



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Analýza mitragyninu v biologickém materiálu pomocí chromatografických metod

Analysis of mitragynin in biological material using chromatographic methods

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Monika Lavičková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D.

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Lavičková** Jméno: **Monika** Osobní číslo: **491615**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Analýza mitragyninu v biologickém materiálu pomocí chromatografických metod

Název bakalářské práce anglicky:

Analysis of Mitragynin in Biological Material Using Chromatographic Methods

Pokyny pro vypracování:

Předmětem této bakalářské práce bude vývoj specifické metodiky pro kvalitativní/kvantitativní analýzu biologického materiálu pacientů s podezřením na užití preparátů z listů rostliny *Mitragyna speciosa* (známé pod názvem kratom). Tato rostlina obsahuje několik desítek indolových alkaloidů. Mezi nejvýznamnější z nichž, co se účinků týče, patří mitragynin a hydroxymitragynin. Při užívání nižších dávek preparátů z listů rostliny se dosahuje stimulačních účinků, zatímco při vyšších dávkách dochází k sedaci. Toxicita mitragyninu je stále poměrně neznámá, ale vzhledem k tomu, že jde o inhibitor enzymů P 450, jeho kombinace s jinými drogami může vést k závažným intoxikacím či úmrtím. V rámci bakalářské práce bude řešeno využití chromatografických metod (plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí). Příčinná pozornost bude věnována přípravě vzorku, tj. použití různých způsobů hydrolyzy vzorků, typu extrakce či možnosti derivatizace. Následně bude vybraná metodika testována na splnění validačních parametrů s ohledem na praktické využití v laboratorní diagnostice.

Seznam doporučené literatury:

- [1] MEIRELES, Vânia, Tiago ROSADO, Mário BARROSO, et al. , Clinical, Toxicological Aspects and Analysis in Biological and Non-Biological Samples, online, Medicines, ed. 2019, ročník 6, číslo 1, Přístupné z: doi:10.3390/medicines6010035, ISSN 2305-6320
- [2] TODD, D. A., J. J. KELLOGG, E. D. WALLACE, et al. , Chemical composition and biological effects of kratom (*Mitragyna speciosa*): In vitro studies with implications for efficacy and drug interactions, online, Scientific Reports , ed. 2020, ročník 10, číslo 1, Přístupné z: doi:10.1038/s41598-020-76119-w, ISSN 2045-2322
- [3] BROSE, Julia, Kin H LAU, Thu Thuy Thi DANG, et al. , The *Mitragyna speciosa* (Kratom) Genome: a resource for data-mining potent pharmaceuticals that impact human health, online, G3 Genes, Genomes, Genetics , ed. 2021, ročník 11, číslo 4, Přístupné z: doi:10.1093/g3journal/jkab058, ISSN 2160-1836

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Tomáš Hložek, PhD.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

MUDr. Daniela Obítková

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Analýza mitragyninu v biologickém materiálu pomocí chromatografických metod vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 10.08.2022

.....
Monika Lavičková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla velice poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Tomášovi Hložkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při tvorbě této práce. Dále děkuji své konzultantce MUDr. Daniele Obitkové za poskytnutí užitečných rad, doporučení ohledně formální stránky práce a ostatní konzultační činnosti. V neposlední řadě také děkuji celému Ústavu soudního lékařství a toxikologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za umožnění realizace praktické části.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce s názvem „Analýza mitragyninu v biologickém materiálu pomocí chromatografických metod“ se zabývá vývojem specifické metodiky pro analýzu biologického materiálu pacientů, u nichž máme podezření na užití preparátů z listů rostliny *Mitragyna speciosa*, častěji známé pod názvem kratom. Vzhledem k snadné dostupnosti a legalitě této drogy na našem území v současné době vysoce roste její spotřeba obzvláště mezi mladými lidmi, a stále častěji se spekuluje o zařazení kratomu na seznam nelegálních drog. Cílem této práce je přiblížení problematiky této rostliny, rizik spojenými s jejím užíváním, a zaměření se na postup stanovení hlavních alkaloidů pomocí chromatografických metod a následnou aplikaci v laboratorní praxi.

Klíčová slova

Chromatografie; Mitragynin; *Mitragyna speciosa*; kratom; alkaloidy; toxikologie

ABSTRACT

This bachelor thesis entitled „Analysis of mitragynine in biological material by chromatographic methods" deals with the development of a specific methodology for the analysis of biological material of patients suspected of using leaf preparations of *Mitragyna speciosa*, more commonly known as kratom. Due to the easy availability and legality of this drug in our territory, its consumption is currently increasing, especially among young people, and the question of listing kratom as an illegal drug is increasingly being addressed. The aim of this study is to present the issue of this plant and the risks associated with its abuse and focus on the procedure for the analysis of the main alkaloids by chromatographic methods and their subsequent application in laboratory practice.

Keywords

Chromatography; Mitragynin; *Mitragyna speciosa*; kratom; alkaloids; toxicology

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU	11
3.1	Rostlina <i>Mitragyna speciosa</i>	11
3.1.1	Aktuální trendy konzumace kratomu.....	12
3.1.2	Užívání kratomu	14
3.1.3	Problematika kratomu v ČR.....	15
3.1.4	Dostupnost a legalita kratomu ve světě.....	16
3.2	Alkaloidy	17
3.2.1	Obecné vlastnosti alkaloidů.....	18
3.2.2	Biologická funkce a význam alkaloidů	18
3.2.3	Klasifikace alkaloidů.....	20
3.3	Indolové alkaloidy.....	20
3.4	Významné alkaloidy obsažené v rostlině	21
3.4.1	Mitragynin.....	23
3.4.2	7-hydroxymitragynin a ostatní metabolity.....	24
3.5	Účinky alkaloidů kratomu na lidský organismus	25
3.5.1	Farmakokinetika a metabolismus.....	25
3.5.2	Farmakodynamické působení	26
3.5.3	Interakce s jinými látkami	27
3.5.4	Substituce opiátů kratomem.....	28
3.5.5	Příklady klinických případů.....	29
3.5.6	Toxicita kratomu.....	30

3.6	Chromatografie	31
3.6.1	Plynová chromatografie	32
3.6.2	Kapalinová chromatografie	33
3.6.3	Hmotnostní spektrometrie.....	33
3.7	Metody stanovení mitragyninu a jeho metabolitů	34
4	METODIKA	36
4.1	Použité chemikálie.....	36
4.2	Ředění zásobních roztoků	37
4.3	Příprava kalibrace.....	38
4.4	Příprava vzorku	40
4.5	Přístroje	41
4.6	Měření	42
5	VÝSLEDKY	43
5.1	Optimalizace chromatografické metody.....	43
5.2	Validační parametry metody	46
5.3	Reálné vzorky.....	50
6	DISKUZE.....	51
7	ZÁVĚR.....	55
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
10	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	65
11	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK.....	66
12	SEZNAM PŘÍLOH.....	67

1 ÚVOD

Vliv přírodních látek, obsažených v různých rostlinách, na lidský organismus byl po staletí využíván v lidovém léčitelství nebo při rituálních obřadech s ohledem na pestrou škálu jejich účinků na lidské psyché a tlumení/léčení příznaků různých chorob. S rozvojem přírodních a medicínálních věd postupně dochází k identifikaci konkrétních biologicky aktivních látek a ověření jejich mechanismů účinku na lidský organismus.

V rámci výzkumů prováděných s cílem objasnění účinků různých rostlinných sekundárních metabolitů se v současnosti dostává do popředí zájmu rostlina *Mitragyna speciosa* a její produkty (kratom), ať již s ohledem na jejich možné léčebné využití, ale především s ohledem na případná rizika spojená s nekontrolovaným užíváním těchto produktů. Obecně, užití nízkých dávek kratomu je spojeno se stimulačními efekty (euforie, ztráta zábran apod.), zatímco při užití vyšších dávek dochází k sedativním účinkům a v některých případech až k úmrtím.

Pro zhodnocení míry farmakologického ovlivnění je třeba znát aktuální krevní koncentrace mitragyninu a dalších látek obsažených v preparátech na bázi kratomu za účelem posouzení závažnosti možné intoxikace. Do budoucna lze očekávat zvýšený zájem o vývoj nových analytických metod s cílem identifikace a konfirmace alkaloidů v kratomu napříč toxikologickými laboratořemi v rámci ČR.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bude vývoj metodiky pro kvantitativní stanovení mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu (který je jednak obsažen v listech rostliny *Mitragyna speciosa*, ale i produktem metabolismu mitragyninu u savců) v lidském séru za pomoci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Vyvinutá metodika bude ověřena vzhledem ke splnění všeobecně platných validačních parametrů pro vývoj toxikologických metod.

Případné výsledky měření reálných vzorků mohou přispět nejen k rozvoji diferenciální diagnostiky intoxikací neznámé etiologie, ale i do diskuze o zařazení kratomu a dalších odvozených produktů na seznam ilegálních omamných a psychotropních látek v rámci České republiky.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Rostlina *Mitragyna speciosa*

Mitragyna speciosa je označení pro stálezelený strom z čeledi *Rubiaceae* dorůstající do výšky v rozmezí od 4 do 9 m. Ve výjimečných případech, pokud má rostlina zajištěny kvalitní podmínky, mohou vrcholky její koruny sahat do výšky až 30 m. Hojně se jí daří v teplém a vlhkém prostředí, kam dopadá významné množství slunečních paprsků a kde se nachází půda humusovitého typu. Nejvýraznějším znakem rostliny jsou oválné, tmavě zelené listy se špičatým zakončením, dorůstající do délky až 18 cm, jež můžeme vidět na Obrázku 1. Listy v průběhu roku rovnoměrně opadávají a jsou nahrazovány nově rostoucími. Častým jevem je opad velkého množství listů v období sucha, a jejich následná obnova začínající s příchodem dešťů. (Kratina, 2021; Meireles, 2019).

Tato rostlina se přirozeně vyskytuje v Africe, ale především v jihovýchodní Asii na území Malajsie, Thajska, Myanmaru, Indonésie, Vietnamu a přilehlých států, kde bývá známa pod různými místními pojmenováními. Nejznámější a nejpoužívanější z nich je kratom, dále například kakuum, kraton, ketum, ithang nebo thom v Thajsku, či biak-biak v oblasti Malajsie. Současný název rostliny *Mitragyna speciosa* byl odvozen od slova mitra, které označuje církevní pokrývku hlavy. A právě tvar listů tzv. kratomova stromu, jak se mimo jiné této rostlině také přezdívá, připomíná tuto část obleku příslušníků církve. (Meireles, 2019; Al Muqarrabun, 2021; Kratina, 2021).



Obrázek 1 – Rostlina *Mitragyna speciosa*, neboli kratom (Karunakaran, 2022)

Kratom je pěstován především pro své listy. Na základě barvy jejich žilnatiny můžeme identifikovat několik typů kratomu. Mezi nejčastěji využívané považujeme zelenou, bílou či červenou formu. Na jedné rostlině mohou být zároveň všechny barvy žilek, v závislosti na růstu listu či celkovém stáří a zralosti stromu. Zmíněné kultivary se vzájemně odlišují účinky, charakteristickou chutí či délkou působení. Tyto vlastnosti může ovlivnit také způsob zpracování listů a způsob aplikace produktů z nich (Meireles, 2019; Al Muqarrabun, 2021; Grundmann, 2022).

3.1.1 Aktuální trendy konzumace kratomu

Typickými účinky uváděnými pro bílý kratom je celkové povzbuzení, stimulace a zvýšení energie uživatele. Oproti tomu červený kratom navozuje uklidnění a pocity k relaxaci. Nejpoužívanější zelenou formou kratomu se člověk dostane do euforických stavů, dále dochází ke snížení stresu

a výrazné zvýšení koncentrace. Tato forma je užívána hlavně mezi mladými lidmi či studenty. V Thajsku je používána jako hlavní přísada do domácí směsi, běžně označované jako „4 x 100“. Tato směs velice často obsahuje další látky, z nich můžeme jmenovat konopí, metamfetamin, tramadol, benzodiazepiny či antidepresiva. V souvislosti s jejich užíváním jsou dokumentovány případy vážných až smrtelných intoxikací (Grundmann, 2022).

Kratom je nejběžněji k dostání v podobě sušených listů, které jsou následně rozemlety a distribuovány v práškové podobě, nebo jsou využity pro výrobu tablet a kapslí. Samotný prášek se často přimíchává do džusů, čajů či kávových nápojů. Kratom je k dostání i ve formě surových listů, určených ke žvýkání, nebo v podobě sušených listů určených ke kouření, jenž má uklidňující účinek, či pro přípravu čaje. V prášku a sušených listech je obsah mitragyninu až dvě hmotnostní procenta. Kratom však může být dostupný i v koncentrovanějších formách, a to v podobě různorodých tinktur, extraktů či pryskyřic, kde se jeho koncentrace může pohybovat až v desítkách procent. Příklady aktuálně komerčně dostupných produktů kratomu v západních zemích znázorňuje Obrázek 2 (Grundmann, 2022; Meireles, 2019).



Obrázek 2 - Komerčně dostupné produkty kratomu (Grundmann, 2022)

3.1.2 Užívání kratomu

Za hlavní důvody užívání preparátů rostliny *Mitragyna speciosa* je uváděno zvýšení pracovního výkonu, soustředěnosti, zlepšení sexuální vytrvalosti a výkonnosti, dále například navození pocitu štěstí a euforie, či snazší překonávání nepříznivých duševních stavů. V oblasti jihovýchodní Asie je kratom velice rozšířen mezi skupinami dělníků a zemědělců, kteří popíjejí odvar z listů již od brzkých ranních hodin, a následně v pravidelných dávkách v průběhu dne, za účelem zlepšení pracovního nasazení a zvýšení odolnosti vůči vysokým teplotám, které panují v těchto zeměpisných šířkách (Meireles, 2019; Al Muqarrabun, 2021; Brose, 2021).

Původně se kratom začal využívat především pro své léčebné účinky, zejména ke zmírnění horečky a bolesti, dále k léčbě cukrovky, průjmu, či v podobě obkladu pro rychlejší hojení povrchových zranění. Dalším důvodem užívání kratomu je potlačení abstinčních příznaků závislosti především na opioidních látkách či jiných drogách, které jsou navíc také často kratodem, vzhledem k jeho snadné a cenově výhodné dostupnosti, zcela nahrazovány (Meireles, 2019; Brose, 2021).

3.1.3 Problematika kratomu v ČR

V České republice se užívání kratomu a i diskuze o jeho zdravotních a sociálních rizicích (návykovost a jeho úloha jako přestupní drogy) objevují až v posledních pár letech. K tomuto přispívá zejména jeho snadná dostupnost a cenová přijatelnost (v kontextu k ilegálním drogám). Preparáty na bázi mitragyninu jsou distribuovány dokonce i formou speciálních výdejních automatů, ale po nejvíce přes klasické dodavatelské kanály, tedy internetové portály a specializované kamenné obchody, kde jsou inzerovány nejen jako potraviny, ale i tzv. sběratelské předměty (Kratina, 2021).

Problematikou produktů na bázi kratomu se zabýval Státní zdravotní ústav (SZÚ) v případě konkrétního produktu, přípravku Green Entigon, z hlediska jeho složení, přičemž jeho jedinou deklarovanou složkou byl sušený list rostliny *Mitragyna speciosa*. Provedená laboratorní analýza potvrdila přítomnost alkaloidů specifických pro *Mitragyna speciosa*, avšak vyloučila přítomnost jiných adulterantů. Vzhledem k tomu, že alkaloidy obsažené v rostlině kratomu nejsou doposud v ČR zařazeny do seznamu omamných a psychotropních látek, nelze tedy v současnosti efektivně regulovat distribuci přípravků na bázi kratomu. Dále je třeba uvést, že tyto produkty nebyly shledány jako zdraví škodlivé, neboť v současnosti není k dispozici dostatek vědeckých studií, které by zhodnotily akutní a chronickou toxicitu, nebo poukázaly na jiná zdravotní

rizika vážící se ke konzumaci kratomu. Přesto by bylo na místě pro spotřebitele pohlížet na tyto produkty jako na potenciálně nebezpečné a jejich užívání konzultovat s příslušnými odborníky, tj. lékaři, adiktology či psychiatry. Vzhledem k tomu, že napříč evropskými zeměmi dochází k zařazení kratomu mezi regulované látky či drogy, lze brzy očekávat obdobnou reakci ze strany příslušných českých autorit (Kratina, 2021; Kerrigan, 2022).

3.1.4 Dostupnost a legalita kratomu ve světě

Přestože ve státech jihovýchodní Asie považujeme užívání kratomu za tradici známou stovky let, ve Spojených státech a zemích západní Evropy se začalo dostávat do povědomí veřejnosti až v posledních letech, v souvislosti s rekreačním užíváním této rostliny za účelem navození pocitu euforie a zlepšení nálady. V současné době je kratom v těchto státech široce dostupný v internetových obchodech či maloobchodních prodejnách v různých podobách (Kerrigan, 2022; Brose, 2021).

Vzhledem k tomu, že produkty z kratomu ve většině zemí nepodléhají žádným nebo minimálním kontrolám, obecně však nejsou regulovány jako doplňky stravy nebo léčiva. Často tedy dochází k jejich falšování a mnohdy se stává, že obsahují nežádoucí příměsi v podobě psychoaktivních látek, těžkých kovů, nebo mohou být kontaminovány mikroorganismy. Stále častěji se můžeme setkat se smrtelnými otravami souvisejícími s užíváním této rostlinné drogy. Výše uvedené vede k nárůstu obav ze stran státních zdravotnických a regulačních institucí, ale i široké veřejnosti, což je důvodem k diskusi v některých státech o regulaci či změně legislativy ve vztahu k dostupnosti a zařazení produktů vyrobených z listů tohoto stromu mezi ilegální drogy (Kerrigan, 2022; Brose, 2021).

Na území mnoha evropských států, například Polska, Německa, Švédska, Dánska, Finska a dalších, je již kratom z výše uvedených důvodů považován za kontrolovanou látku a jeho prodej je regulován, stejně tak jako v USA. V některých státech, jako je Austrálie, Malajsie, Thajsko či Myanmar je kratom již zařazen do skupiny nelegálních látek. V Thajsku byl dokonce v roce 1943 uzákoněn jeho úplný zákaz, avšak vzhledem k tamním tradicím a původu rostliny nebyl zcela účinný, a byl zde v nemalém množství užíván nadále. V roce 2019 proto thajská vláda legalizovala produkci a využití kratomu pro lékařské účely a v omezené míře i pro rekreační užívání (Kerrigan, 2022; Prozialeck, 2021).

3.2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté nízkomolekulární látky zásadité povahy, které vznikají v malém množství jako produkty metabolismu některých rostlin. Na rozdíl od ostatních přírodních látek jsou, z hlediska struktury a biosyntézy, nesmírně rozmanitou skupinou, patřící mezi největší soubor sekundárních metabolitů, zahrnujících více než 20 000 různých molekul, které jsou rozmístěny přibližně ve 20 % všech známých cévnatých rostlinách. V rostlinné říši jsou značně rozšířeny. Hojný výskyt je uváděn především v rostlinných čeledích *Apocynaceae* (Toješťovité), *Papaveraceae* (Makovité), *Papilionaceae* (Bobovité), *Ranunculaceae* (Pryskyřníkovité), *Rubiaceae* (Mořenovité), *Rutaceae* (Routovité) a *Solanaceae* (Lilkovité). Naopak méně často se objevují v nižších rostlinách a houbách (Matsuura, 2015; Powar, 2007).

3.2.1 Obecné vlastnosti alkaloidů

Ve struktuře alkaloidů nalezneme nejméně jeden atom dusíku, který je součástí cyklů, a vyvolává bazicitu těchto látek. Z tohoto důvodu řadíme alkaloidy mezi heterocyklické sloučeniny, například pyrrolové či pyridinové. Vzhledem k bazickému neboli alkalickému charakteru, který se odráží již v názvu skupiny, se alkaloidy v rostlinách nevyskytují volně, avšak ve formě solí karboxylových kyselin (octové, citronové a dalších) (Matsuura, 2015; Powar, 2007).

Obecně se jedná o bezbarvé, krystalické, v mnoha případech hořké a opticky aktivní látky, rozpustné ve slabě polárních nebo nepolárních rozpouštědlech. Jejich rozpustnost ve vodě je malá, ale lze ji zvýšit převedením na soli prostřednictvím reakcí s kyselinami. Alkaloidy také mohou vytvářet nerozpustné sraženiny, definovaných krystalických tvarů, které můžeme použít k jejich identifikaci (Matsuura, 2015; Powar, 2007).

3.2.2 Biologická funkce a význam alkaloidů

Přítomnost alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů v rostlinách výrazně ovlivňuje rychlost jejich reprodukce, a to buď zlepšením obranyschopnosti vůči biotické a abiotické zátěži, nebo ovlivněním opylovačů či rozptylovačů semen a plodů. Obranné strategie zahrnují odpuzování predátorů díky své toxicitě a hořké chuti. Stimulační vlastnosti některých alkaloidů mohou přilákat na květ potřebné opylovače, zatímco délka návštěvy může být řízena neletální toxicitou rostliny. U velkého množství rostlin bývá nejvíce alkaloidů soustředěno v kořenech, avšak tento jev závisí na vegetačním období a podmínkách růstu. Tyto a několik dalších příkladů metabolické všestrannosti vedou například k významnému zlepšení míry přežití rostlin (Matsuura, 2015).

Všeobecně se udává, že hlavní úlohou těchto sloučenin v rostlinách je toxicita vůči predátorům a patogenům. Této toxické vlastnosti pozorované v obranném systému rostlin se využívá ve vlivu na obratlovce. Alkaloidy jsou známé pro své silné fyziologické účinky na živočichy, včetně člověka. Již v malém množství ovlivňují nervovou soustavu, a proto se využívají jako důležitá povzbudivá, analgetická či antipyretická léčiva, považovaná za jedny z nejvýznamnějších v historii lidstva (Matsuura, 2015; Powar, 2007).

Izolace alkaloidu morfinu německým farmaceutem Friedrichem Wilhelmem Sertúrnerem na počátku 19.století je považována za formální začátek sekundárního metabolismu rostlin. I nyní celosvětově probíhá řada studií sledujících aktivitu různých alkaloidů s cílem vývoje nových léčiv. Specifická toxicita alkaloidů může být využita v boji proti určitým typům nádorových buněk, ale také například v boji proti specifickým mikroorganismům či škůdcům, nežádoucích v rostlinné výrobě (Matsuura, 2015).

Stejně jako mnoho dalších látek i alkaloidy mohou mít jak pozitivní, tak negativní vliv na lidské zdraví. Vzhledem k tomu, že se jedná o prudce jedovaté látky, vždy musíme myslet na množství dávky a možné interakce s jinými sloučeninami, především léčivy. Vzhledem k vlivům na nervovou soustavu, jsou alkaloidy často zneužívány jako návykové látky. U člověka se objevují zvláštní stavy, ze kterých můžeme jmenovat narušení duševní rovnováhy, lhostejnost, znečitlivění, malátnost, halucinace či s tím spojenou agresivitu (Matsuura, 2015).

Při požití většího množství dochází k otravě, která může vyústit až ve smrt daného jedince. Při opakovaném požití preparátů z těchto rostlin, jež mohou být podány v různých formách, vzniká závislost (Matsuura, 2015).

3.2.3 Klasifikace alkaloidů

Alkaloidy jsou často klasifikovány na základě jejich chemické struktury. Název těchto látek je poté nejčastěji odvozen od základního heterocyklu přítomného v jejich molekulách. Například ty alkaloidy, které obsahují kruhový systém nazývaný indol, jsou známé jako indolové alkaloidy. Podle tohoto hlediska rozlišujeme několik hlavních tříd, a to pyrrolidiny, pyridiny, tropany, pyrrolizidiny, isochinoliny, chinoliny, terpenoidy, steroidy a již zmíněné indoly, kterým se budeme věnovat blíže (Powar, 2007).

Alkaloidy mohou být také rozděleny podle biologického systému, ve kterém se vyskytují. Například opiové alkaloidy se vyskytují v máku setém (*Papaver somniferum*). Tento systém dvojí klasifikace ve skutečnosti způsobuje malý zmatek, protože existuje hrubá korelace mezi chemickými typy alkaloidů a jejich biologickou distribucí (Powar, 2007).

3.3 Indolové alkaloidy

Indol (C_8H_7N) je slabě bazická molekula tvořená pyrrolovým kruhem fúzovaným s benzenovým jádrem, v jejíž celé struktuře se rozprostírá deset π elektronů. Předpokládá se, že základní strukturu indolových alkaloidů ovlivňuje delokalizace osamocené páru dusíkových elektronů do volného kruhu π elektronů. Výsledná protonizace indolu v poloze C-3 zajišťuje jeho termodynamickou stabilitu (Omar, 2021).

Indolové alkaloidy rostlinného původu mají velmi bohatou farmakologickou aktivitu, čemuž významně přispívá právě přítomnost indolového jádra. Byly identifikovány v několika prominentních rostlinných čeledích, z nichž jako hlavní můžeme jmenovat *Apocynaceae* (Toješťovité), *Nyssaceae* (Tupelovité), *Loganiaceae* (Logániovité) a *Rubiaceae* (Mořenovité), které budou vzhledem

k zařazení rostliny *Mitragyna speciosa*, předmětem našeho dalšího zájmu. Z těchto rostlinných zdrojů byly izolovány tisíce sloučenin, které měly následně znatelný dopad na lékařskou praxi (Omar, 2021).

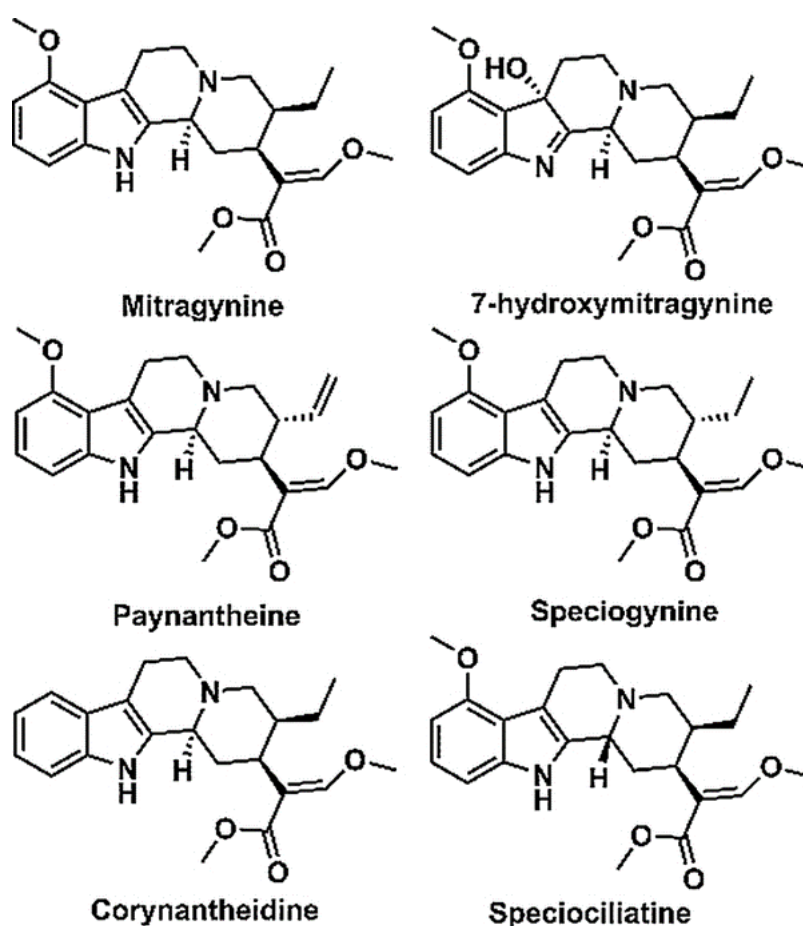
Prvním, kdo v roce 1866 syntetizoval indol z oxindolu pomocí zinkového prachu, byl Adolf von Baeyer. Vzhledem k výskytu vedlejších nežádoucích stavů po léčbě, získalo hledání nových sloučenin spojených s menším počtem nežádoucích účinků obrovskou pozornost lékařů a vědců. Ačkoli byl hodnocen terapeutický význam těchto sloučenin, v mnoha případech jejich působení a bezpečnost zatím nezkoumal dostatečný počet studií (Omar, 2021).

Účinky prokázané různými sloučeninami, včetně strictosamidu (antidepresivum, analgetikum a protizánětlivé činidlo), mitragyninu (analgetikum a antidepresivum), harmanu (antidepresivum, spasmolytikum a antiagregační činidlo), brucinu (analgetikum a protirakovinné činidlo), globospiraminu (antimykobakteriální), vindogenianinu (antidiabetikum), tabersoninu (protirakovinný) a dalších, naznačují, že by měly být provedeny další hloubkové studie k potvrzení klinické účinnosti těchto sloučenin. Kromě toho by mělo dojít k důkladnému prozkoumání mechanické aktivity v místech působení, včetně studie toxicity (Omar, 2021).

3.4 Významné alkaloidy obsažené v rostlině

U rostlinných rodů z čeledi *Rubiaceae*, včetně rodu *Mitragyna* s hlavním zástupcem *Mitragyna speciosa* označovaným kratom, je obecně známý bohatý výskyt sloučenin patřících do kategorie alkaloidů. Z rostlin zařazených do rodu *Mitragyna* bylo doposud analyzováno a popsáno bezmála 80 sekundárních metabolitů, z nichž můžeme za významné skupiny, co se obsahu týče, jmenovat již zmíněné alkaloidy, dále například polyfenoly, (tri)terpenoidy, flavonoidy či látky zařazené mezi saponiny a sekoiroidy (Ahmad, 2022).

Při studii v roce 2021, kterou vedl indonéský vědec Adang Firmansyah, bylo v listech kratomu analyzováno více než 40 typů těchto alkaloidů. Právě u šesti z nich bylo ověřeno a následně dokázáno, že vykazují farmakologickou aktivitu, zejména v podobě psychoaktivních účinků. Těmito látkami patří mezi indoly a oxindoly jsou mitragynin, 7-hydroxymitragynin, mitrafylin, speciociliatin, speciogynin a paynanthein. Nejen jejich strukturu, ale i dalších méně významných alkaloidů kratomu, si můžeme prohlédnout na Obrázku 3. Během předchozích studií rodu *Mitragyna* bylo zjištěno, že právě indolové alkaloidy společně s triterpenoidními saponiny jsou hlavními sekundárními metabolity této rostliny, jež vykazují širokou farmakologickou aktivitu u savců (Ahmad, 2022).



Obrázek 3 - Chemická struktura alkaloidů obsažených v kratomu (Sharma, 2021)

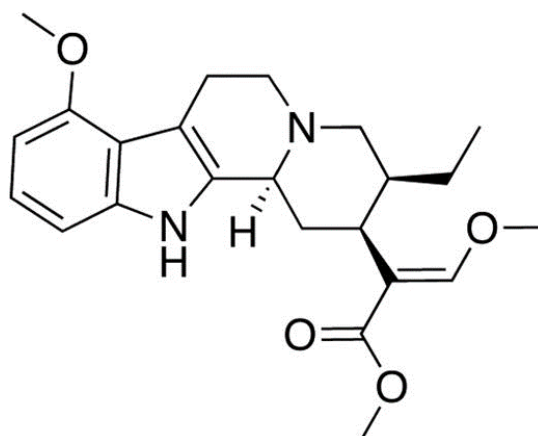
3.4.1 Mitragynin

Mitragynin (MTG) je považován za nejvýznamnější látku, patřící do skupiny indolových alkaloidů, obsaženou v listech kratomova stromu, jenž tvoří přibližně 2 % celkové hmotnosti sušiny listů. Toto množství bývá udáváno pro produkty pocházející z Thajska, avšak obsah MTG v sušině může kolísat v závislosti na původu rostlin z jiných producentských států. Rozdíl v jeho zastoupení v sušině závisí na několika okolnostech, jimiž je například stáří či odrůda daného stromu, roční období či geografická poloha. Faktem bývá, že listy rostoucí na starší rostlině vykazují mnohem hojnější zastoupení mitragyninu oproti mladším. (Ahmad, 2022; Suhaimi, 2016; Meireles, 2019).

Mitragynin byl poprvé izolován v roce 1921 skotským chemikem Ellenem Fieldem. Jedná se o látku bílé barvy, nejčastěji se vyskytující ve formě amorfního prášku, jehož molekulární složení vyjadřujeme vzorcem $C_{23}H_{30}N_2O_4$. Tato struktura, kterou vidíme na Obrázku 4, byla však poprvé identifikována až v roce 1965 prostřednictvím rentgenové krystalografie. Tato látka, kterou můžeme z chemického hlediska znát též pod názvem 9-methoxy-korynantheidin, a řadíme ji mezi monoterpenindolové alkaloidy, je dobře rozpustná v alkoholu, chloroformu či kyselině octové (Ahmad, 2022; Suhaimi, 2016; Karunakaran, 2022).

Se zvyšujícím se zájmem o možné medicínské využití alkaloidů obsažených v listech stromu *Mitragyna speciosa*, úměrně rostlo i množství výzkumných prací zaměřených na jejich izolaci. Vzhledem k obtížné separaci a izolaci izomerních alkaloidů, nacházejících se v listech *Mitragyny*, bylo nutné vyvinout účinné extrakční metody pro získání jednotlivých alkaloidů v dostatečném množství a patřičné čistotě. Například Goh a kolektiv vyvinuli v roce 2021 metodu, tzv. akcelerované extrakce rozpouštědlem, která je rychlá a MTG

je při ní izolován s maximální čistotou 98 %, což bylo následně potvrzeno pomocí HPLC analýzy (Ahmad, 2022; Karunakaran, 2022; Goh, 2021).



Obrázek 4 - Chemická struktura mitragyninu (McIntyre, 2015)

3.4.2 7-hydroxymitragynin a ostatní metabolity

Indolové alkaloidy obsažené v kratomu jsou hlavním zdrojem jeho psychoaktivních účinků na lidský organismus. Mimo hlavního, výše uvedeného, mitragyninu se objevuje v listech jeho hlavní metabolit 7-hydroxymitragynin, který je však zaznamenávám v podstatně nižších koncentracích, nepřesahujících 0,02 % hmotnosti sušených listů. Z dalších významných alkaloidních látek můžeme jmenovat například speciogynin, speciociliatin a paynanthein, pohybující se rozpětí jednotek setin až tisícín z celkového obsahu listové hmoty. Všechny tyto sloučeniny vykazují biologickou aktivitu. Z farmakologického hlediska však doposud není o těchto látkách známo mnoho informací a jsou předmětem vědeckého výzkumu (Kruegel, 2019; Ahmad, 2022).

3.5 Účinky alkaloidů kratomu na lidský organismus

Zásadní význam MTG a 7-hydroxymitragyninu spočívá v jejich působení na některé psychosomatické funkce. Udává se, že již po zkonsumování jednoho až pěti gramů čerstvých listů se dostavuje pocit nárůstu energie související se zvýšenou komunikativností, zlepšením koncentrace, přecházející do pocitů euforie s minimální potřebou spánku. Oproti tomu vyšší dávky, za které je považováno množství přibližně pěti až patnácti gramů, způsobují naopak utlumení funkce nervové soustavy, což se projevuje zvýšenou lhostejností a potlačením vnímání bolesti. Dávky zkonsumovaných listů v množství překračující patnáct gramů jsou příčinou nárůstu podráždění a agresivity, která může pozvolna přejít do úzkostných stavů. Avšak pro každého jedince se mohou tato uvedená množství požití látky lišit v závislosti na mnoha okolnostech, jako je například interakce s dalšími návykovými látkami či léčivými preparáty (Kratina, 2021).

3.5.1 Farmakokinetika a metabolismus

V současnosti je většina farmakokinetických studií o metabolismu mitragyninu provedena na zvířatech. Po perorální dávce mitragyninu 20 mg/kg byly v potkanech naměřeny nejvyšší plazmatické koncentrace okolo 400 ng/ml v čase 1,3 hod od podání. V jiné studii byl mitragynin aplikován intravenózně (1,5 mg/kg), přičemž maximální plazmové koncentrace se pohybovaly okolo 2300 ng/ml a byly dosaženy po 1 hodině od podání. Po perorálním podání 50 mg/kg po 5 hod dosahovaly maximální koncentrace hodnot zhruba 7000 ng/ml (Philipp, 2009).

Ve studii s lidskými dobrovolníky (n=10, perorální podání; pravidelní uživatelé kratomu) byly maximální plazmatické koncentrace v rozmezí 19–105 ng/ml dosaženy po 30–60 min od podání v závislosti na počáteční dávce kratomu. Při stanovení ED₅₀ (effective dose) a LD₅₀ (lethal dose) u mitragyninu

se pohybovaly tyto koncentrace kolem 20 mg/kg pro ED₅₀ a 470 mg/kg pro LD₅₀, což ilustruje jeho poměrně nízkou toxicitu při užívání látky samotné, a lze říci, že riziko předávkování touto látkou je odhadem 1000 x vyšší než u heroinu (Basiliere, 2020).

Stran 7-hydroxymitragyninu je v současnosti, vzhledem k minimu článků věnující se tomuto tématu, nutné provést další studie pro ověření jeho efektivních dávek a farmakokinetických vlastností. V jedné z prvních studií bylo využito houby *Helminthosporium sp.* pro identifikaci metabolických produktů mitragyninu, a to oxidovaných a hydroxylovaných forem. První podrobná studie biotransformace byla provedena na potkanech, kde byla pozorována hydrolýza methylesterových skupin a demethylace methoxyskupin s následnou glukuronidací a sulfatací těchto metabolitů (Zarembo, 1974; Philipp, 2009).

V jiných studiích provedených s biologickým materiálem uživatelů kratomu byly v rámci první fáze metabolismu identifikovány desmethyl- a karboxy-metabolity, které stejně jako u potkanů podstupovaly v další fázi metabolismu stejné konjugační reakce. Jedním z produktů metabolismu u lidí (potkanů) je i 7-hydroxymitragynin, který je zároveň obsažen v rostlině *Mitragyna speciosa* a jeho množství v rostlině roste s dobou sušení a skladování (Kruegel, 2016).

3.5.2 Farmakodynamické působení

Doposud byly objeveny a pomocí řecké abecedy pojmenovány tři typy receptorů, a to μ , κ , δ (mí, kappa a delta), které se rozlišují do dalších subtypů. Nejhojněji jsou rozmístěny v synaptické oblasti CNS, ale výjimkou není ani jejich výskyt mimo mozek a míchu, tj. v periferních částech (Grundmann, 2022; Kratina, 2021).

Právě deriváty MTG mají vazebnou schopnost na μ -opioidní a κ -opioidní receptory (hMOR, hKOR), na nichž fungují jako částeční agonisté, zejména v případě μ -opioidního receptoru, a slabí antagonisté na κ -opioidních a δ -opioidních receptorech. Po navázání dochází k jejich okamžité aktivaci, která se projeví sníženou vnímavostí bolesti, zpomalením dechové frekvence, snížením krevního tlaku, zúžením zorniček či například utlumením činnosti hladkého svalstva. Obecně řečeno, dojde k navození stavu, který by nastal po užití morfia, heroinu či jiných syntetických opioidů (Todd, 2020; Kratina, 2021).

V případě MTG je zaznamenána přibližně pětkrát nižší aktivita na μ -opioidní skupině receptorů než u jeho metabolitu 7-hydroxymitragyninu. Důležité je zmínit, že mitragynin společně s jeho deriváty ovlivňují také neopioidní receptory, jako je alfa-2 adrenergní receptor, adenosin A2a, dopamin D2 a některé serotoninové receptory. Díky těmto výše uvedeným důvodům se užívání kratomu na jednu stranu odráží v navození utlumujících, nebo naopak povzbuzujících stavů a zmírnění bolesti, ale současně také ovlivňuje psychické rozpoložení, srdeční aktivitu či utlumení motility střev. Řada uživatelů si však tento rozsáhlý výčet účinků a vlivu na spoustu vitálních funkcí neuvědomuje (Todd, 2020; Kratina, 2021).

3.5.3 Interakce s jinými látkami

K převážné většině doposud známých interakcí mezi látkami dochází v důsledku inhibice nebo indukce enzymů, které se podílejí na látkové přeměně léků. Těmi jsou zejména enzymy cytochromu P450 (dále CYP450), jenž mají zásadní postavení v metabolismu léčivých látek, vyskytujících se v současné době na trhu. Pokud by vlivem působení CYP450 došlo k sebemenšímu ovlivnění a následné změně přeměny látek, následovala by reakce mezi jednotlivými léčivy, v ojedinělých případech vedoucí až k usmrcení jedince (Kamble, 2020).

Jedna z mála provedených výzkumných studií se zabývala možnostmi lékových interakcí *in vitro* mezi hlavními alkaloidy pocházejícími z kratomu a nejdůležitějšími izoformami CYP450 v lidských jaterních mikrozomech. Bylo prokázáno, že MTG je silným a vcelku selektivním inhibitorem aktivity CYP2D6. Při zkoumání dalších izoform CYP450 byla zaznamenána středně silná inhibice CYP2C19. Přestože tato izoforma cytochromů P2C19 představuje pouze 2 - 5 % z celkového obsahu CYP450 v jaterních buňkách, je ověřeno, že se podílí na metabolismu přibližně čtvrtiny aktuálně předepisovaných léčiv, jako jsou léky ze skupiny antidepresiv, antipsychotik či analgetik. Případná změna tohoto typu cytochromů může být tedy příčinou vážných zdravotních komplikací, zejména u léčiv vykazujících úzký terapeutický index (Kamble, 2020).

3.5.4 Substituce opiátů kratomem

Při provádění testů zaměřených na účinky vedoucí ke zmírnění bolesti bylo zjištěno, že samotný MTG působí podstatně méně účinně než morfin. Avšak oproti tomu, 7-hydroxymitragynin překvapivě vykázal zhruba 40x vyšší účinnost oproti MTG, z čehož byla celkově odvozena 10x větší účinnost narozdíl od morfia. Pokud bychom současně užívali morfin v kombinaci s kratomem, teoreticky by měla tato komedikace vést k výraznému zmírnění bolesti bez tvorby sebemenší tolerance vůči morfinu. V případě současného podávání 7-hydroxymitragyninu by docházelo k antinociceptivní toleranci, vzniku fyzické závislosti a dalšímu zvýšení účinků morfia (Grundmann, 2022; Todd, 2020).

K nahrazování opia kratomem nedochází pouze v komunitě závislých toxikomanů. S tímto trendem se můžeme v menším měřítku setkat také mezi pacienty, jimž bylo legálně předepsáno užívání léčiv založených na účinku morfinanových alkaloidů (kodein aj.), avšak tito lidé je z nejrůznějších důvodů

odmítají konzumovat a hledají jakousi alternativu, nejen díky vyšším sedativním účinkům. Dalšími důvody je již zmíněná poměrně snadná dostupnost kratomu, a v mnoha případech také neznalost týkající se složení a obsahu účinných látek, často spojená s neznámým původem či neuvědomění si možné interakce s jinými léčivými vedoucí k možným zdravotním rizikům (Kratina, 2021).

3.5.5 Příklady klinických případů

Celosvětově bylo zaznamenáno mnoho případových zpráv, kdy užívání preparátu kratomu přímo souvisí se zdravotním stavem či dokonce smrtí uživatele. Z konkrétních klinických případů můžeme pro demonstraci zmínit následující. Na oddělení urgentní medicíny byl přivezen šedesátiosmiletý muž s příznaky výrazné zmatenosti, dezorientace a neschopností chůze. Při vyšetření mu byl naměřen patrně zvýšený krevní tlak (180/95), zvýšená tepová frekvence (115 tepů/min), zaznamenáno nadměrné pocení a potlačené reflexy. Vyšetření prokázalo serotoninovou toxicitu, které pravděpodobně vznikla druhotnou interakcí serotonergních léčiv a právě kratomu. Posléze bylo zjištěno, že muž tuto skupinu léčiv užíval za účelem zmírnění bolesti, a právě kratomem chtěl toto působení dále zesílit. Léčba byla zahájena v podobě podávání benzodiazepinů, a potíže ustoupily v průběhu dvou dnů (Grundmann, 2022; Ahmad, 2022).

Dalším uvedeným příkladem je padesátišestiletý muž trpící syndromem chronické bolesti. Produkty kratomu začal užívat po vysazení oxycotinu, za účelem zmírnění příznaků a současné terapie abstinence na opioidní látky. Jeho pravidelným každodenním rituálem byla konzumace sedmi vrchovatých polévkových lžic prášku z nadrcených listů, rozpuštěných v džusu. Poté co se náhle rozhodl s kratomem skoncovat, přibližně po uplynutí dvanácti hodin se u muže dostavily obtíže ve formě nauzey, zvracení doprovázené rýmou,

pocity úzkosti a agrese společně s opětovnou neutěšitelnou chutí na kratom. Uvědomoval si závažnost svého stavu, avšak předchozí pokusy končily neúspěchem. Muži byla indikována léčba buprenorfinem pro okamžité odstranění potíží. Nadále se vyhýbal užívání jakýkoliv návykových látek, a hladina léčiva se v řádu měsíců snižovala (Grundmann, 2022).

3.5.6 Toxicita kratomu

V současnosti již bylo provedeno významné množství vědeckých studií zaměřených na testování míry toxicity alkaloidů z listů rostliny *Mitragyna speciosa* působících na živé organismy. Udává se, že v případě myši byla opakovaně zaznamenána smrtelná dávka 200 mg/kg, jenž je obsažena v rozmezí 22 až 67 gramů čerstvých listů. V porovnání s tím letální dávka (LD₅₀) heroinu u myši činí necelých 24 mg/kg. V případě psa nebyl pozorován jakýkoliv toxický účinek ani v případě podání extraktu v množství 920 mg/kg (Firmasyah, 2020; Kratina, 2021).

Toxicita MTG se u myši projevuje histopatologickými změnami v oblasti jater, ledvin a mozku, souvisejícími se změnami v biochemické a hematologické diagnostice. Ze studie dále vyplynulo, že při podání MTG myším v množství 1 - 10 mg/kg, můžeme hovořit o relativně bezpečné látce. Avšak dlouhodobé užívání vyšších dávek, obzvláště v kombinaci s dalšími podanými léčivými látkami, vedlo k rozvoji závažných toxických účinků, v ojedinělých případech vedoucí k úmrtí pokusných zvířat (Firmasyah, 2020; Papsun, 2019).

K převážné většině závažných zdravotních komplikací souvisejících s užíváním kratomu dochází v případě jeho současného požití společně s dalšími léčivy nebo drogami. Jak již bylo řečeno, mitragynin spolu s dalšími alkaloidy kratomu inhibuje aktivitu cytochromů CYP2D6, a tedy dochází k nárůstu sérových hladin užívaných léčiv nad jejich terapeutická rozmezí, což může vést k závažným, život ohrožujícím stavům (Sharma, 2021; Mata, 2020).

Vzhledem k dostupnosti koncentrovaných alkoholových extraktů z kratomu v západních zemích, které výrazně převyšují hladiny obsaženého MTG v čerstvých či sušených listech pocházejících z Asie, může být zdravotním rizikem pro uživatele neodhadnutí dávkování těchto preparátů. Kromě vysokého podílu MTG může být dalším rizikem pro uživatele nedeklarované složení preparátů z kratomu. V této souvislosti se na trzích objevují preparáty s příměsemi opioidních látek, jako je *O*-desmethyltramadol, morfin či hydrokodon, případně jiných neznámých či toxických látek (Sharma, 2021; Basiliere, 2020; Papsun, 2019).

V současné době nejsou definována jasná rozmezí sérových koncentrací mitragyninu, potažmo jeho metabolitů. Vzhledem ke konkrétním klinickým intoxikacím a s tím spojenými nežádoucími účinky nemohou být tyto přičítány užívání samotného kratomu, jelikož jde v mnoha případech o multilékové otravy či spolužívání jiných návykových a psychotropních látek. V případech zneužívání opioidních látek jsou v reportovaných případových studiích zaznamenány nižší koncentrace alkaloidů kratomu od cca 50 – 600 ng/ml, zatímco v případech koadministrace kratomu s neopioidními látkami se zvyšují tolerované dávky, a tedy jsou zaznamenány i vyšší stanovované koncentrace mitragyninu a jeho metabolitů (Mata, 2020; Papsun, 2019; Kronstrand, 2011; Holler, 2011).

3.6 Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemická analytická metoda určená pro separaci a analýzu látek ve složitých směsích. Může jít jak o kvalitativní analýzu, kdy výsledkem je informace o přítomnosti látky ve vzorku, nebo kvantitativní analýzu, kdy je výsledkem množství konkrétní látky ve vzorku. Jinými slovy, chromatografie je tedy separační a zároveň fyzikálně-chemická metoda určená k dělení a analýze látek, přičemž jejím hlavním principem je rozdělování složek

směsi mezi mobilní a stacionární fází. Mobilní fází se obecně rozumí plyn nebo kapalina, která se v chromatografickém systému pohybuje a odtud se odvozuje další dělení na plynovou nebo kapalinovou chromatografii, zatímco nepohyblivou stacionární fází bývá pevná látka nebo film kapaliny vázaný na pevné částice nebo chromatografickou kolonu. Vliv na separaci má složení mobilní fáze a druh stacionární fáze a pak také princip separace, tedy rozpouštění látek ve stacionární fází, adsorpce látek na stacionární fází, nebo dochází k iontové výměně se stacionární fází, či jde o prosté dělení látek na základě jejich molekulové hmotnosti (Opekar, 2010).

V současnosti jsou chromatografické techniky rozšířené v mnoha odvětvích lidské činnosti. Jde například o petrochemický (monitorování složení ropných produktů) a farmaceutický průmysl (kontrola kvality, analýza nečistot aktivních farmaceutických substancí), v biochemii o analýzu markerů různých nemocí, v toxikologii pro kvalitativní screening neznámých tox a kvantifikaci léčiv a drog v biologických matricích, dále pro kontrolu kvality vody a v rámci kontroly bezpečnosti a falšování potravin a v mnoha dalších aplikacích (Opekar, 2010).

3.6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se obecně využívá k separaci plynů a látek, které lze reprodukovatelně převést do plynné fáze, jde především o nepolární (těkavé) látky a látky teplotně stabilní. Pro polární látky (tj. ty které obsahují amino, hydroxy a karboxylové skupiny) je nutná jejich chemická modifikace s cílem snížení jejich bodu varu a pro jejich interakci s běžně užívanými stacionárními fázemi v plynové chromatografii. Tato modifikace se nazývá derivatizace a látky využívané k tomuto procesu se nazývají derivatizační činidla. Nevýhodou derivatizace je především nutnost izolace látek ze vzorků

před vlastní derivatizací, samotná doba derivatizace, náročnost na erudici personálu a cenové náklady (Skoog, 2021).

3.6.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je metoda, která jak již bylo uvedeno, funguje na principu separace látek mezi dvě složky (mobilní a stacionární fáze) v analytickém systému. Separace zde probíhá na základě dvou mechanismů, a sice na afinitě látek ke stacionární fázi (kterých je v současnosti dispozici několik stovek pro konkrétní skupiny látek) a zároveň na eluční síle mobilní fáze. Stran využití eluční síly rozpouštědel (např. methanol, acetonitril, isopropanol, voda aj.) použitých v mobilních fázích existují dva módy průtoku rozpouštědel kolonami, jednak jde o tzv. izokratickou analýzu, kdy je složení mobilní fáze po celou dobu analýzy konstantní; a za druhé jde o tzv. gradientovou analýzu, během které se složení mobilní fáze mění v čase (obecně s rostoucím poměrem organické složky v mobilní fázi ke konci analýzy, jelikož organická rozpouštědla mají větší eluční sílu než voda). Dále se mohou pro zvýšení eluční síly mobilní fáze přidávat různé modifikátory (např. kyselina mravenčí, kyselina octová a jejich amonné soli) (Nováková, 2021).

3.6.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry, MS) je metoda založená na ionizaci molekul, při níž dochází ke generování kladných či záporně nabitých iontů v plynné fázi a jejich dělení ve vakuu působením elektrických a magnetických polí podle poměru hmotnosti iontů a jejich náboje (m/z). K separaci vzniklých iontů jsou využívány různé analyzátoři jako např. jednoduchý nebo trojitý kvadrupól, iontová past nebo analyzátor doby letu. Pro kvantitativní analýzu se nejčastěji využívají trojité kvadrupóly

v tzv. MRM módu (Multiple Reaction Monitoring), kdy v prvním kvadrupólu je vybrán prekurzorový iont (nejčastěji molekulární ion) a po jeho fragmentaci je monitorován zpravidla nejintenzivnější produktový iont, který je následně zaznamenán na detektoru, např. elektronovým násobičem či fotonásobičem (De Hoffmann, 2007; Dass, 2007).

3.7 Metody stanovení mitragyninu a jeho metabolitů

Alkaloidy z rostliny *Mitragyna speciosa* jsou bazické látky a mohou být extrahovány z biologických matric za použití různých extrakčních technik jako např. extrakce kapaliny kapalinou (liquid liquid extraction, LLE) nebo extrakcí na pevné fázi (solid phase extraction, SPE), ovšem lze využít i prostou precipitaci vzorků (Philipp, 2009; Papsun, 2019).

Nejběžnějšími metodami pro identifikaci a stanovení mitragyninu a dalších alkaloidů v toxikologické praxi jsou metody plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), nebo kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Ačkoliv GC-MS byla historicky v toxikologii zlatým standardem, nemá však dostatečnou citlivost pro polární látky, což snižuje možnosti jejího užití jakožto univerzální metody v kontextu rozšíření a dostupnosti kapalinové chromatografie. Jednou z prvních GC-MS metod pro detekci mitragyninu a dalších alkaloidů v moči vyvinul Phillip a jeho kolektiv, avšak metoda nebyla dostatečně citlivá s limitem detekce kolem 100 ng/ml a bylo zapotřebí derivatizace (Philipp, 2009).

Jiná publikovaná GC-MS metoda, která byla vyvinuta pro účely vyšetření a kvantifikace mitragyninu v biologických matricích odebraných při pitvě (s podezřením na intoxikaci kratomem), využívala pro extrakci alkaloidů SPE, a tedy došlo ke snížení detekčních a kvantifikačních limitů tj. 30 ng/ml a 50 ng/ml ve vzorcích (McIntyre, 2015).

Jak již bylo uvedeno, LC-MS metody nepotřebují derivatizaci a zároveň poskytují vyšší citlivost ve srovnání s GC-MS. První popsaná LC-MS metoda byla vyvinuta pro stanovení mitragyninu v séru a moči u krys. Ze začátku byly vyvíjené LC-MS metody zaměřeny primárně na stanovení mitragyninu, v posledních několika publikacích se paleta stanovovaných látek rozšiřuje především o 7-hydroxymitragynin a dále o speciogynin, ajmalicin a paynanthenin. Příkladem může být opět LC-MS metoda pro stanovení 7-hydroxymitragyninu v krysím séru s limitem kvantifikace 10 ng/ml. Pro ilustraci o lepší citlivosti LC-MS metod je možné uvést metodu vyvinutou Basiliere, kdy po SPE extrakci bylo dosaženo limitů detekce a kvantifikace v rozmezí 0,5 – 2 ng/ml pro mitragynin, 7-hydroxymitragynin, a navíc i pro speciogynin a pro paynanthenin (Basiliere, 2020; Firmasyah, 2020).

Obecně lze říci, že do současnosti již bylo vyvinuto mnoho desítek metod, které se zabývají detekcí a stanovením alkaloidů obsažených v kratomu a které jsou buď specifické pro konkrétní biologickou matici (sérum, krev, moč, žaludeční obsah, tkáň) či multimatriční, a zároveň s úspěchem dosahují nízkých detekčních a kvantifikačních limitů bez ohledu na použitou extrakční metodiku (Mata, 2020; Papsun, 2019; Basiliere, 2020).

4 METODIKA

4.1 Použité chemikálie

- Mitragynin – standard dodaný od firmy Cerilliant, 100 µg/ml v methanolu (Round Rock, Texas, USA);
- Deuterovaný mitragynin – standard dodaný od firmy Cerilliant, 100 µg/ml v methanolu (Round Rock, Texas, USA);
- 7-hydroxymitragynin – standard dodaný od firmy Cerilliant, 100 µg/ml v methanolu (Round Rock, Texas, USA);
- Hovězí sérum (Fetal Bovine Serum Qualified, Biosera, Česká republika);
- Acetonitril – LC-MS CHROMASOLV, ≥99,9 %, Sigma-Aldrich, Německo;
- Kyselina mravenčí – LC/MS, 98–100 %, Fischer Chemical, Česká republika;
- Methanol – LC-MS CHROMASOLV, ≥99,9 %, Sigma-Aldrich, Německo;
- Deionizovaná voda – získaná purifikací přístrojem Milli-Q (Millipore, Bedford, USA)

Standardní roztoky mitragyninu, deuterovaného mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu dodané od firmy Cerilliant, které sloužily k provedení metodické části bakalářské práce, jsou zdokumentovány na Obrázku 5.



Obrázek 5 – Standardy dodané od firmy Cerilliant (vlastní zdroj)

4.2 Ředění zásobních roztoků

Mitragynin (zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml)

Příprava pracovního roztoku mitragyninu o koncentraci 1 mg/ml

- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 10 ml a přidá se 990 ml MeOH (methanol). Vznikne pracovní roztok mitragyninu o koncentraci 1 mg/ml MeOH.

Příprava kalibračních roztoků mitragyninu o koncentraci 5000, 500, 200, 50 ng/ml

- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 50 ml a přidá se 950 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok mitragyninu o koncentraci 5000 ng/ml MeOH (kalibrační roztok A)
- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 5 ml a přidá se 995 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok mitragyninu o koncentraci 500 ng/ml MeOH (kalibrační roztok B)
- Z pracovního roztoku o koncentraci 1 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 200 ml a přidá se 800 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok mitragyninu o koncentraci 200 ng/ml MeOH (kalibrační roztok C)
- Z pracovního roztoku o koncentraci 1 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 50 ml a přidá se 950 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok mitragyninu o koncentraci 50 ng/ml MeOH (kalibrační roztok D)

7-OH-mitragynin (zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml)

Příprava pracovního roztoku 7-OH-mitragyninu o koncentraci 1 mg/ml

- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 10 ml a přidá se 990 ml MeOH. Vznikne pracovní roztok 7-OH-mitragyninu o koncentraci 1 mg/ml MeOH.

Příprava kalibračních roztoků 7-OH-mitragyninu o koncentraci 5000, 500, 200 a 50 ng/ml

- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 50 ml a přidá se 950 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok 7-OH-mitragyninu o koncentraci 5000 ng/ml MeOH (kalibrační roztok *a*)
- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 5 ml a přidá se 995 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok 7-OH-mitragyninu o koncentraci 500 ng/ml MeOH (kalibrační roztok *b*)
- Z pracovního roztoku o koncentraci 1 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 200 ml a přidá se 800 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok 7-OH-mitragyninu o koncentraci 200 ng/ml MeOH (kalibrační roztok *c*)
- Z pracovního roztoku o koncentraci 1 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 50 ml a přidá se 950 ml MeOH. Vznikne kalibrační roztok 7-OH-mitragyninu o koncentraci 50 ng/ml MeOH (kalibrační roztok *d*)

Mitragynin-d₃ (zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml) – vnitřní standard

Příprava pracovního roztoku mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml

- Ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml se do eppendorfky odpipetuje 10 ml a přidá se 990 ml MeOH. Vznikne pracovní roztok mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml MeOH.

4.3 Příprava kalibrace

Příprava kalibrace mitragyninu a 7-OH-mitragyninu v kalibračních bodech 500, 50, 20, 5, 0 ng/ml

- Do eppendorf mikrozkuřavky se odpipetuje 100 ml hověžího séra. K séru se přidá 15 ml z pracovního roztoku mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml, 10 ml kalibračního roztoku *A* a 10 ml kalibračního roztoku *a*.

Poté se do mikrozkušavky napipetuje 300 µl ACN, zkušavka se uzavře a důkladně protřepe na třepačce. Poté se mikrozkušavka vloží do centrifugy a stočí se 1 min při otáčkách 15000 rpm. Supernatant se převede do řádně označené skleněné vialky. Vznikne kalibrační bod o koncentraci 500 ng/ml.

- Do eppendorf mikrozkušavky se odpipetuje 100 µl hovězího séra. K séru se přidá 15 µl z pracovního roztoku mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml, 10 µl kalibračního roztoku *B* a 10 µl kalibračního roztoku *b*. Poté se do mikrozkušavky napipetuje 300 µl ACN, zkušavka se uzavře a důkladně protřepe na třepačce. Poté se mikrozkušavka vloží do centrifugy a stočí se 1 min při otáčkách 15000 rpm. Supernatant se převede do řádně označené skleněné vialky. Vznikne kalibrační bod o koncentraci 50 ng/ml.
- Do eppendorf mikrozkušavky se odpipetuje 100 µl hovězího séra. K séru se přidá 15 µl z pracovního roztoku mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml, 10 µl kalibračního roztoku *C* a 10 µl kalibračního roztoku *c*. Poté se do mikrozkušavky napipetuje 300 µl ACN, zkušavka se uzavře a důkladně protřepe na třepačce. Poté se mikrozkušavka vloží do centrifugy a stočí se 1 min při otáčkách 15000 rpm. Supernatant se převede do řádně označené skleněné vialky. Vznikne kalibrační bod o koncentraci 20 ng/ml.
- Do eppendorf mikrozkušavky se odpipetuje 100 µl hovězího séra. K séru se přidá 15 µl z pracovního roztoku mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml, 10 µl kalibračního roztoku *D* a 10 µl kalibračního roztoku *d*. Poté se do mikrozkušavky napipetuje 300 µl ACN, zkušavka se uzavře a důkladně protřepe na třepačce. Poté se mikrozkušavka vloží do centrifugy a stočí se 1 min při otáčkách 15000 rpm. Supernatant

se převede do řádně označené skleněné vialky. Vznikne kalibrační bod o koncentraci 5 ng/ml.

- Do eppendorf mikrozkušavky se odpipetuje 100 µl hovězího séra. K séru se přidá 15 µl z pracovního roztoku mitragyninu-d₃ o koncentraci 1 mg/ml, poté se do mikrozkušavky napipetuje 300 µl ACN, zkumavka se uzavře a důkladně protřepe na třepačce. Poté se mikrozkušavka vloží do centrifugy a stočí se 1 min při otáčkách 15000 rpm. Supernatant se převede do řádně označené skleněné vialky. Vznikne kalibrační bod o koncentraci 0 ng/ml.

Koncentrace vnitřního standardu mitragyninu-d₃ v každém kalibračním bodu je 150 ng/ml.

4.4 Příprava vzorku

Vzorek séra o objemu 100 µl byl smíchán s 10 µl roztoku interního standardu (deuterovaný mitragynin, c = 100 ng/ml v methanolu) v Eppendorf zkumavce. Poté bylo do Eppendorf zkumavky přidáno 300 µl acetonitrilu. Připravená směs byla promíchána a odstředěna (1 min, 13 400 rpm). Poté byl odebrán objem 100 µl a napipetován do redukce objemu pro chromatografickou vialku (insert). Takto připravený vzorek byl vložen do autosampleru a nadávkován do LC-MS/MS přístroje. Stejným způsobem byla připravena kalibrace v rozsahu 0–500 ng/ml mitragyninu a jeho metabolitu, kdy se přidávalo 10 µl standardu mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu o příslušné koncentraci.

4.5 Přístroje

- kapalinový chromatograf Nexera X2 Shimadzu HPLC (Nakagyo-ku, Kyoto, Japan), vyobrazen na Obrázku 6;
- tandemový hmotnostní detektor AB Sciex QTRAP 5500 (MA, USA)
- software Analyst 1.7.3 (AB SCIEX);
- separační kolona – Kinetex 2,6 μm Bifenyl 100 A, 50 x 2,1 mm (Phenomenex);
- centrifuga – Multi Speed Vortec MSV-3500 (Biosan, Litva)



Obrázek 6 - Kapalinový chromatograf Nexera X2 Shimadzu HPLC (vlastní zdroj)

4.6 Měření

Připravený vzorek séra byl změřen na kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Měření bylo provedeno na separační koloně, která byla temperována na teplotu 40 °C. Mobilní fáze byla připravena ze dvou složek: složka A: 0,1 % kyselina mravenčí v deionizované vodě; složka B: acetonitril. Pro měření byl použit průtok 0,5 ml/min, izokratická eluce, poměr mobilních fází 55 % A a 45 % B. Objem dávkovaného vzorku byl 1 µl. Obecné nastavení přístroje a význam jednotlivých operačních parametrů překračují rámec bakalářské práce, a proto nejsou v práci uvedeny a vysvětleny.

Tabulka 1 - Instrumentální nastavení pro mitragynin, 7-hydromitragynin a mitragynin-D3

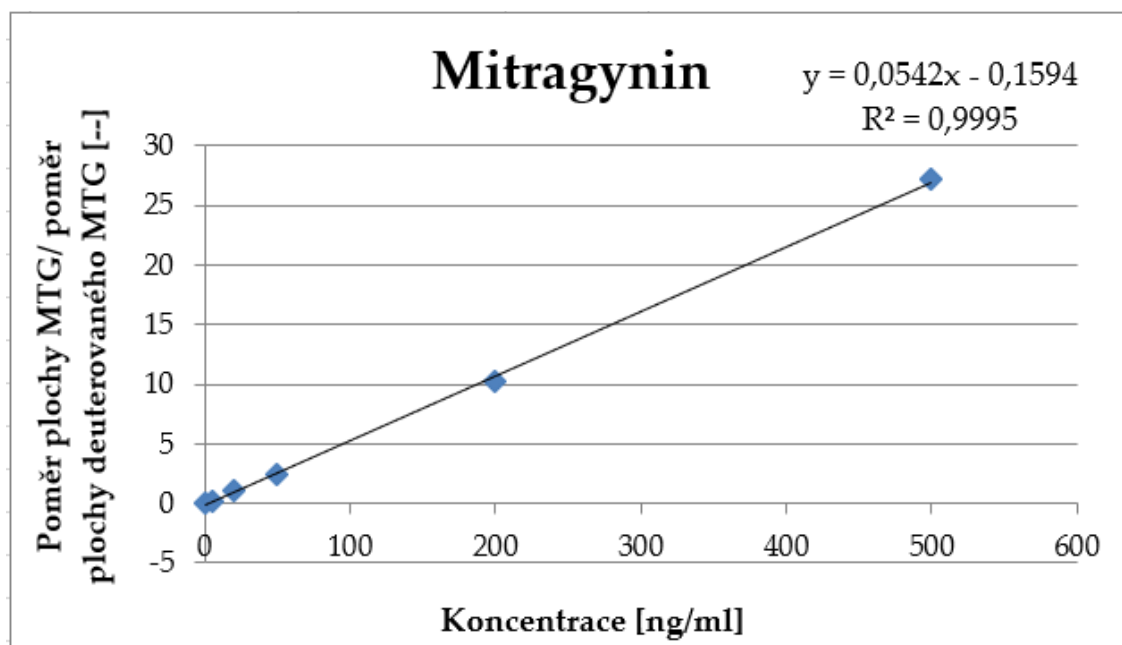
Analyt	Rt (min)	Q1 → Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Mitragynin	0,720	399,300 → 174,100	80,000	10,000	40,000	10,000
7-hydroxymitragynin	0,410	415,300 → 190,000	236,000	10,000	35,000	22,000
Mitragynin-D3	0,710	402,138 → 177,100	136,000	10,000	39,000	14,000

5 VÝSLEDKY

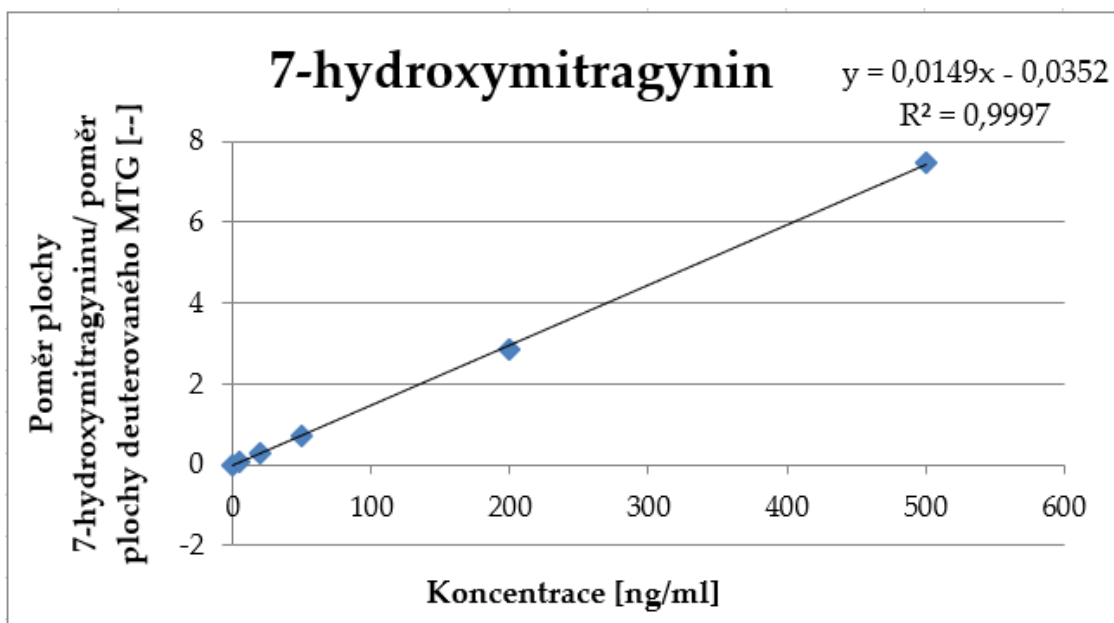
5.1 Optimalizace chromatografické metody

Tabulka 2 - Porovnání výšky píku mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu při různém složení mobilních fází

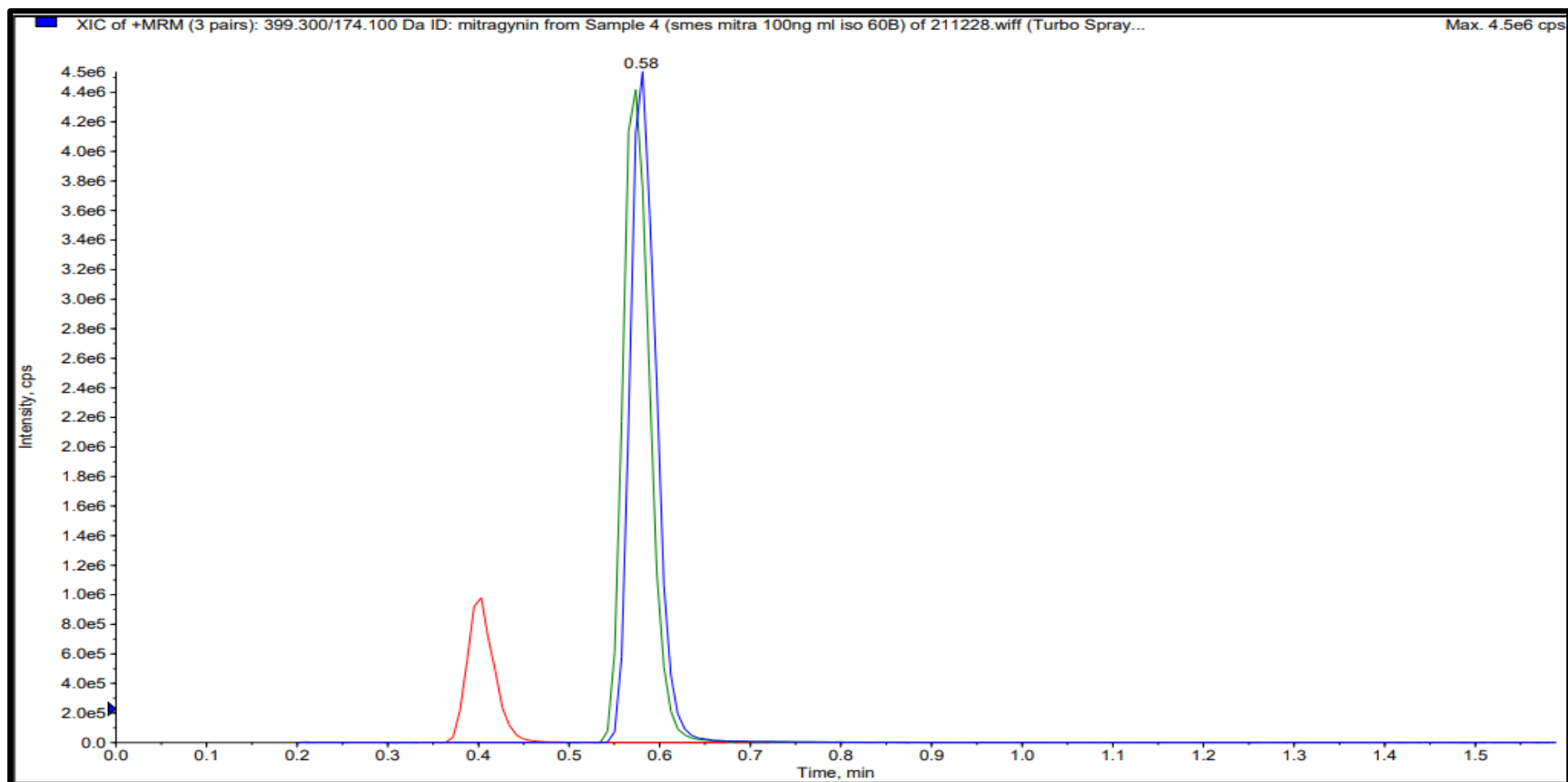
Poměr mobilních fází MA/MB	Intenzita signálu (výška píku)	
	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
70:30	401000	1400000
60:40	605000	2700000
50:50	805000	3400000
40:60	904000	4600000
30:70	890000	4500000
20:80	872000	4200000



Obrázek 7- Kalibrační křivka pro mitragynin (vlastní zdroj)



Obrázek 8 - Kalibrační křivka pro 7-hydroxymitragynin (vlastní zdroj)



Obrázek 9 - Chromatogram mitragyninu, 7-hydroxymitragyninu a interního standardu (mitragynin D3) při koncentraci 100 ng/ml. **Modrá** - mitragynin; **červená** - 7-hydroxymitragynin; **zelená** - mitragynin D3 (vlastní zdroj)

5.2 Validační parametry metody

Limit kvantifikace (LK) je nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Je většinou vyjádřen jako koncentrace analytu v přípravku (substanci). Za použití instrumentálních metod s hodnotou signálu závislou na koncentraci analytu se obvykle stanoví LK jako taková koncentrace, která poskytne poměr signál/šum 10:1. Lze však využít i možnosti změřit opakovatelnost na požadované hodnotě LK, kdy musí být přijatelná přesnost a správnost do 20 % (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013).

Přesnost je mírou shody mezi jednotlivými výsledky nezávislých analytických měření. Vyjadřuje se obvykle jako relativní směrodatná odchylka (RSD, %) souboru výsledků. Opakovatelnost je mírou přesnosti při aplikaci metody v laboratoři v krátkém časovém intervalu, obvykle jde pouze o konkrétní den, stejným analytikem, na stejném analytickém přístroji, se stejnými standardy a laboratorním příslušenstvím (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013).

Reprodukovatelnost vyjadřuje míru přesnosti při použité dané měřící metody v dané laboratoři v jiné dny, rozdílným laboratorním personálem, jak při přípravě vzorku, tak i vlastním analytickém měření. Správnost je shoda výsledků získaných příslušnou analytickou metodou se skutečnou hodnotou. Měla by být ověřena v požadovaném kalibračním rozsahu metody (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013).

Tabulka 3 - Validační parametry: Opakovatelnost při koncentraci 5 ng/ml

Měření	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
1	4,8	4,3
2	4,9	6,0
3	5,9	6,6
4	4,3	5,3
5	4,3	4,9
6	4,5	4,6
Medián	4,7	5,1
Směrodatná odchylka (SD)	0,5	0,8
Relativní směrodatná odchylka (RSD, %)	11,8	15,7
Správnost (%)	93,0	102,0

Tabulka 4 - Validační parametry: Opakovatelnost při koncentraci 10 ng/ml

Měření	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
1	11,3	8,8
2	10,5	9,2
3	12,2	8,7
4	11,4	9,4
5	11,4	9,7
6	11,5	10,5
Medián	11,4	9,3
Směrodatná odchylka (SD)	0,5	0,6
Relativní směrodatná odchylka (RSD, %)	4,3	6,5
Správnost (%)	114,0	93,0

Tabulka 5 - Validační parametry: Opakovatelnost při koncentraci 400 ng/ml

Měření	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
1	450	387
2	459	390
3	462	377
4	426	398
5	376	412
6	455	383
Medián	452,5	388,5
Směrodatná odchylka (SD)	30,1	11,3
Relativní směrodatná odchylka (RSD, %)	6,7	2,9
Správnost (%)	113,1	97,1

Tabulka 6 - Validační parametry: Reprodukovatelnost při koncentraci 10 ng/ml

Měření	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
1	7,8	9,1
2	10,4	10,8
3	10,5	11,5
4	10,9	10,5
5	7,9	8,9
6	10,4	11,3
Medián	10,4	10,7
Směrodatná odchylka (SD)	1,3	1,0
Relativní směrodatná odchylka (RSD, %)	12,3	9,5
Správnost (%)	104,0	106,5

Tabulka 7 - Validační parametry: Reprodukovatelnost při koncentraci 400 ng/ml

Měření	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
1	444	401
2	381	464
3	476	491
4	444	467
5	383	494
6	463	389
Medián	444,0	465,5
Směrodatná odchylka (SD)	36,9	41,3
Relativní směrodatná odchylka (RSD, %)	8,3	8,9
Správnost (%)	111,0	116,4

Pro ověření tzv. carover, tj. možného přenosu analytu mezi analýzami, byly připraveny tři vzorky o koncentraci 5000 ng/ml mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu (uvedená koncentrace byla 10x vyšší než nejvyšší použitý kalibrační bod). Připravené vzorky byly třikrát po sobě změřeny a za nimi byl změřen nulový kalibrátor (vzorek bez přítomnosti analytů pouze s interním standardem), kdy v měření nulového kalibrátoru nebyly prokázány uvedené analyty nad limitem stanovitelnosti.

5.3 Reálné vzorky

Přípravu reálných anonymizovaných vzorků (řešených na pracovišti Ústavu soudního lékařství a toxikologie v rámci rutinních analýz) provedl RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D. dle vypracované metodiky přípravy vzorků řešitelky bakalářské práce. Výsledky kvantitativního stanovení mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu v séru reálných pacientů jsou zaznamenány v Tabulce 8 níže.

Tabulka 8 - Výsledky reálných vzorků anonymizovaných vzorků pacientů

Koncentrace, ng/ml		
Pacient	Mitragynin	7-hydroxymitragynin
1	3250	876
2	109	25
3	573	95
4	429	19
5	122	6
6	15	Negativní
7	85,7	Negativní

6 DISKUZE

Užívání produktů z rostliny *Mitragyna speciosa* je celosvětovým trendem posledních několika let, který je v současnosti taktéž pozorován v ČR, ať již s ohledem na propagaci v různých distribučních kanálech pro rekreační uživatele, tak i z hlediska zvýšené incidence přítomnosti těchto alkaloidů z výše uvedené rostliny v případech požadavků na vyšetření intoxikací neznámé etiologie (Kratina, 2021).

Tato situace vede k nutnosti vývoje metod pro identifikaci mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu a jejich případné kvantifikaci v biologických materiálech. Tyto analyty nejsou běžnou součástí tzv. STA (standardní toxikologická analýza), kdy prvotní imunochemický screening je zaměřen na klasické skupiny drog a některá zneužívaná léčiva (benzodiazepiny či barbituráty), avšak sety pro mitragynin nejsou zatím komerčně dostupné (byť vzhledem k akutní vlně zneužívání kratomu lze očekávat jejich implementaci mezi standardní imunochemické testy).

V tomto ohledu je nutné tyto analyty zahrnout do screeningových vyšetření biologického materiálu za pomoci pokročilých instrumentálních metod, což jsou z toxikologického hlediska metody plynové a kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí. Nicméně s ohledem na určení závažnosti intoxikace mitragyninem/ 7-hydroxymitragyninem je třeba vyvíjet i rychlé a dostupné kvantitativní metody pro stanovení míry ovlivnění těmito látkami u konkrétních pacientů.

Pro naplnění tohoto cíle a po kritickém zhodnocení dosavadních metod publikovaných v relevantní literatuře (Kerrigan, 2022), a i na základě praktických zkušeností přípravy vzorků pro kvantitativní vyšetření různých tox a léků na pracovišti školitele, byla zvolena prostá precipitace vzorků séra. Vzhledem k výše uvedené technice přípravy vzorků a její nekompatibilitě s metodou plynové chromatografie byla pro stanovení koncentrace mitragyninu

a 7-hydroxymitragyninu zvolena metoda kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS).

Na základě fyzikálně-chemických vlastností a molekulové struktury stanovovaných látek, a zkušeností s analýzami obdobných látek, byla vybrána kolona Kinetex 2,6 μm Biphenyl 100 A pro chromatografickou separaci. Při použití této kolony je při analýze těchto látek dosahováno výrazně kratších časů analýz při zachování dostatečné separace. Standardní mobilní fáze pro široké spektrum analytů stanovovaných metodou LC-MS/MS je voda s aditivem (kyselina mravenčí) a acetonitril. Pro testování účinnosti separace a odezvy signálu jednotlivých analytů byla zvolena izokratická eluce s různým poměrem vodné a organické fáze. Výsledkem jsou metody v Tabulce 2, kdy nejlepších výsledků pro oba analyty s ohledem na poměr separační účinnosti a výšky píků jednotlivých analytů bylo dosaženo při poměru složek 40 (0,1 % kyselina mravenčí ve vodě):60 (acetonitril).

Po evaluaci výše uvedených chromatografických podmínek byla třikrát připravena pětibodová kalibrace (příprava kalibračních bodů je uvedena v kapitole 4.3 Příprava kalibrace) v rozsahu 5 – 500 ng/ml ve spikovaném hovězím séru pro oba analyty. Průběh kalibrační křivek pro oba analyty je uveden na Obrázku 7 a 8. V tomto kalibračním rozsahu bylo ověřeno, že kalibrační křivka pro mitragynin a 7-hydroxymitragynin je lineární a korelační koeficient je 0,9995 pro mitragynin a 0,9997 pro 7-hydroxymitragynin.

Na Obrázku 9 je zobrazen ilustrativní chromatogram separace mitragyninu (100 ng/ml), 7-hydroxymitragyninu (100 ng/ml) a deuterovaného interního standardu mitragyninu (100 ng/ml). V rámci ověření validity kvantitativní metody je důležitým prvkem stanovení jejího limitu kvantifikace (LK); u kvalitativních metoda je běžné stanovovat i limit detekce (LOD). Vzhledem k údajům z literatury a případné relevantnosti naměřených sérových hodnot pro klinické účely byla arbitrárně zvolena hodnota limitu kvantifikace 5 ng/ml pro oba analyty. Poměr signál/šum při uvedené koncentraci vykazoval hodnotu 350, byl by tedy prostor, v případě potřeby, snížit tento limit kvantifikace na desetiny ng/ml.

S ohledem na publikované sérové koncentrace v případech intoxikací (Domingo, 2017; Karinen, 2014) byl zvolen jako dostačující minimální limit kvantifikace 5 ng/ml pro mitragynin i 7-hydroxymitragynin, který byl úspěšně validován s přijatelnou přesností a správností do 20 % (Tabulka 3). Ostatní validační parametry (opakovatelnost, reprodukovatelnost, správnost) byly testovány na dvou koncentračních hladinách (10 a 400 ng/ml) a výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 4 – 7. Dosažené výsledky splňují kritéria pro validaci toxikologické metody (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013).

Vzhledem k dosaženému limitu kvantifikace při použití minimálního množství séra, nebylo nutné experimentálně testovat prekoncentrační metody přípravy vzorku, tedy LLE a SPE, jelikož z hlediska citlivosti je prostá precipitace vzorku séra acetonitrilem dostatečná. Použití výše uvedených prekoncentračních metod je vhodné pro průkaz a stanovení látek, které jsou v klinických vzorcích obsaženy v sub nanogramových množstvích, zde můžeme zmínit například (syntetické) kanabinoidy nebo deriváty fentanylu. Přesto je však důležité vést všechny možnosti úpravy a prekoncentrace vzorku v patrnosti a umět je úspěšně aplikovat pro konkrétní analyty.

Jednou z prvních publikovaných prací popisující využití prosté proteinové precipitace a LC-MS instrumentace pro kvantitativní stanovení mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu byla práce norských autorů pro potřebu toxikologické interpretace a potvrzení předpokladu o důvodu úmrtí (Karinén, 2014). Prezentované limity kvantifikace pro mitragynin a 7-hydroxymitragynin byly stanoveny okolo 50 ng/ml ve vzorcích séra, což vzhledem k naměřeným sérovým koncentracím mitragyninu (1060 ng/ml) a 7-hydroxymitragyninu (150 ng/ml), bylo dostačující.

V následujícím článku z r. 2017 (Domingo, 2017), popisujícím další fatální případy spojené s užitím kratomu, němečtí autoři vypracovali citlivější metodiku stanovení koncentrace mitragyninu v séru, kdy dosáhli limitu kvantifikace

na 2 ng/ml (snížení limitu kvantifikace mohlo být dosaženo vhodnou volbou separační kolony a optimalizací separační podmínek, použitím pokročilejší LC-MS instrumentace či dalšími faktory). Takové snížení LK se ukázalo opodstatněné, protože v některých případech byly koncentrace mitragyninu/7-hydroxymitragyninu změřeny v jednotkách až desítkách ng/ml, byť se tyto koncentrace většinou objevují v případech multilékových otrav, kdy samotný příspěvek užití kratomu nemusí být hlavní příčinou úmrtí či projevů nežádoucích účinků.

Metody založené na prosté proteinové precipitaci pro přípravu vzorků obsahujících mitragynin/7-hydroxymitragynin jsou vhodné pro rutinní toxikologickou diagnostiku zejména s ohledem na jednoduchost a rychlost analytického výsledku. Složitější přípravu vzorků (LLE, SPE) jsou samozřejmě také používány v mnoha laboratořích, ale jejich primární využití nachází uplatnění spíše v dalším výzkumu distribuce a farmakokinetiky minoritních alkaloidů obsažených v rostlině *Mitragyna speciosa* (Meireles, 2019).

Vypracovaná metodika vyvinutá v rámci bakalářské práce byla použita pro kvantitativní stanovení mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu v séru reálných pacientů na základně předešlých screeningových vyšetření těchto vzorků. Z výsledků (Tabulka 8) vyplývá, že koncentrace mitragyninu se pohybovala v rozmezí od 15 do 3250 ng/ml a pro 7-hydroxymitragynin bylo rozmezí od 6 do 876 ng/ml.

V tomto kontextu je vyvinutá metodika dostatečně citlivá pro stanovení koncentrací mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu v reálných biologických matricích. Vyvinutá metodika stanovení mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu byla ověřena nezávislou mezilaboratorní kontrolou pro toxikologické laboratoře (Quantitative Screening Analysis, QSA) pod záštitou Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCH).

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj specifické metodiky pro kvantitativní stanovení hlavních indolových alkaloidů – mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu (které jsou obsaženy v rostlině *Mitragyna speciosa*; kratom) v lidských sérových vzorcích za pomoci kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Identifikace a kvantifikace těchto analytů je stále častěji zařazována mezi požadovaná toxikologická vyšetření, proto je nutné vyvíjet dostatečně přesné a v praxi využitelné metody. Vzhledem k narůstající spotřebě těchto preparátů se zvyšuje také počet případů intoxikací spojených s užitím kratomu, v ojedinělých případech vedoucí až k úmrtí uživatele.

Vyvinutá metodika uvedená v bakalářské práci byla validována dle platných validačních parametrů pro vývoj toxikologických metod a ověřena nezávislou mezilaboratorní kontrolou pro toxikologické laboratoře.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE	kolizní energie
CNS	centrální nervová soustava
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
CYP2C19	izoforma cytochromů P2C19
CYP2D6	izoforma cytochromů P2D6
CYP450	cytochromy P450
DP	deklasterizační potenciál
ED ₅₀	střední efektivní dávka
EP	vstupní potenciál
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
hKOR	typ opioidních receptorů
hMOR	typ opioidních receptorů
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LD ₅₀	účinná dávka, která způsobí 50 % mortalitu
LK	limit kvantifikace
LLE	extrakce kapaliny kapalinou
LOD	limit detekce
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MTG	mitragynin
Q ₁ ; Q ₃	náboje fragmentu
RSD	relativní směrodatná odchylka
R _t	retenční čas
SPE	extrakce na pevné fázi
STA	standardní toxikologická analýza
SZÚ	Státní zdravotní ústav

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMAD, Islamudin, Wisnu PRABOWO, Muhammad ARIFUDDIN et al., 2022. Mitragyna Species as Pharmacological Agents: From Abuse to Promising Pharmaceutical Products. *Life* [online]. **12**(2) [cit. 2022-07-21]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life12020193

AL MUQARRABUN, Laode a Amrianto AMRIANTO, 2021. Mitragynine: A review of its extraction, identification, and purification methods. *Current Research in Biosciences and Biotechnology* [online]. **3**(1), 165-171 [cit. 2022-06-24]. ISSN 26861623. Dostupné z: doi:10.5614/crbb.2021.3.1/TMPNSA4H

BASILIERE, Stephanie, Justin BROWER, Ruth WINECKER, Laura FRIEDERICH a Sarah KERRIGAN, 2020. Identification of five mitragyna alkaloids in blood and tissues using liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Forensic Toxicology* [online]. **38**(2), 420-435 [cit. 2022-08-08]. ISSN 1860-8965. Dostupné z: doi:10.1007/s11419-020-00537-8

BROSE, Julia, Kin LAU, Thu DANG et al., 2021. The *Mitragyna speciosa* (Kratom) Genome: a resource for data-mining potent pharmaceuticals that impact human health. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [online]. **11**(4) [cit. 2022-07-20]. ISSN 2160-1836. Dostupné z: doi:10.1093/g3journal/jkab058

DASS, Chhabil, 2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. 1. Hoboken: Wiley-Interscience, 608 s. ISBN 978-0-471-68229-5.

DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT, 2007. *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Chichester: John Wiley, 512 s. ISBN 978-0-470-03310-4.

DOMINGO, Olwen, Gabriele ROIDER, Andreas STÖVER, Matthias GRAW, Frank MUSSHOF, Hans SACHS a Wolfgang BICKER, 2017. Mitragynine concentrations in two fatalities. *Forensic Science International* [online]. **271**, 1-7 [cit. 2022-08-10]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2016.12.020

FIRMASYAH, Adang, Melvia SUNDALIAN a Muhammad TAUFIQ, 2020. Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) for a New Medicinal: a Review of Pharmacological and Compound Analysis. *Biointerface Research in Applied Chemistry* [online]. **11(2)**, 9704-9718 [cit. 2022-07-31]. ISSN 2069-5837. Dostupné z: doi:10.33263/BRIAC112.97049718

GOH, Yong Sean, Thiruventhan KARUNAKARAN, Vikneswaran MURUGAIYAH, Rameshkumar SANTHANAM, Mohamad Hafizi ABU BAKAR a Surash RAMANATHAN, 2021. Accelerated Solvent Extractions (ASE) of *Mitragyna speciosa* Korth. (Kratom) Leaves: Evaluation of Its Cytotoxicity and Antinociceptive Activity. *Molecules* [online]. **26(12)** [cit. 2022-08-03]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26123704

GRUNDMANN, Oliver, Robert HENDRICKSON a Michael GREENBERG, 2022. Kratom: History, pharmacology, current user trends, adverse health effects and potential benefits. *Disease-a-Month* [online]. [cit. 2022-07-20]. ISSN 00115029. Dostupné z: doi:10.1016/j.disamonth.2022.101442

HOLLER, Justin M., Shawn P. VORCE, Pamela C. MCDONOUGH-BENDER, Joseph MAGLUILO, Carol J. SOLOMON a Barry LEVINE, 2011. A Drug Toxicity Death Involving Propylhexedrine and Mitragynine*. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. **35(1)**, 54-59 [cit. 2022-08-08]. ISSN 1945-2403. Dostupné z: doi:10.1093/anatox/35.1.54

KAMBLE, Shyam, Abhisheak SHARMA, Tamara KING et al., 2020. Exploration of cytochrome P450 inhibition mediated drug-drug interaction potential of kratom alkaloids. *Toxicology Letters* [online]. **319**, 148-154 [cit. 2022-07-28]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2019.11.005

KARINEN, Ritva, Jan Toralf FOSEN, Sidsel ROGDE a Vigdis VINDENES, 2014. An accidental poisoning with mitragynine. *Forensic Science International* [online]. **245**, 29-32 [cit. 2022-08-10]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2014.10.025

KARUNAKARAN, Thiruventhan, Kok NGEW, Ahmad ZAILAN, Vivien MIAN JONG a Mohamad ABU BAKAR, 2022. The Chemical and Pharmacological Properties of Mitragynine and Its Diastereomers: An Insight Review. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **13** [cit. 2022-07-23]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.805986

KERRIGAN, Sarah a Stephanie BASILIERE, 2022. Kratom: A systematic review of toxicological issues. *WIREs Forensic Science* [online]. **4**(1), 1-29 [cit. 2022-07-11]. ISSN 2573-9468. Dostupné z: doi:10.1002/wfs2.1420

KRATINA, Tomáš a Hana TOŠNAROVÁ, 2021. *Spolek Český modrý mák informuje: MITRAGYNA SPECIOSA (KRATOM) JAKO SUBSTITUCE ZÁVISLOSTI NA OPIÁTECH?*. Praha: ČZU v Praze, 11 s. ISBN 978-80-213-3077-1.

KRONSTRAND, R., M. ROMAN, G. THELANDER a A. ERIKSSON, 2011. Unintentional Fatal Intoxications with Mitragynine and O-Desmethyltramadol from the Herbal Blend Krypton. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. **35**(4), 242-247 [cit. 2022-08-08]. ISSN 0146-4760. Dostupné z:

doi:10.1093/anatox/35.4.242

KRUEGEL, Andrew C., Madalee M. GASSAWAY, Abhijeet KAPOOR, András VÁRADI, Susruta MAJUMDAR, Marta FILIZOLA, Jonathan A. JAVITCH a Dalibor SAMES, 2016. Synthetic and Receptor Signaling Explorations of the Mitragyna Alkaloids: Mitragynine as an Atypical Molecular Framework for Opioid Receptor Modulators. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **138**(21), 6754-6764 [cit. 2022-08-08]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.6b00360

KRUEGEL, Andrew, Rajendra UPRETY, Steven GRINNELL et al., 2019. 7-Hydroxymitragynine Is an Active Metabolite of Mitragynine and a Key Mediator of Its Analgesic Effects. *ACS Central Science*. **5**(6), 992-1001. ISSN 2374-7943. Dostupné z: doi:10.1021/acscentsci.9b00141

MATA, Dani C. a Kevin M. ANDERA, 2020. Case series: Mitragynine blood and tissue concentrations in fatalities from 2017 to 2018 in Orange County, CA, USA. *Forensic Chemistry* [online]. **17** [cit. 2022-08-08]. ISSN 24681709. Dostupné z: doi:10.1016/j.forc.2019.100205

MATSUURA, Hélio Nitta a Arthur Germano FETT-NETO, 2015. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. *Plant Toxins* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1-2 [cit. 2022-02-27]. ISBN 978-94-007-6728-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-6728-7_2-1

MCINTYRE, Iain M., Amber TROCHTA, Susan STOLBERG a Steven C. CAMPMAN, 2015. Mitragynine 'Kratom' Related Fatality: A Case Report with Postmortem Concentrations. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. **39**(2), 152-155 [cit. 2022-08-08]. ISSN 1945-2403. Dostupné z: doi:10.1093/jat/bku137

MEIRELES, Vânia, Tiago ROSADO, Mário BARROSO et al., 2019. *Mitragyna speciosa: Clinical, Toxicological Aspects and Analysis in Biological and Non-Biological Samples*. *Medicines* [online]. **6**(1) [cit. 2022-06-24]. ISSN 2305-6320. Dostupné z: doi:10.3390/medicines6010035

NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA, 2021. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 256 s. ISBN 978-80-270-8559-0.

OMAR, Faisal, Abu Montakim TAREQ, Ali M. ALQAHTANI, Kuldeep DHAMA, Mohammed Abu SAYEED, Talha Bin EMRAN a Jesus SIMALGANDARA, 2021. *Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective*. *Molecules* [online]. **26**(8), 1-24 [cit. 2022-02-28]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26082297

OPEKAR, František, 2010. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 204 s. ISBN 978-802-4617-756.

PAPSUN, Donna M, Ayako CHAN-HOSOKAWA, Laura FRIEDERICH, Justin BROWER, Kristopher GRAF a Barry LOGAN, 2019. *The Trouble With Kratom: Analytical and Interpretative Issues Involving Mitragynine*. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. **43**(8), 615-629 [cit. 2022-08-08]. ISSN 0146-4760. Dostupné z: doi:10.1093/jat/bkz064

PHILIPP, Anika A., Dirk K. WISSENBACH, Siegfried W. ZOERNLEIN, Oliver N. KLEIN, Jidapha KANOGSUNTHORNROT a Hans H. MAURER, 2009. *Studies on the metabolism of mitragynine, the main alkaloid of the herbal drug Kratom, in rat and human urine using liquid chromatography-linear ion*

trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **44**(8), 1249-1261 [cit. 2022-08-08]. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1607

POWAR, C.B. a G.R. CHATWAL, 2007. *Biochemistry* [online]. 2.vydání. Mumbai, Delhi, Nagpur: Global Media, 250-256 s. [cit. 2022-03-02]. ISBN 9781642875614. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=3011213>

PROZIALECK, Walter C., Peter C. LAMAR, Michael KRUPP, Matthew MOON, Laura E. PHELPS a Oliver GRUNDMANN, 2021. Kratom Use Within the Context of the Evolving Opioid Crisis and the COVID-19 Pandemic in the United States. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **12** [cit. 2022-08-04]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.729220

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. **37**(7), 452-474 [cit. 2022-08-04]. ISSN 0146-4760. Dostupné z: doi:10.1093/jat/bkt054

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. **37**(7), 452-474 [cit. 2022-08-04]. ISSN 0146-4760. Dostupné z: doi:10.1093/jat/bkt054

SHARMA, Abhisheak a Christopher MCCURDY, 2021. *Assessing the therapeutic potential and toxicity of Mitragyna speciosa in opioid use disorder* [online]. **17**(3), 255-257 [cit. 2022-07-30]. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1080/17425255.2021.1853706

SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R.

CROUCH, 2021. *Analytická chemie*. 9. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 984 s. ISBN 978-807-5920-430.

SUHAIMI, Farah, Nurul YUSOFF, Rahimah HASSAN, Sharif MANSOR, Visweswaran NAVARATNAM, Christian MÜLLER a Zurina HASSAN, 2016. Neurobiology of Kratom and its main alkaloid mitragynine. *Brain Research Bulletin* [online]. **126**, 29-40 [cit. 2022-07-21]. ISSN 03619230. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresbull.2016.03.015

TODD, D., J. KELLOGG, E. WALLACE et al., 2020. Chemical composition and biological effects of kratom (*Mitragyna speciosa*): In vitro studies with implications for efficacy and drug interactions. *Scientific Reports* [online]. **10**(1) [cit. 2022-07-29]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-76119-w

ZAREMBO, John E., Bryce DOUGLAS, Joseph VALENTA a Jerry A. WEISBACH, 1974. Metabolites of Mitragynine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **63**(9), 1407-1415 [cit. 2022-08-08]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600630916

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Rostlina <i>Mitragyna speciosa</i> , neboli kratom (Karunakaran, 2022)	12
Obrázek 2 - Komerčně dostupné produkty kratomu (Grundmann, 2022).....	14
Obrázek 3 - Chemická struktura alkaloidů obsažených v kratomu (Sharma, 2021).....	22
Obrázek 4 - Chemická struktura mitragyninu (McIntyre, 2015).....	24
Obrázek 5 – Standardy dodané od firmy Cerilliant (vlastní zdroj).....	36
Obrázek 6 - Kapalinový chromatograf Nexera X2 Shimadzu HPLC (vlastní zdroj).....	41
Obrázek 7 - Kalibrační křivka pro mitragynin (vlastní zdroj).....	43
Obrázek 8 - Kalibrační křivka pro 7-hydroxymitragynin (vlastní zdroj)	44
Obrázek 9 - Chromatogram mitragyninu, 7-hydroxymitragyninu a interního standardu (mitragynin D3) při koncentraci 100 ng/ml. Modrá - mitragynin; červená - 7-hydroxymitragynin; zelená - mitragynin D3 (vlastní zdroj).....	45

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Instrumentální nastavení pro mitragynin, 7-hydromitragynin a mitragynin-D3.....	42
Tabulka 2 - Porovnání výšky píku mitragyninua a 7-hydroxymitragyninu při různém složení mobilních fází.....	43
Tabulka 3 - Validační parametry: Opakovatelnost při koncentraci 5 ng/ml.....	47
Tabulka 4 - Validační parametry: Opakovatelnost při koncentraci 10 ng/ml.....	47
Tabulka 5 - Validační parametry: Opakovatelnost při koncentraci 400 ng/ml.....	48
Tabulka 6 - Validační parametry: Reprodukovatelnost při koncentraci 10 ng/ml.....	48
Tabulka 7 - Validační parametry: Reprodukovatelnost při koncentraci 400 ng/ml.....	49
Tabulka 8 - Výsledky reálných vzorků anonymizovaných vzorků pacientů	50

12 SEZNAM PŘÍLOH

K této bakalářské práci s názvem Analýza mitragyninu v biologickém materiálu pomocí chromatografických metod nejsou k dispozici žádné přílohy.