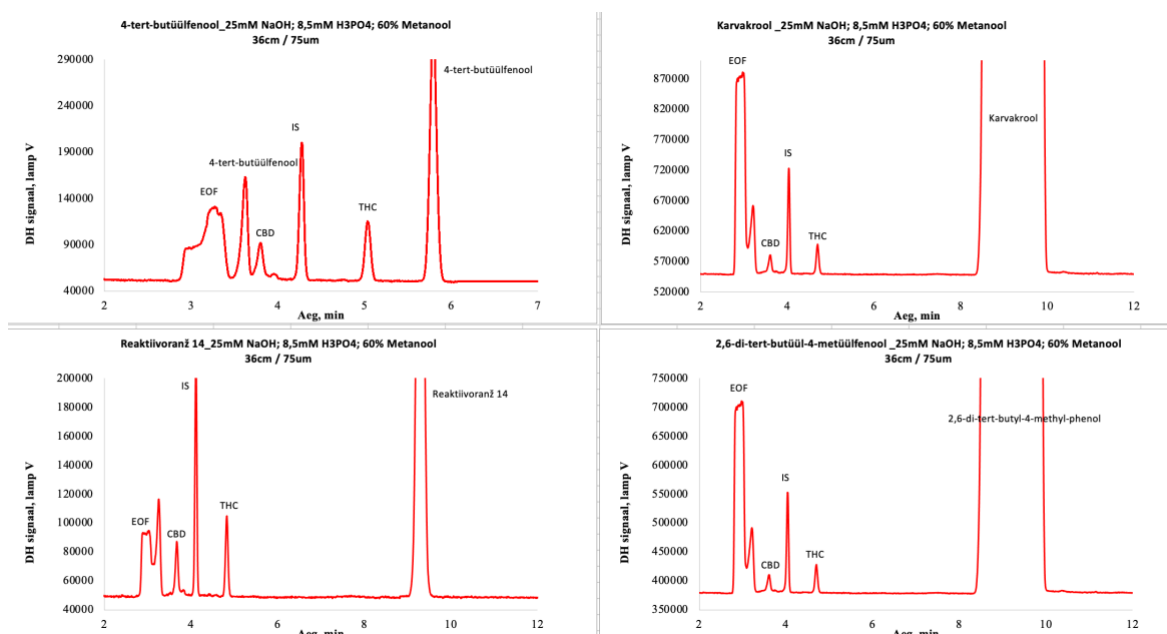
Antud töö eesmärkideks oli huvipakkuvate kemikaalide analüüs CE-FLU meetodiga sisestandardi leidmine ja CE-FLU analüüsi valepositiivse vastuse ohu täpsustamine.

Antud KE katsetes osakeste liikumine toimus anoodilt katoodile, kuid osakeste väljumine sõltus laengust. Efektiivne lahutuvusega tegelesid projektis juhendajad alates 2020. Seega nende poolt pakutud taustelektrolüüd on 25 mM NaOH, 8,5 mM fosforhape ja 60% metanooli, pH 11,5. Taustelektrolüüdi kõrge aluseline pH on oluline, et tagada antud kannabinoididele kui ka sisestandardile negatiivne laeng. THC pKa väärtus on 10,6, M = 314,5 g/mol – seega kõrgel pH-l THC peab olema ioniseeritud. Hüdroksüülrühmade deprotoneerimise tulemusena tekib tetrahüdrokannabinoolil üks negatiivset laengut. Sisestandardiks kasutati bikalutamiid (pKa = 12,0, M = 430,4 g/mol), mis ka deprotoneerub aluselises keskkonnas ning omandab negatiivse laengu.

Vastavalt KE tööpõhimõttele peaks ferogrammil kannabinoidide väljumisjärjekord olema vastupidine saadud tulemusel: kõigepealt peaks väljuma THC ja seejärel CBD. Kuigi aluselistes tingimustes õhu juuresolekul oksüdeeritakse kannabidiool kinooniks ning selle tulemusena CBD molekulil laeng peaaegu puudub ja CBD väljub lähedalt EOF-ile. (31) Kuna THC-l tekib alustelistes tingimustes elektroni loovutades negatiivne laeng fenooli hapnikule, siis THC osakesed väljuvad pärast CBD molekule. (32)

3.3.1. Sisestandardi leidmine

Sisestandardina kasutamiseks sobivad ained, mida inimesed ei tarvita söögiks, aga need ained on võimalik leida, näiteks kosmeetiliste hooldustoodete koostises.



Joonis 7. Sisestandardiks sobivate ainete ferogrammid: 4-tert-butüülfenool, Karvakrool, Reaktiivoranž 14, 2,6-di-tert-butüül-4-metüülfenool.

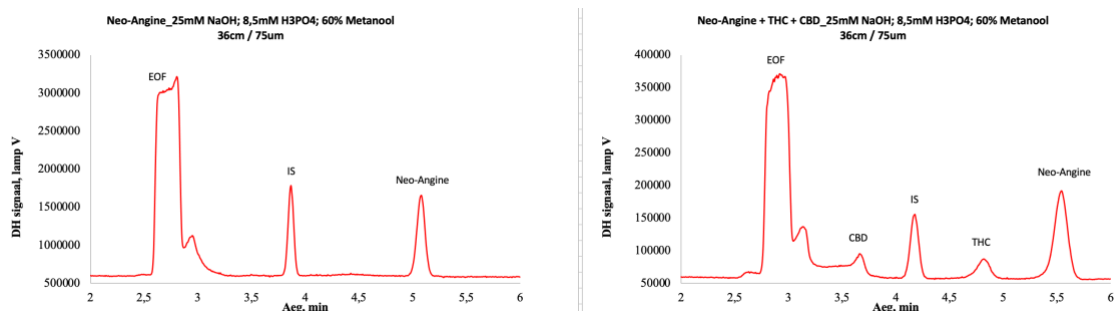
Tulemuseks on saanud, et sisestandardina saab kasutada järgmised reagente: 4-tert-butüülfenool, Karvakrool, Reaktiivoranž 14, 2,6-di-tert-butüül-4-metüülfenool. (Joonis 7). Kõik need väljuvad 5 minutil, pärast CBD ja enne THC.

3.3.2. Selektiivsus ja spetsiifilisus

Selektiivsus (inglise keeles *selectivity*) on meetodi võime mõõta vaid analüüdi sisaldust ning mitte olla mõjutatud teiste ainete sisaldumisest proovis – antud töös selektiivsus näitab analüütide eristamise võime sisestandarditest ja süljest. Ning omakorda on spetsiifilisus (inglise keeles *specifity*) absoluutne mõiste, mida kirjeldab "kõrgeim selektiivsuse aste" – spetsiifilisus on 100% selektiivsus. (33,34)

Neo-Angine-i (ATC kood: R02AA95) üks loseng sisaldab 1,20 mg 2,4-diklorobensüülalkoholi, 0,60 mg amüülmetakresooli, 5,90 mg levomentooli. Abiained on tähtaniisiõli, piparmündiõli, sukroos, viinhape, vedel glükoos, Ponceau 4R punane (E 124). (35) Neo-Angine-i analüüsi tulemusena CE-FLU meetodiga on näha elektroferogrammil IS ja Neo-Angine, aga THC ja CBD ei ole. Seepärast oli teinud ka Neo-Angine-i analüüsi 2,5 ppm THC ja CBD segu lisamisega. (Joonis 8). Kuna peamised Neo-Angine-i toimeained ei fluorestseeru, siis on raske täpselt öelda, mis konkreetne toimeaine fluorestseerub, aga teoreetiliselt see võib olla värv- ja lõhnaaine – Ponceau 4R punane.

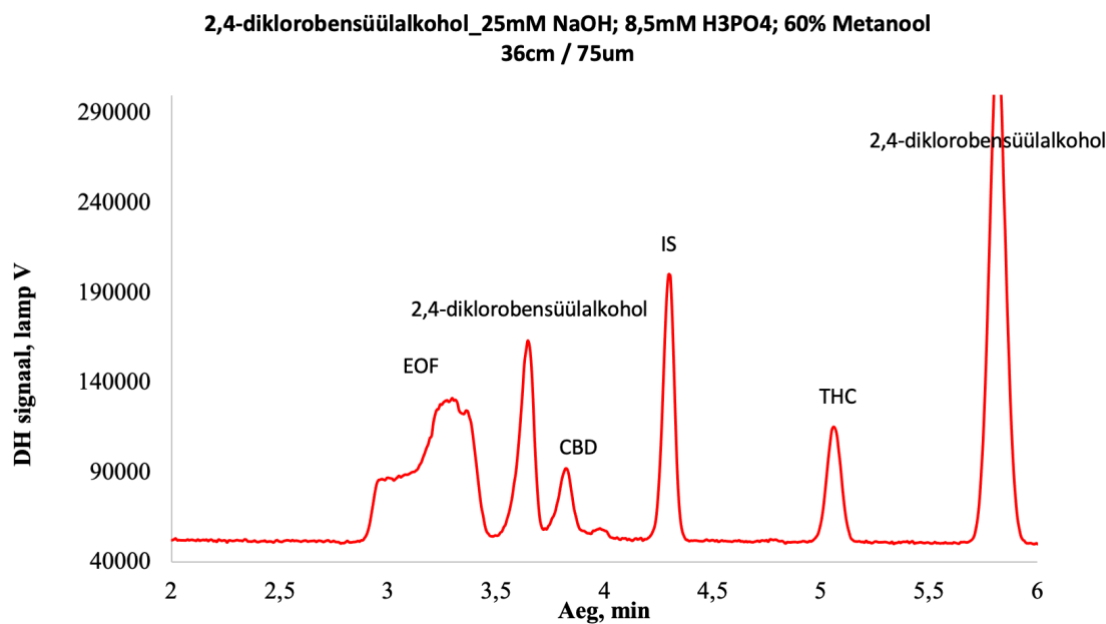
Järelduseks on see, et enne analüüsi tuleb küsida inimese käest – kas ta on tarvitanud Neo-Angine või mitte.



Joonis 8. Neo-Angine-i (vasakul) ja Neo-Angine + THC ja CBD (paremal) elektroferogrammid.

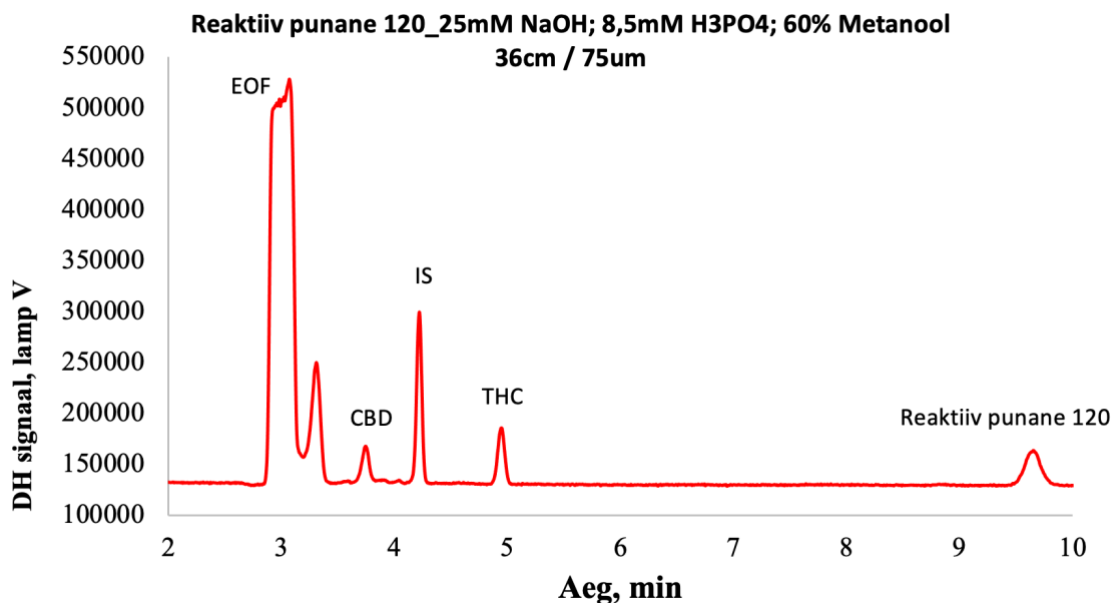
3.3.3. Muud ravimid ja reagentid

Teiste ravimite ja reagentide analüüsimisel huvi oli selles, et ideaalis analüüt peaks väljuma maksimaalne lähedalt kas sisestandardile või THC-le või enne CBD.

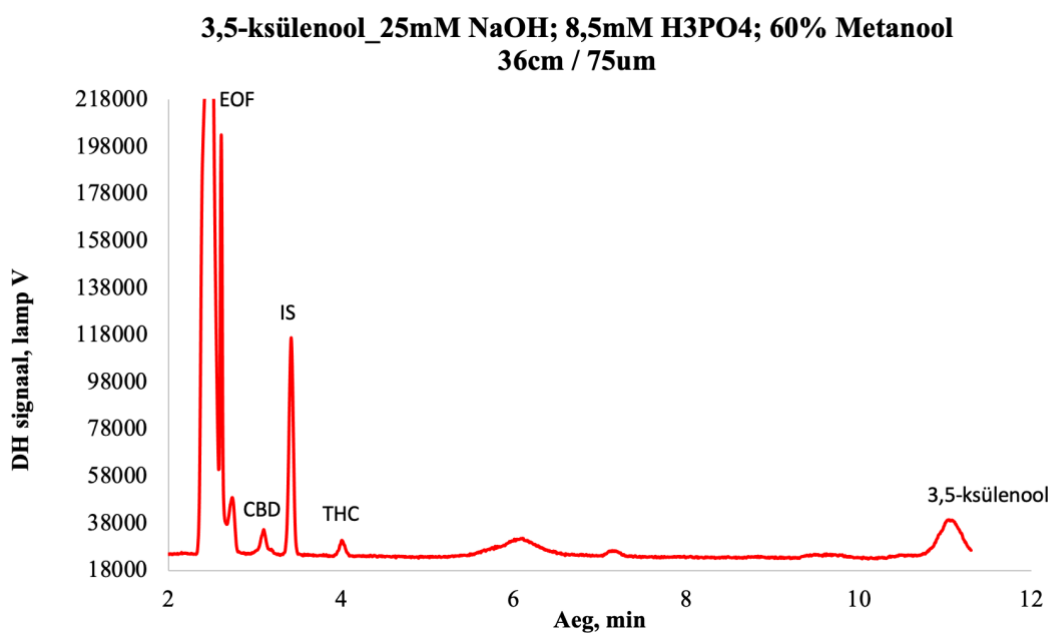


Joonis 9. 2,4-diklorobensüülalkoholi analüüsi ferogramm.

2,4-diklorobensüülalkoholi analüüsi tulemuses on näha, et esimesena väljub CBD ja THC väljub pärast IS väljumist. (Joonis 9)



Joonis 9. Reaktiiv punane 120 analüüsi ferogramm.



Joonis 10. 3,5-ksüleenooli analüüsi ferogramm.

Analüüsi käigus selgus, et ülejäänud ravimid ei mõjuta CE-FLU, kuna aktiivmolekulid kas ei oma laengu selle pH juures (väljuvad koos EOF piikiga) või omavad teist migratsiooniaja, mis ei mõjuta analüüsi tulemusele.

Tulemuseks tuuakse ka paar negatiivset tulemust: resortsinooli analüüsi tulemusena oli saanud null-ferogramm, Eugenool väljus koos EOF-iga, Dibensüülfosfaat väljus liiga hilja.

KOKKUVÕTE

Ebaseaduslike uimastite kuritarvitamine on ülemaailmne probleem, mis kahjustab igal aastal tuhandete inimeste elusid. Ebaseaduslike ainete sõltuvus tingib vajaduse välja töötada uudseid analüütiliseid protseduure, mille eesmärk on võimalikult kiiresti tuvastada juhtide, kurjategijate ja meditsiinitöötajate poolt kasutatavad keelatud ained, et saaks rakendada sobivaid ennetusmeetmeid.

Selle bakalaureusetöö eesmärk oli leida huvipakkuvate kemikaalide 3D-FLU spektrid, analüüsida valitud kemikaale, et määrata kindlaks sisestandard analüüsimiseks CE-FLU meetodiga, ja teha kindlaks valepositiivse vastuse oht CE-FLU analüüsi jaoks.

NarTest® NTX2000 analüsaator on mobiilne seade, mis on loodud kahtlaste vedelate, tahkete ja pulbriliste proovide mõõtmiseks ja põhineb SFS meetodi tööpõhimõtte. Lisaks kasutati CE-FLU tõestamismeetodit, kui analüüt fluorestseerus SFS-i mõõtmisel vahemikus 260–305 nm lainepikkustel. CE meetodit kasutati koos natiivse fluorestsentsdetektoriga, et tuvastada ebaseaduslikke aineid suuvedelikus.

Antud töös oli analüüsitud 134 ainet 3D-FLU meetodiga. Nende hulgas:

- 93 – ravimid, mis kuuluvad 11 erinevasse ravimikategoriasse;
- 41 – reagentid, mis ei kuuli suukaudselt manustatavate ainete hulka ja vastavalt võivad olla sisestandardiks.

3D-FLU analüüsi 14 positiivsetest tulemustest analüüsiti kõik ainet tõestava CE-FLU meetodiga.

Sisestandardiks saab valida järgmiseid aineid: 4-tert-butüülfenool, Karvakrool, Reaktiivoranž 14, 2,6-di-tert-butüül-4-metüülfenool.

Järgmised ravimid võivad mõjutada sülje analüüsi või sisestandardi valikut: 2,4-diklorobensüülalkoholi, 3,5-ksüleenool, Reaktiiv punane 120.

Töö tulemuste põhjal võib järeldada, et väljatöötatud KE meetod sobib kannabinoide määramiseks inimese süljes pärast marihuaana suitsetamist. Teostatud analüüsid olid lihtsad ja kiired ning saadud tulemused usaldusväärsed. Tulevikus on võimalik saadud meetodikat täiendada, eelkõige uurides rohkem ravimeid.

Tulevikus antud meetod võib osutada alternatiivseks narkootikumide tuvastamismeetodiks, mida rakendatakse välitingimustel.

ABSTRACT

Illegal drug abuse is a worldwide issue that claims the lives of thousands of people each year. The growing use of illicit substances necessitates the development of novel analytical procedures aimed at identifying the narcotics used by drivers, criminals, and medical personnel as fast as possible so that suitable preventative measures may be implemented.

This study was aimed at locating the 3D-FLU spectra of chemicals of interest, analyzing selected chemicals to determine an internal standard for analysis with the CE-FLU method, and determining the risk of a false-positive answer for the analysis with the CE-FLU method.

The NarTest® NTX2000 analyzer, a compact device designed to measure suspicious samples in liquid, solid, and powder forms, implements SFS technology for drug detection. Moreover, the CE-FLU proving method was used when the analyte fluoresced in the 260–305 nm range in the SFS measurement. The CE method was used in combination with a native fluorescence detector to identify illegal drugs in oral fluid samples.

In this work, 134 substances were analyzed with the 3D-FLU method. Among them:

- 93 — drugs belonging to 11 different drug categories;
- 41 — reagents that are not part of orally administered substances and can accordingly be an internal standard.

Of the 14 positive results of the 3D-FLU analysis, all were analyzed by the substance-proving CE-FLU method.

The following subjects can be chosen as internal standards: 4-tert-butylphenol, Carvacrol, Reactive Orange 14, 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol.

The following drugs may affect the choice of saliva analysis or internal standard: 2,4-dichlorobenzyl alcohol, 3,5-Xylenol, and Reactive Red 120.

Based on the results of the work, it can be concluded that the developed KE method is suitable for smearing cannabinoids in human saliva after smoking marijuana. The performed analyses were simple and quick, and the obtained results were reliable. In the future, it will be possible to expand on the methodology developed, particularly by studying more drugs.

In the future, the given method may prove to be an alternative drug detection method when applied in field conditions.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

1. Annuk T. Tööstuskanepi kasvatus [Internet]. Tartumaa Põllumeeste Liit; 2018 [tsiteeritud 2022 nov 30]. Available from: <https://www.pikk.ee/wp-content/uploads/2018/10/Tööstuskanepi-köömne-ja-tatrankasvatus.pdf>
2. Grotenhermen F, Russo E. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential [Internet]. 2013 [tsiteeritud 2022 nov 30]. Available from: https://books.google.ee/books?id=JvlyVk2IL_sC&pg=PA3&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false
3. Harro J. Uimastite ajastu [Internet]. Tartu Ülikooli Kirjastus; [tsiteeritud 2022 nov 30]. Available from: <https://dspace.ut.ee/handle/10062/85005>
4. Archem LLC. SPARK Performs Automated Reasoning in Chemistry [Internet]. 2022 [tsiteeritud 2023 jaan 2]. Available from: <http://archemcalc.com/sparc-web/calc#/multiproperty>
5. Mechoulam R. Chemistry of Cannabis. [tsiteeritud 2022 dets 1]. Available from: <https://future4200.com/uploads/short-url/9hOO4vTgNFheiikPcvrRNTRIU2G.pdf>
6. Kelley-Baker T, Berning A, Ramirez A. 2013–2014 National Roadside Study of Alcohol and Drug Use by Drivers: Drug Results [Internet]. United States; 2017 [tsiteeritud 2022 nov 10]. Available from: <https://rosap.ntl.bts.gov/view/dot/2097>
7. United Nations Office on Drugs and Crime. Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products [Internet]. Vienna; 2022 [tsiteeritud 2022 nov 30]. Available from: https://www.unodc.org/documents/scientific/Recommended_methods_for_the_identification_and_analysis_of_cannabis_and_cannabis_products.pdf
8. Busardo FP, Tittarelli R, Pantano F, Mannocchi G, Pacifici R, Pichini S, et al. Determination of cannabinoids in oral fluid and urine of “light cannabis” consumers: a pilot study. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [Internet]. 2018 [tsiteeritud 2022 nov 11]; Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2018-0566/html>
9. Stolker AAM, J. van Schoonhoven, A.J. de Vriesl. Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2004 [tsiteeritud 2022 nov 15];1058(1–2):143–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304014475?via%3Dihub>
10. McRae G, E. Melanson J. Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in cannabis and hemp using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Internet]. 2020 [tsiteeritud 2022 nov 11]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-020-02862->

11. Kaljurand M, Kuldvee R. Instrumentaalanalüüs III. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool, Keemiainstituut, Anorgaanilise ja analüütilise keemia õppetool; 1997. 47–54 lk.
12. Fernandes CF, FGJ, Flick GJ. Fernandes, C.F., Flick, G.J. Capillary electrophoresis for food analysis. Kd 39. Developments in Food Science; 1998. 575–612 lk.
13. Whatley H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis [Internet]. 2001 [tsiteeritud 2022 nov 29]. lk 21–5. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-120-6_2
14. Otter M. Narkootikumid. Huma; 1997. 64 lk.
15. Instrumentaalanalüüsi praktikumi juhend. Fluorestsents spektroskoopia (FLU).
16. Takeyuki T. The Application of Laser Induced Fluorescence Spectroscopy to Measurement of Purity Level in Textiles. [Internet]. 2008 [tsiteeritud 2022 nov 29]. Available from: <http://www.scientificlib.com/en/Spectroscopy/LaserInducedFluorescence.html>
17. Helmenstine AM. pH and pKa Relationship: The Henderson-Hasselbalch Equation [Internet]. ThoughtCo. 2020 [tsiteeritud 2022 dets 1]. Available from: <https://www.thoughtco.com/the-ph-and-pka-relationship-603643>
18. R. Lakowicz J. What is Fluorescence Spectroscopy? Principles of Fluorescence Spectroscopy [Internet]. 2006 [tsiteeritud 2022 dets 1]. Available from: <https://www.horiba.com/sgp/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/what-is-fluorescence-spectroscopy/>
19. Tobi A. Tööparameetrite optimeerimine TIRF mikroskoobiga üksikmolekulide detekteerimiseks [Internet] [Keemia instituut bioorgaanilise keemiaõppetool]. [Tartu]: Tartu Ülikool; 2014 [tsiteeritud 2022 dets 4]. Available from: http://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/43165/allan_tobi_keemia_bak14.pdf
20. Dr. Deepak. What features contribute to fluorescence of molecules? [Internet]. 2015 [tsiteeritud 2022 dets 4]. Available from: <https://lab-training.com/what-features-contribute-to-fluorescence-of-molecules/#:~:text=Metallic%20compounds%20%E2%80%93%20Lanthanides%20such%20as,Uranium%20containing%20compounds%20fluoresce%20naturally.&text=Complex%20formation%20%E2%80%93%20several%20metal%20ions,estimation%20of%20such%20ionic%20species.>
21. Kubala E, Strzelecka P, Grzegocka M, Lietz-Kijak D, Gronwald H, Skomro P, et al. A Review of Selected Studies That Determine the Physical and Chemical Properties of Saliva in the Field of Dental Treatment. Biomed Res Int [Internet]. 2018 [tsiteeritud 2022 nov 30]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5966679/#:~:text=Saliva%20contains%2099.5%25%20water%2C%200.3,and%20organic%20substances%20%5B%5D.>

22. Molnara A, Fu S, Lewis J, J.Allsop D, Copeland J. The detection of THC, CBD and CBN in the oral fluid of Sativex® patients using two on-site screening tests and LC–MS/MS. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014 [tsiteeritud 2022 nov 30];238:113–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073814000978?via%3Dihub>
23. Milman G, M. Schwope D, A. Gorelick D, A. Huestis M. Cannabinoids and Metabolites in Expectorated Oral Fluid Following Controlled Smoked Cannabis. *International journal of clinical chemistry*. 2012;413(7–8):765–70.
24. Sisekaitseakadeemia. Kriminalistikaekspertiisid [Internet]. Tallinn; 2013 [tsiteeritud 2022 nov 25]. 200 lk. Available from: chrome-extension://oemmnxcbldboiebfnladdacbfmadadm/<https://www.digar.ee/arhiiv/et/download/120865>
25. Capillary electrophoresis. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 80 [Internet]. 2008 [tsiteeritud 2022 nov 12]. Available from: https://file.wuxuwang.com/yaopinbz/EP8.0_1_00056.pdf
26. Analytical Sciences Digital Library. Internal Standard [Internet]. Contributin. 2020 [tsiteeritud 2022 nov 12]. Available from: [https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Worksheets/Worksheets%3A_Analytical_Chemistry_II/Calibration_Methods_\(Gonzalez\)/03_Internal_Standard](https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Worksheets/Worksheets%3A_Analytical_Chemistry_II/Calibration_Methods_(Gonzalez)/03_Internal_Standard)
27. Altria KD. Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standard [Internet]. 2002 [tsiteeritud 2022 nov 14]. Available from: https://alfresco-static-files.s3.amazonaws.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/3643c2b6-ed37-423b-a893-e0211403de5b/article-30473.pdf
28. Dolan JW. When Should an Internal Standard be Used? *LCGC North America* [Internet]. 2012 [tsiteeritud 2022 nov 18];30(6):474–80. Available from: <https://www.chromatographyonline.com/view/when-should-internal-standard-be-used-0>
29. NarTest NTX2000 Analyzer [Internet]. 2019 [tsiteeritud 2022 nov 29]. Available from: <http://www.nartest.com/about-us/company>
30. Ravimiamet. Ravimiregister [Internet]. [tsiteeritud 2023 jaan 10]. Available from: <https://www.ravimiregister.ee/default.aspx?pv=HumRavimid.Otsing>
31. Mazina J, Špiljova A, Vaher M, Kaljurand M, Kulp M. Rapid capillary electrophoresis method with LED-induced native fluorescence detection for the analysis of cannabinoids in oral fluid. *Analytical Methods* [Internet]. 2015 [tsiteeritud 2022 dets 30];7(18). Available from: https://www.researchgate.net/publication/280498375_Rapid_capillary_electrophoresis_method_with_LED-induced_native_fluorescence_detection_for_the_analysis_of_cannabinoids_in_oral_fluid

32. Rosivaldo S B, Batista Jr J, Viana RB, Baetas AC. Understanding the Molecular Aspects of Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol as Antioxidants. *Molecules* [Internet]. 2013 [tsiteeritud 2022 dets 30];18(10)(12663–12674). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6269679/>
33. Committee for Medicinal Products for Human Use. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis [Internet]. 2022 [tsiteeritud 2023 jaan 11]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf
34. Tartu Ülikool. Meetodite ja metoodikate omadusi iseloomustavad parameetrid [Internet]. [tsiteeritud 2023 jaan 7]. Available from: http://tera.chem.ut.ee/~ivo/ak1/metoodika_parameetrid.pdf
35. Ravimiamet. NEO-ANGIN [Internet]. Ravimiregister. 2020 [tsiteeritud 2023 jaan 7]. Available from: <https://www.ravimiregister.ee/default.aspx?pv=HumRavimid.Ravim&vid=fa989c77-4a01-4307-966b-7e3b3b3f4efe>
36. Tetrahydrocannabinol [Internet]. Offline Medical Wikipedia. [tsiteeritud 2022 dets 3]. Available from: http://medbox.iiab.me/kiwix/wikipedia_en_medicine_2019-12/A/Tetrahydrocannabinol

LISAD

Lisa 1 – analüüsitava ainete SFS pildid

https://docs.google.com/document/d/1RFSRoPGKOrVPHwafs6yTKZuDDIc4f-UY/edit?usp=share_link&oid=101722650867921893870&rtpof=true&sd=true