

**VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav chemie přírodních látek

Nové psychoaktivní látky

HABILITAČNÍ PRÁCE

PRO OBOR

ORGANICKÁ CHEMIE

Praha 2020

Ing. Martin KUCHAR, Ph.D.

Obsah

1	Úvod.....	2
2	Psychoaktivní látky	3
3	Úvod do problematiky nových psychoaktivních látek	4
3.1	Legislativní rámec nových psychoaktivních látek.....	6
3.2	Prevalence užívání nových psychoaktivních látek	7
4	Metody detekce nových psychoaktivních látek	9
5	Skupiny nových psychoaktivních látek	10
5.1	Deriváty katinonu	10
5.1.1	Syntéza metabolitů katinonů a jejich deuteriem značených analog	11
5.1.2	Syntéza metabolitů mefedronu	12
5.1.3	Syntéza metabolitů methylonu	12
5.1.4	Syntéza metabolitů MDPV (3,4-methylenedioxypropylamfonu).....	13
5.2	Agonisté kanabinoidních receptorů	13
5.2.1	Syntetické kanabinoidy	14
5.3	Disociativní anestetika	15
5.3.1	Ketamin.....	16
5.3.2	MXE (methoxetamin)	17
5.3.3	DXE (deschlorketamin)	17
5.4	Deriváty tryptaminu.....	18
5.4.1	Syntetické tryptaminy	21
5.5	Deriváty fenylethylaminu	22
6	Chirální separace enantiomerů a vibrační spektroskopie nových psychoaktivních látek	23
6.1	Chirální separace enantiomerů NPS	23
6.2	XPRD spektroskopie	23
7	Imunochemické metody detekce.....	24
7.1.1	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA).....	24
7.1.2	Enzymová imunoanalýza ve formátu LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay)	26
8	Vlastní příspěvek k imunochemické detekci NPS	27
8.1	Charakterizace protilátek a vývoj imunochemických testů.....	29
8.2	Syntéza haptenu odvozených od syntetických kanabinoidů	29
8.3	Syntéza haptenu odvozených od syntetických tryptaminů	32
8.4	Syntéza derivátů syntetických fenethylaminů.....	33
9	Výhledy dalšího studia v oblasti nových psychoaktivních látek.....	34
10	Seznam zkratk	35
11	Literatura	38
12	Seznam příloh a přílohy.....	49

1 Úvod

V předkládané habilitační práci jsou shrnuty výsledky nezávislé vědecko-výzkumné činnosti, které se věnuji na Ústavu chemie přírodních látek VŠCHT Praha v Laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek (BAFA). Od roku 2014, kdy pracoviště vzniklo, rozvíjím problematiku detekce a identifikace kontrolovaných substancí v různých biologických matricích, především se jedná o psychoaktivní látky a přípravky zneužívané ve sportu. Spolupracujeme také s forenzními institucemi a dalšími ústavy na VŠCHT Praha na rozvoji využití spektroskopických metod, jako je Ramanova spektroskopie, chiroptické metody a nukleární magnetická rezonance. Se svými studenty vyvíjíme syntetické postupy malých molekul (haptenu) vhodných k přípravě imunogenů pro imunizace zvířat, které slouží k sestavení imunochemických metod k detekci psychoaktivních látek v biologickém materiálu. Dále se věnujeme analýze hub, rostlinných či živočišných vzorků s obsahem alkaloidů nebo fytokannabinoidů.

V úvodní části habilitační práce jsou nejprve diskutovány základní struktury nových psychoaktivních látek a jejich působení na lidský organismus. Kapitola je doplněna o legislativní rámec kontrolovaných substancí. Výstupy našeho pracoviště jsou využívány jako podklady pro hodnocení rizik psychoaktivních látek a vedly ke změně legislativy na úrovni normativních právních aktů. Následuje problematika jejich identifikace v biologickém materiálu z pohledu forenzní toxikologie, tedy jejich stanovení v různých matricích – moči, slinách nebo krevní plasmě – různými instrumentálními technikami. Důraz je kladen na identifikaci metabolitů nových psychoaktivních látek pomocí hmotnostní spektrometrie a stanovení jejich farmakokinetického profilu. K ověření správnosti navržené struktury jsme syntetizovali řadu metabolitů včetně jejich izotopicky značených forem. Připravené analytické standardy byly dále využity pro stanovení látek například v psychotropních houbách a ve vzorku žáby *Bufo alvarius*. Nové psychoaktivní látky se často vyskytují v racemických směsích, což podnítilo náš zájem o studium jednotlivých enantiomerů. Zavedení metody chirálních separací v preparativním měřítku přineslo možnost testovat biologické účinky jednotlivých enantiomerů a také popsat jejich vibračně spektroskopické charakteristiky. Vibrační spektroskopie bývá první volbou při rychlé a mnohdy i terénní identifikaci neznámých látek. Naším příspěvkem je využití rentgenové práškové difrakce k identifikaci i složitějších směsí klasických drog a nových psychoaktivních látek. Tato metoda našla uplatnění i při nalezení anorganických příměsí v zadržených vzorcích drog. Výstupy této části práce jsou publikovány v 18 mezinárodních impaktovaných časopisech.

Druhá část je věnována syntéze malých molekul – použitých pro vývoj imunoanalytických metod k detekci nových psychoaktivních látek. Výsledky této práce jsou předmětem tří patentů, dvou užitečných vzorů, deseti funkčních vzorků a dvou článků publikovaných v mezinárodních impaktovaných časopisech.

2 Psychoaktivní látky

Psychoaktivní rostliny a houby provázejí lidskou historii již od neolitu.¹ Primitivní kultury využívaly celou řadu rostlin a hub jak k léčení, tak k navození změněných stavů vědomí za účelem věštění, či osobního duchovního růstu. Již v neolitu byla hojně využívána šťáva z makovic, před 5 000 lety znali léčivé účinky konopí v Číně, listy koky zase starověcí Inkové žvýkali při práci ve vysoké nadmořské výšce. Začátkem 20. století však řada látek začala být primárně využívána pro zábavu a množství fatálních intoxikací opiem a kokainem vedlo k zákazu většiny psychoaktivních látek.²

Jak byly v historii vnímány psychoaktivní látky, si můžeme představit z následujících citací slavných učenců starověku.³

Sběr čerstvého máku poprvé popsal Dioskorides:

„Těm, kdo chtějí vyrábět opium, se doporučuje rozříznout nožem hvězdici na makovici a ze stran se do makovice zaříznout, pak setřít vytékající tekutinu prstem na lžičku. Zanedlouho je třeba se vrátit, neboť vyteče další kapka, nyní již hustší. Totéž opakovat další den.“

Theofrastos ve starověkém Řecku píše o durmanu metelovém:

„Podáváme jednu drachmu, má-li se pacient povzbudit a mít o sobě libé myšlenky, dvojitou dávku, má-li blouznit a mít vidiny, trojitou, má-li nadosmrti zešilet a čtyřnásobnou dávku podáváme, má-li pacient zemřít.“

Klaudios Galénos (Claudius Galenus), známý jako Galén, napsal:

„Opium je nejsilnějším ze všech známých léků, ale také nebezpečným prostředkem, který může při předávkování způsobit „věčný spánek“.“

Současná společnost si k užívání psychoaktivních látek vybudovala společensky akceptovaná pravidla pro vybrané typy těchto látek. Západní kultura si za svoje společensky povolené psychoaktivní látky vybrala alkohol a nikotin ve formě tabákových výrobků. Jiné kultury však mají v oblíbě i takové, které by západní kultura vnímala jako nelegální. Názorným příkladem je koka, která je volně dostupná na jihoamerických trzích a žvýkání koky je v těchto zemích stejně akceptovatelné jako pití kávy v naší kultuře. Přírodní národy mají ve své tradici ceremoniální užívání psychedelik, příkladem mohou být ayahuasca, Peyot (*Lophophora williamsi*) nebo houby rodu *Psilocybe*. Státy Blízkého východu zase užívají jako stimulační drogu katu (*Catha edulis*), jihoasijské státy si oblíbily kratom (*Mitragyna speciosa*) a betelové oříšky (*Areca catechu*). Na africkém kontinentu dominuje kromě katy také iboga (*Tabernanthe iboga* Baill.). Některá náboženství jsou s užíváním drog úzce svázána, příkladem může být užívání konopí skupinou rastafariánů na Jamajce nebo ceremonie mezinárodně aktivní církve Santo Daime s ayahuascou.

Na druhou stranu není pochyb o tom, že zneužívání (abúzus) omamných a psychotropních látek (OPL), které většina populace zahrnuje pod pojem drogy, přináší mnohé problémy. Celá řada OPL je návyková a snadno vzniká fyzická i psychická závislost na jejich užívání (adikce). Problémy spojené se závislostí na OPL jsou trojího druhu – zdravotní, sociální a ekonomické. U osob závislých na OPL bývají téměř pravidlem poruchy vyvolané toxickými účinky OPL a infekční onemocnění. Značné riziko, především u opiátů a nových psychoaktivních látek, představuje rovněž možnost předávkování, které mnohdy končí smrtí. Uživatelé pod vlivem OPL ztrácejí kontrolu nad svým jednáním a nejsou schopni vnímat zpětnou vazbu svého chování, což v oblasti sociální vede k zpretrhání existujících vazeb s okolím a často i s rodinou. Přidruženým důsledkem bývá ztráta zaměstnání a finančních prostředků, což vede

ke vzniku sekundární kriminality, která souvisí s potřebou uživatelů drog získat finanční prostředky k obstarání denní dávky. Nelze pominout ani zapojení organizovaného zločinu, který ve světovém měřítku vydělává na produkci a distribuci OPL astronomické částky. V poslední době jsou také slyšet hlasy, které poukazují na environmentální rozměr produkce drog. Drastické odlesňování deštných pralesů k zakládání kokových plantáží a znečištění spojené s výrobou kokainu v Amazonii je jedním z viditelných příkladů. Z těchto důvodů je prakticky po celém světě legislativa regulující produkci, distribuci a užívání OPL restriktivní a přístup státních orgánů vůči producentům, distributorům a konzumentům OPL represivní.

3 Úvod do problematiky nových psychoaktivních látek

Na drogové scéně se v posledních letech kromě tradičních drog (kokain, opiáty, amfetaminy, konopí s vysokým obsahem THC) objevují také nové syntetické drogy (NSD). Důvodem je snaha výrobců a distributorů obejít stávající legislativní normy, v nichž jsou omamné a psychotropní látky obvykle vymezeny taxativně. Na ilegální trh se tak dostávají analoga známých látek s psychoaktivním potenciálem, která dosud nejsou uvedena na seznamu ilegálních látek, nebo jejichž prekurzory nejsou kontrolovanými substancemi. Hlavní nebezpečí spojené s užíváním NSD tkví v nedostatku informací o jejich farmakokinetickém a toxikologickém profilu, neboť většina těchto látek neprošla klinickými testy. V řadě případů se studie omezily jen na základní stanovení vazebných konstant na příslušné receptory *in vitro*. NSD však pokrývají široké spektrum účinků, od stimulačních přes euforizující a halucinogenní až po sedativní.⁴

NSD jsou syntetizovány jako strukturní analoga nebo chemické deriváty již zákonem kontrolovaných látek, z čehož vyplývá, že nové syntetické drogy nemohou být na trhu explicitně deklarovány jako drogy, psychostimulancia, či halucinogeny. Obvykle se proto prodávají jako sběratelské předměty, koupelové soli, hnojiva, vykuřovadla, nebo dokonce chemické látky pro výzkumné účely. Touto cestou se jejich výrobci vyhýbají právnímu postihu, především známému paragrafu o šíření toxikomanie. Současný nárůst počtu variant NSD je připisován nejednotné právní úpravě v členských státech EU, dostupností těchto látek prostřednictvím internetových obchodů a ochotě zejména mladých lidí vyhledávat a získávat nové zkušenosti s psychoaktivními látkami.^{5,6}

Vzhledem k tomu, že mezi zneužívané nové drogy nepatří jen syntetické látky, doporučuje EMCDDA (Evropské monitorovací středisko pro drogy a závislosti) používat termín nové psychoaktivní látky (NPS, New Psychoactive Substances), tento termín je i nadále používán v této práci.

EMCDDA definuje NPS následovně: „Omamné a psychotropní látky v čisté podobě nebo směsi, které nejsou uvedeny v seznamu látek podléhajícím regulaci dle konvencí Spojených národů z roku 1961 o návykových látkách a z roku 1971 o psychotropních látkách. Tyto látky se v anglicky psané literatuře nazývají také Designer Drugs a jsou definovány jako: „Psychoaktivní látky produkováné z prekurzorů v nelegálních laboratořích, které jsou navrženy jako analoga nelegálních drog za účelem obejít stávající legislativu, jedná se o imitaci, ne inovaci.“⁷

Často se setkáváme také s označením legal highs („legální povzbuzovák“), (**Obr. 1**), což jsou všechny látky jak syntetického, tak přírodního původu prodávané v „headshopech“, „smartshopech“ či „euforiashopech“. Termín „legal highs“ naznačuje, že se jedná o látky legální, což v závislosti na charakteru národní legislativy může být i pravda. V poslední době se objevují i tzv. „Smart Drugs“ (tj. látky stimulující funkci mozku a nervové soustavy), což mohou být přípravky na úrovni potravinových doplňků, nebo mohou naopak obsahovat různá neregistrovaná nootropika či

stimulanty. Zajímavou skupinu tvoří „Research Chemicals“ prodávané pod zástěrkou látek určených pro výzkumné účely. Záměr prodávat drogy je v těchto obchodech někdy maskován i nabídkou běžného laboratorního plastu a skla.⁸

NPS nejsou zcela novým fenoménem. Mnohé z nich byly syntetizovány již v 70. letech 20. století např. Alexandrem Shulginem, který byl kontroverzním vědcem, ale bezesporu i schopným chemikem a farmakologem.⁹ Vzestup popularity nových psychoaktivních látek s sebou přináší celou řadu problémů. Především se jedná o skutečnost, že jejich výrobci a distributoři bývají vždy o krok napřed před legislativou. Dalším významným problémem je fakt, že často nejsou k dispozici informace o toxicitě a farmakokinetice. Konzumenti nových syntetických drog se tak stávají „pokusnými králíky“ se všemi s tím spojenými riziky. Chybějící rychlé screeningové metody vedou k situacím, že užití nových syntetických drog je možné prokázat pouze pomocí metod klinické biochemie, z nichž jako nejúčinnější se jeví kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s měřením přesné hmoty. Situaci ale komplikuje nedostupnost relevantních spektrálních databází a referenčních standardů.¹⁰



Obrázek 1 Příklady „legal highs“ (foto Kriminalistický ústav).

Zajímavým sociologickým aspektem je také skutečnost, že do kamenných prodejen s „legal highs“ přicházejí velmi mladí lidé, kteří by po klasické droze jinak nesáhli. Z terénního průzkumu vyplývá, že zde funguje psychologický jev, kdy si konzument kupuje drogu v kamenném obchodě a předpokládá, že se jedná o nezávadnou a "schválenou" látku, něco jako legální alternativa k alkoholu. Hodnocení celosvětové prevalence užívání NPS je poměrně obtížné. Důvodem je pestrá a měnící se nabídka nových látek a rozmanitost v jejich značení.¹¹ NPS mohou být prodávány pod svým

chemickým názvem nebo zkratkou, či jako produkty s komerčním názvem, jejichž složení se však může časem měnit. V posledních deseti letech byl na drogové scéně zaznamenán nebývalý nárůst počtu NPS, v souvislosti s tím došlo i k nárůstu uživatelů, kteří hledají legální alternativy dostupných drog.^{12, 13}

3.1 Legislativní rámec nových psychoaktivních látek

Zákony regulující výrobu a distribuci omamných a psychotropních látek obvykle vymezují tyto látky taxativně. Proto je výroba a distribuce psychoaktivních látek, které nejsou explicitně uvedeny v příslušných zákonech, obtížně postižitelná. Jak je uvedeno výše, dle směrnic Rady EU (97/396/JHA) jsou nové syntetické drogy definovány jako: „Látky s omezeným terapeutickým využitím, které nejsou uvedené v seznamu látek podléhajících konvencím Spojených národů z roku 1961 o návykových látkách a 1971 o psychotropních látkách.“. Rozhodnutím Rady EU č. 2005/387/JHA je povinnost tyto látky v unijních zemích hlásit prostřednictvím Systému včasného varování (EWS, z angl. Early Warning System)¹⁴, neboť mohou představovat potenciální ohrožení veřejného zdraví.¹⁵ V roce 2017 vešla v platnost nová směrnice Evropského parlamentu a Rady 2017/2103, která urychluje rozhodovací proces při zařazení NPS na seznam zakázaných látek a ukládá členským státům EU povinnost zařadit tyto látky ve lhůtě 6 měsíců na národní seznam kontrolovaných substancí. Základem české právní úpravy týkající se omamných a psychotropních látek je zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách. Výrazná novela proběhla v roce 2013 (zákonem č. 273/2013 Sb.) a s menšími úpravami je platná do současné doby.¹⁶ Zákon upravuje podmínky zacházení, vývozu, dovozu i tranzitních operací s návykovými látkami. Ve stejné době se podařilo transponovat evropskou legislativu o prekurzorech drog do českého právního systému zákonem č. 272/2013 Sb., o prekurzorech drog, který nabyl účinnosti dne 1. 1. 2014.¹⁷ Zákon sám ale nedefinuje, co je považováno za prekursor a odkazuje se na nařízení Evropského parlamentu a Rady EU č. 273/2004, o prekurzorech drog.¹⁶ Podobně i seznamy omamných a psychotropních látek nejsou součástí zákona, ale jsou uvedeny v nařízení vlády č. 463/2013 Sb., o seznamech návykových látek.¹⁸ Český právní systém neumožňuje efektivní zavedení tzv. generického systému a je tedy nutné seznam látek v nařízení vlády č. 463/2013 Sb. pravidelně novelizovat. Návrh látek je předkládán na základě expertního zhodnocení rizik v rámci pracovní skupiny včasného varování (EWS) pod Úřadem vlády ČR, která vznikla na základě rozhodnutí EMCDDA. Podstatou činnosti této skupiny je posouzení nebezpečnosti a škodlivosti nových látek a v případě potřeby vydání doporučení k zavedení legislativní kontroly.¹⁴ Každoroční novelizace přidávají řádově desítky nových látek (například novelizace č. 243/2015 Sb., č. 46/2017 Sb. a aktuálně platná č. 242/2018 Sb.).

Uvedená skutečnost má přitom význam nejen pro aplikaci zákona o návykových látkách, nýbrž také pro úpravu trestněprávní a případný postih pachatelů drogové trestné činnosti, jenž se řídí zákonem č. 40/2009 Sb. trestního zákoníku. Tzv. „drogové trestné činy“ zákon řadí mezi trestné činy obecně nebezpečné a jejich skutkové podstaty jsou upraveny v ustanovení § 283–287 trestního zákoníku. Zákon obsahuje vlastní definici pojmu „návyková látka“ v ustanovení § 130 trestního zákoníku, dle které se návykovou látkou rozumí alkohol, omamné, psychotropní a jiné látky způsobící nepříznivě ovlivnit psychiku člověka, jeho ovládací a rozpoznávací schopnosti, nebo sociální chování.¹⁹ Tato ustanovení mohou mít významný vliv na posuzování případné trestné činnosti potenciálních pachatelů v souvislosti s těmi NPS, které dosud nejsou uvedeny v seznamech nařízení vlády. Tyto osoby je možné stíhat pro trestný čin šíření toxikomanie ve smyslu § 287 trestního zákoníku. Z tohoto ustanovení vyplývá, že uvedeného trestného činu se dopustí ten, kdo svádí jiného ke zneužívání jiné návykové látky než alkoholu, nebo ho v tom podporuje, anebo kdo zneužívání takové látky jinak podněcuje či šíří. Trestněprávně relevantní jednání se tak nevztahuje pouze k omamným a psychotropním látkám, nýbrž rovněž k látkám návykovým ve smyslu trestního zákoníku, mezi které NPS nepochybně patří.¹⁹ Česká republika patří mezi státy, u nichž je dekriminlizováno držení jen malého množství omamných či

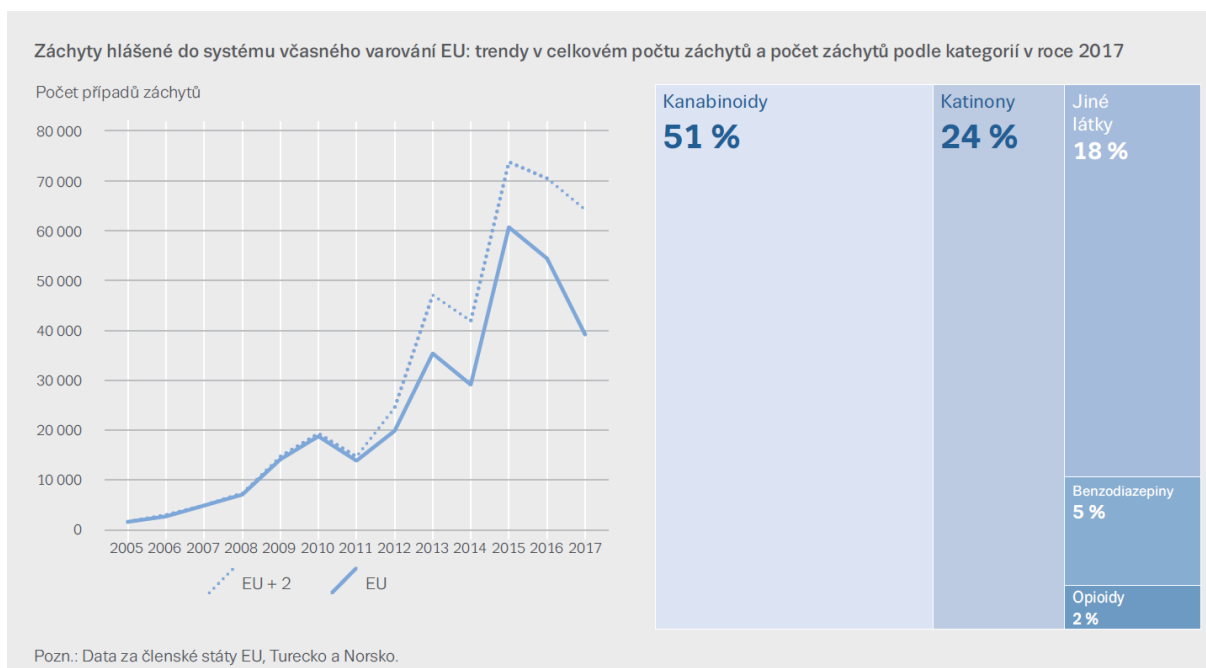
psychotropních látek. Právní předpis pak u jednotlivých trestných činů obecně stanovuje hraniční množství látky, jehož naplnění je ke skutkové podstatě daného trestného činu nezbytné. Reálná hodnota tohoto množství byla až do roku 2013 stanovena na základě odkazujícího ustanovení § 289 odst. 2 trestního zákoníku podzákonným právním předpisem, konkrétně přílohou 2 nařízení vlády č. 455/2009 Sb. Zásahem Ústavního soudu a reakcí Nejvyššího soudu České republiky se stanoviskem sp. zn. Tpjn 301/2013 (stanovisko trestního kolegia Nejvyššího soudu) jsou vymezeny orientační hodnoty tzv. množství většího než malého u jednotlivých omamných a psychotropních látek. Hodnoty jsou uvedeny v příloze tohoto stanoviska, které je základním znakem skutkové podstaty trestného činu dle § 284 odst. 1, 2 trestního zákoníku. U omamných a psychotropních látek, které mají léčebné využití, byla stanovena horní hranice malého množství jako sedminásobek (průměrně) denní dávky. V případě drog, které nemají léčebné využití, bylo postupováno analogicky a prahová množství byla v zásadě stanovena jako cca týdenní (průměrná) dávka. U množství většího, značného a velkého množství, které jsou znakem skutkových podstat drogových trestných činů, se pak vychází z 10, 100 či 1 000 násobku množství většího než malého a také z ostatních kvalifikačních okolností spáchání trestného činu. Kromě omamných a psychotropních látek legislativa pamatuje také na návykové látky v širším pojetí definice, a to v zákoně č. 65/2017 Sb., o ochraně zdraví před škodlivými účinky návykových látek, ve kterém jsou definovány jako látky, které mohou nepříznivě ovlivnit rozpoznávací schopnosti člověka. Návykovou látkou se tak podle definice stávají všechny psychoaktivní látky, včetně těch, které nejsou uvedeny v nařízení vlády č. 463/2013 Sb.²⁰

3.2 Prevalence užívání nových psychoaktivních látek

Běžnými uživateli NPS bývají zejména mladí lidé a studenti ve věku 15–34 let, kteří rádi experimentují s novými látkami pro jejich psychotropní účinek.^{13, 21} Pro spotřebitele jsou NPS atraktivní mimo jiné i z důvodu nepravděpodobné detekce orientačními imunochemickými testy, čímž mohou obejít monitorovací programy zaměřené na detekci drog.²² Nejčastěji jsou tyto látky pro dosažení psychoaktivního účinku podávány perorálně či intranazálně.²³ Některé z nich však mohou být i kouřeny, inhalovány, nebo aplikovány intravenózně.⁹ V bleskovém průzkumu společnosti Eurobarometr z roku 2014, realizovaného mezi 13 000 respondenty ve věku 15–24 let z členských zemí EU, se 8 % dotázaných přiznalo k užití některé NPS v minulosti. V ČR užití NPS potvrdila 4 % z 503 dotázaných.²⁴ V roce 2015 proběhl výzkum prevalence užívání drog v populaci ČR, realizovaný Národním monitorovacím střediskem pro drogy a závislosti (NMS) ve spolupráci s agenturou PPM Factum Research s.r.o., ze kterého vyplynulo, že jakoukoliv nelegální drogu užilo v životě celkem 34,5 % dotázaných ve věkové kategorii 15–64 let (43,2 % mužů a 25,7 % žen).²⁵ Z globálního hlediska poptávka po nových psychoaktivních látkách vrcholila kolem roku 2016⁴, zatímco poslední informace ukazují na pokles užívání NPS, který je dán pravděpodobně změnou legislativních opatření v jednotlivých státech a řadou hlášených nežádoucích účinků NPS.²⁶ Přesto se však některé NPS etablovaly a našly svoji skupinu uživatelů. Jako příklad lze uvést mefedron, jehož prevalence užívání v Anglii byla v letech 2010–2011 stejná jako MDMA a to 1,3 % ve věku 16–59 let. Po zařazení mefedronu na seznam došlo v letech 2017–2018 k poklesu prevalence užívání na 0,1 % ve věku 16–59 let.²⁶

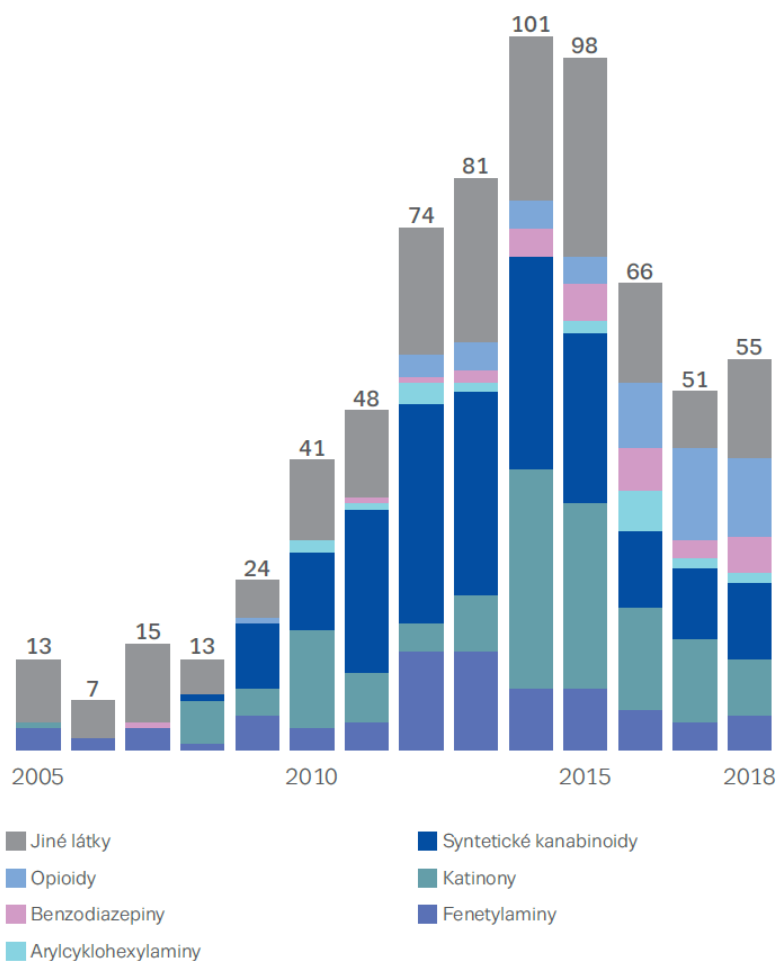
Údaje o záchytech poskytované represivními složkami vypovídají o rostoucím objemu a významu trhu s těmito látkami v posledních pěti letech. V roce 2013 bylo do EWS nahlášeno téměř 47 000 záchyťů v množství přesahujícím 3,1 tuny²⁴, v roce 2015 pak množství záchyťů dosáhlo již hranice 80 000, přičemž syntetické kanabinoidy a katinony tvořily přes 60 % všech záchyťů o celkovém množství 47 000 (lit.²⁷). Poslední statistická data z roku 2017 (**Obr. 2**) uvádějí mírný pokles počtu záchyťů, nicméně

s rozvojem obchodu prostřednictvím dark-netu lze očekávat, že značné množství látek uniklo pozornosti bezpečnostních složek.²⁸



Obrázek 2 Počet záchytů nových psychoaktivních látek nahlášených do Systému včasného varování EU v roce 2017. Převzato z *European drug report 2019: Trends and Developments* s laskavým svolením Národního monitorovacího střediska pro drogy a závislosti ČR.²⁸

NPS se v mnoha případech vyrábějí ve velkých manufakturách v Číně a Indii. Odtud se dovážejí do Evropy, kde se zpracovávají do finálních produktů, balí a distribuují.²⁷ V posledních letech jsou také evidovány případy výroby NPS v evropských zemích.²⁹ Ke konci roku 2018 bylo Evropským monitorovacím centrem pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA) sledováno přes 730 variant nových psychoaktivních látek, přičemž více než 70 % přibýlo na seznam jen za posledních 5 let (**Obr. 3**).²⁸ Ve světě pak mezinárodní organizace UNODC monitoruje ke konci roku 2018 celkem 899 látek.³⁰



Obrázek 3 Počet variant nových psychoaktivních látek nahlášených do Systému včasného varování EU v letech 2005–2018. Převzato z *European drug report 2019: Trends and Developments* s laskavým svolením Národního monitorovacího střediska pro drogy a závislosti ČR.²⁸

4 Metody detekce nových psychoaktivních látek

Výskyt stále nových variant psychoaktivních látek na rekreačním drogovém trhu je neustálou výzvou pro forenzní chemiky a klinické toxikology. K terénní identifikaci samotné látky v makroskopickém měřítku se v praxi používají orientační testy založené na barevné reakci činidla se zkoumaným vzorkem.^{31, 32} Konfirmační analýza následně zahrnuje kombinaci separačních metod s vhodným detektorem a spektroskopických technik založených na Ramanově nebo infračervené spektrometrii.

Předběžné prokázání intoxikace je založeno na imunochemických terénních testech v tzv. formátu LFIA. Komerčně dostupné testy zaměřené na klasické drogy (kokain, opiáty, benzodiazepiny, THC) však nedetekují většinu nových psychoaktivních látek. V těchto imunochemických testech, založených na interakci protilátky s antigenem (stanovovaná droga), hraje významnou roli protilátka, která musí vykazovat dostatečnou senzitivitu a specifitu vůči stanovovanému antigenu. Drobná strukturní změna v molekule antigenu (NPS) může negativně ovlivnit jeho reaktivitu s protilátkou proti původnímu antigenu a zapříčinit tak negativní výsledek testu. Při porovnání struktury NPS a tradičních

drog lze vidět větší či menší strukturní variabilitu, která vysvětluje, proč jsou testy na klasické drogy nevhodné pro stanovení nových drog.

Stanovení nových psychoaktivních látek v biologické matrici je běžně zavedenými metodami značně obtížné. Jako klíčová se pak ukazuje identifikace hlavních prokázaných metabolitů.³³ U sofistikovanějších metod, jako je hmotnostní spektrometrie, nelze NPS identifikovat z důvodu chybějících referenčních hmotnostních spekter v používaných knihovnách. Pokud se tedy objeví neznámá látka, nejprve musí být objasněna její struktura díky kombinaci informací z různých spektroskopických, hmotnostně spektrometrických a chemických metod.³⁴ Laboratoře pracující v oboru klinické a soudní toxikologie tak získají novou referenční látku a poté mohou buď aktualizovat stávající metody, nebo vyvinout nové, které pokryjí i novou psychoaktivní látku.^{35, 36}

5 Skupiny nových psychoaktivních látek

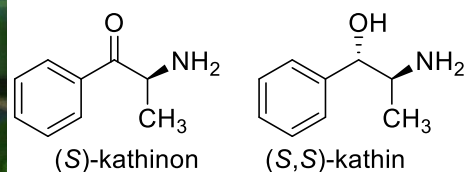
V této kapitole jsou diskutovány hlavní skupiny nových psychoaktivních látek, kterým se věnujeme na našem pracovišti. Na trhu se vyskytují i další skupiny látek (například z kategorie syntetických opiátů, benzodiazepinů či piperazinů), které však nejsou předmětem této práce a nejsou tedy blíže rozebírány.

5.1 Deriváty kathinonu

Syntetické kathinony jsou různorodou skupinou derivátů přírodního (S)-kathinonu (**Obr. 4**). Tento monoaminový alkaloid obsažený ve stromu kata jedlá (*Catha edulis*), je nestabilní a během sušení listů se důsledkem biotransformace redukuje na kathin, jehož účinek na centrální nervovou soustavu je relativně slabý. Proto se pro dosažení stimulačního účinku žvýkají čerstvé listy katy.^{37, 38} Kathinon a kathin stimulují centrální nervovou soustavu a způsobují uvolňování katecholaminů z presynaptických depotních váček. Klinické studie prokázaly vliv žvýkání katy na zvýšení krevního tlaku a tepové frekvence, euforii, bdělost a psychomotorickou aktivitu. Chronické užívání však způsobuje nespavost, deprese a psychózy.^{39, 40, 41, 42, 43}

Syntetické kathinony jsou různorodá skupina derivátů přírodního kathinonu. V posledních letech tvořily tyto látky vedle syntetických kanabinoidů největší skupinu zachycených NPS.²⁸ Obměnou struktury se zachováním farmakoforu vznikl například butylon, fletedron a mefedron.⁴⁴ Na rozdíl od přírodního kathinonu, který se vyskytuje pouze jako (S)-enantiomer, vznikají syntetickou cestou racemické směsi.³⁹ Analogicky k chirálním amfetaminům lze předpokládat, že každý enantiomer může mít jiné biologické účinky. Ke studiu biologické aktivity je však nutná předchozí izolace enantiomerů. Ačkoli syntetických kathinonů je známo již několik desítek, existuje jen velmi málo prací, které se zabývají jejich chirální separací.^{45, 46}

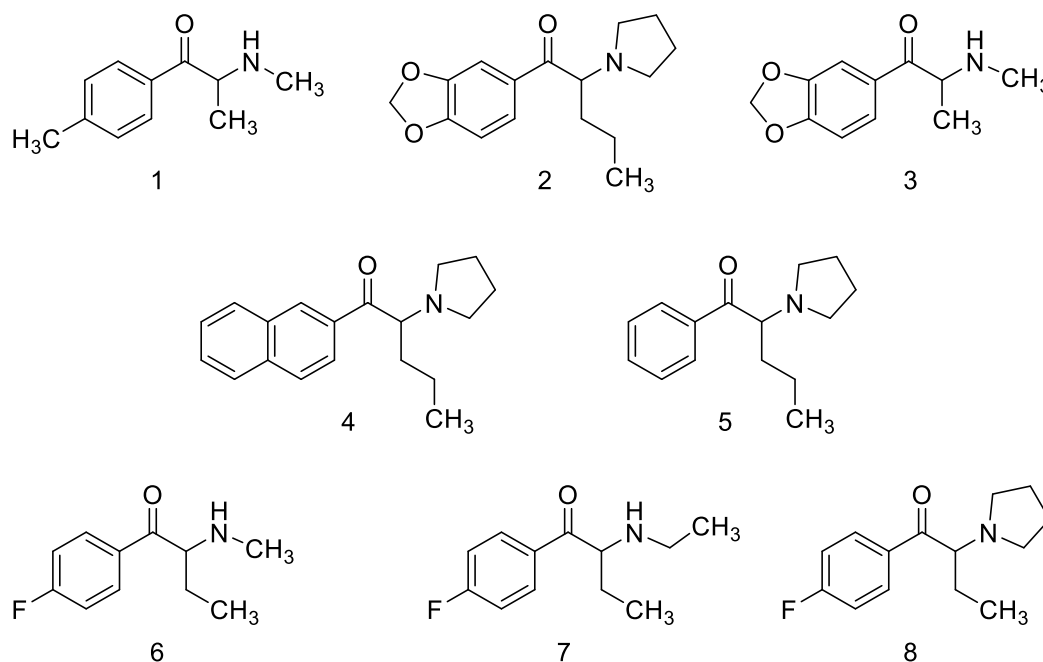
Syntetické kathinony se prodávají především v krystalické formě pod označením Funky, Magic či Flakka jako koupelové soli (bath salt), hnojiva nebo čisticí prostředky. V prostředí internetového prodeje jsou často nabízeny jako „research chemicals“. Podobně jako přírodní kathinon mají syntetická analoga obdobné účinky jako stimulanty kokain a metamfetamin, které zvyšují uvolňování a inhibují zpětné vychytávání noradrenalinu, serotoninu a dopaminu. Podle způsobu užití (orálně, intranasálně, intravenózně nebo rektálně) se liší farmakokinetika a s absorbovanou dávkou také míra nežádoucích účinků. Mezi ně patří psychické poruchy (halucinace, paranoia, neklid, stavy úzkosti, deprese, sebevražedné myšlenky, hyperaktivita, euforie), ale také poruchy srdečního rytmu, hypertenze nebo nedostatečné prokrvení periferních tkání a motání či bolesti hlavy.⁴⁷⁻⁵⁶



Obrázek 4 Kata jedlá (*Catha edulis*), (převzato v souladu s licenčními pravidly z Wikimedia Commons) a struktura (S)-kathinonu a (S,S)-kathinu.

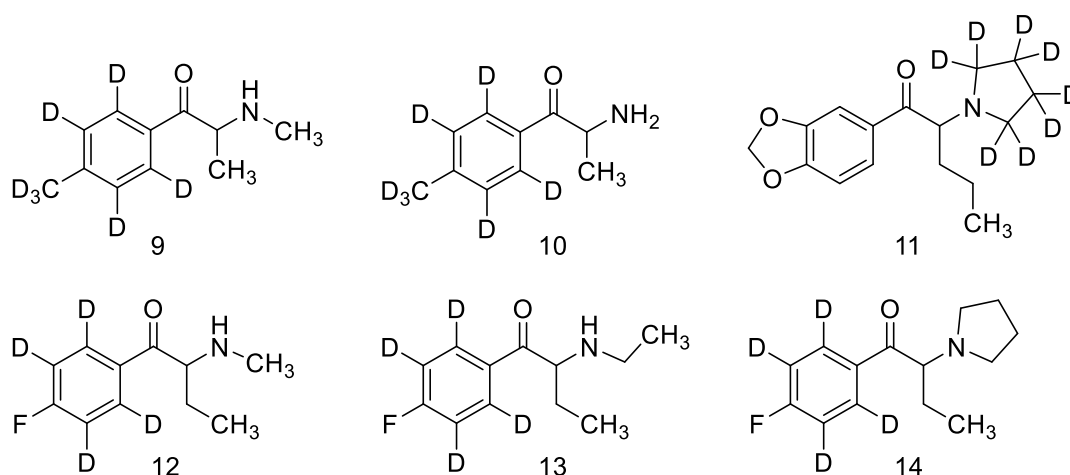
5.1.1 Syntéza metabolitů kathinonů a jejich deuteriem značených analog

V návaznosti na studium metabolismu stimulantů v animálním modelu byly v metabolických klecích podány potkanům kmene *Wistar* perorálně relativně vysoké, ne však letální, dávky vybraných kathinonů. Výběr byl proveden na základě aktuální potřeby mezinárodní organizace EMCDDA a Národního monitorovacího střediska při Úřadu vlády ČR. Výběrová kritéria spočívala v množství hlášených intoxikací, záchytů a epidemiologických dat o užívání NPS v Evropě. Na základě dostupných dat byly vybrány následující látky: mefedron (1), MDPV (2), methylon (3), nafyron (4), α -PVP (5), 4-FBP (6), 4F-NEB (7) a 4F-PBP (8), (Obr. 5). Předběžná identifikace metabolitů v odebraných vzorcích moči zahrnovala analýzu pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Konkrétně k zjištění přesné hmoty byl využit detektor typu qTOF.



Obrázek 5 Struktury vybraných kathinonů: mefedron (1), MDPV (2), methylon (3), nafyron (4), α -PVP (5), 4-FBP (6), 4F-NEB (7) a 4F-PBP (8).

Kvantifikace látek pomocí hmotnostní spektrometrie je v případě využití vnitřního standardu závislá na existenci izotopově značených látek s velmi podobnou charakteristikou jako stanovený analyt. Pro účely kvantifikace katinonů jsme ve spolupráci s Ústavem organické chemie VŠCHT připravili sérii deuteriem značených analytických standardů (**Obr. 6**). Připravené látky byly stabilizovány ve formě hydrochloridu. Deuteriem značené katinony mefedron- d_7 (**9**) a MDPV- d_8 (**10**) byly využity při vývoji metody stanovení série stimulantů ve složité matrici novorozenecké smolky (mekonia). (Příloha č. 1)⁵⁷ Deuteroanáloga 4-FBP- d_4 (**12**), 4-FBP- d_4 (**13**) a 4F-NEB- d_4 (**14**) budou v brzké době využity jako interní analytické standardy pokračující farmakokinetické studie syntetických katinonů.



Obrázek 6 Struktury deuterium značených katinonů: mefedron- d_7 (**9**), normefedron- d_7 (**10**), MDPV- d_8 (**11**), 4-FBP- d_4 (**12**), 4-FBP- d_4 (**13**), 4F-NEB- d_4 (**14**).

5.1.2 Syntéza metabolitů mefedronu

Mefedron (**1**) patří mezi nejznámější zástupce syntetických katinonů a také jde o nejjednodušší derivát methkatinonu. Poprvé byl syntetizován už v roce 1929 k terapeutickým účelům.⁵⁸ Na přelomu prvního a druhého desetiletí 21. století se stal velmi oblíbenou drogou taneční subkultury. Účinky mefedronu lze přirovnat k amfetaminu, MDMA a kokainu, případně jejich kombinaci. Relativně krátká doba účinku, v závislosti na způsobu podání (30 minut při intranasálním užití), vede k opakované aplikaci s nežádoucími účinky jako je paranoia, deprese, panická ataka a kardiovaskulární problémy. V rámci spolupráce s Národním ústavem duševního zdraví jsme studovali farmakokinetiku a behaviorální účinky mefedronu v animálním modelu. Pro tyto účely byly využity analytické standardy normefedron a deuteroanáloga mefedron- d_7 (**9**), nor-mefedron- d_7 (**10**) nutná ke kvantifikaci při použití metody vnitřního standardu na přístroji LC-MS. Naměřené sérové hladiny a koncentrace v mozkové tkáni, játrech a plicích byly poté korelovány s behaviorálními experimenty, kterými byly u mefedronu prokázány podobné účinky jako u MDMA. Jednalo se především o zvýšenou lokomoci a hypertermii. Dále byl identifikován hlavní metabolit normefedron, který svojí aktivitou může přispívat k biologickým účinkům mefedronu. (Příloha č. 2)

5.1.3 Syntéza metabolitů methylonu

Methylon (**3**) patří mezi sympatomimetika. Přestože je považován za relativně bezpečnou látku, byly zaznamenány případy předávkování. Tento β -keto analog 3,4-methylen-dioxymethamfetaminu (MDMA; „extáze“) byl poprvé syntetizován v roce 1996 jako antidepresivum a antiparkinsonikum⁵⁹,

přesto nebyl nikdy použit pro terapeutické účely. Naopak se stal populární jako rekreační droga díky „MDMA-cocaine-like effect“.⁶⁰ Uživatelé methylonu popisují svůj subjektivní zážitek jako pocit stimulace, s velkou potřebou se socializovat a s duchovním a empatickým spojením. Methylon se na internetu poprvé objevil v roce 2004 a rychle se stal běžně dostupným.⁶¹ V rámci behaviorální studie v Národním ústavu duševního zdraví jsme syntetizovali hlavní metabolit methylonu normethylon, který byl využit v animálních experimentech v potkaním modelu. Naměřené sérové hladiny a koncentrace v mozkové tkáni byly poté korelovány s behaviorálními experimenty. Tímto způsobem byly u methylonu prokázány podobné účinky jako u MDMA, především zvýšená lokomoce a hypertermie, která může vést až k fatálnímu orgánovému selhání, především v uzavřených prostorách (Příloha č. 3).

5.1.4 Syntéza metabolitů MDPV (3,4-methylenedioxyprovaleronu)

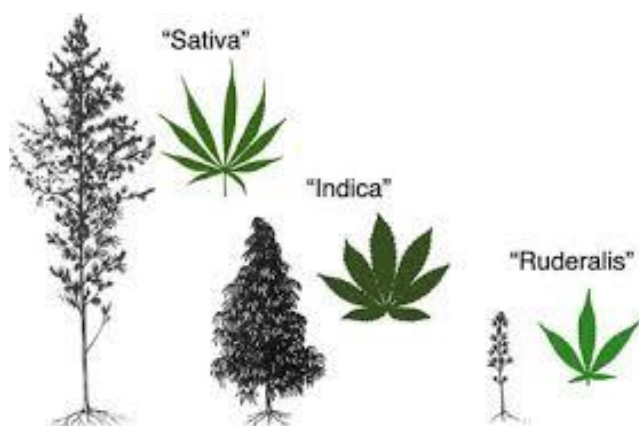
MDPV (2) patří do skupiny syntetických katinonů. Přestože je strukturně podobný MDMA, vykazuje odlišné biologické účinky, které by se daly velmi stručně připodobnit účinkům kokainu.⁶² Ačkoli je tato látka známá již od 60 let 20. století, metabolický a farmakokinetický profil byl v animálním modelu publikován teprve nedávno. MDPV silně ovlivňuje dopaminový transportér, a to dokonce v poměru inhibice DAT/SERT mezi 100 až 300.⁶³ MDPV je spojován s více případy předávkování než ostatní katinony. Akutní intoxikace se projevuje kardiovaskulárními problémy, hypertermií, agitovaností, paranoiou a halucinacemi. V naší laboratoři jsme se věnovali syntéze metabolitů, které byly již v roce 2010 navrženy na základě studia získané lidské moči a metabolismu *in vitro* pomocí jaterních mikrosomů.⁶⁴ Připravená série látek sloužila jako analytické standardy při měření farmakokinetiky a distribuce MDPV v animálním modelu při subkutánní aplikaci různých dávek MDPV.⁶⁵ Farmakokinetický profil ukázal poměrně rychlou distribuci s nejvyšší koncentrací po 30 minutách po podání. Hlavní metabolity v moči sbírané během 24 hodin při podání 4 mg/kg subkutánně jsme identifikovali jako demethylenyl-MDPV a demethylenylmethyl-MDPV (Příloha č. 4).

5.2 Agonisté kanabinoidních receptorů

Obecně se jedná o látky, které se váží na kanabinoidní receptory, což jsou s G-proteinem spřažené transmembránové receptory. Podtyp receptoru CB1 se nachází především v centrální nervové soustavě, podtyp CB2 je exprimován zejména v buňkách imunitního systému. Endokanabinoidní systém je intenzivně studován, protože jako retrográdní systém ovlivňuje značné množství fyziologických procesů. Endogenní kanabinoidy, jejichž nejznámějším zástupcem je anandamid, ovlivňují citění bolesti, náladu, paměť, ale i chuť k jídlu. Ke kanabinoidním receptorům se váže též celá řada exogenních sloučenin, k nejvýznamnějším patří aktivní složky rostliny rodu *Cannabis* z čeledi *Cannabaceae* (**Obr. 7**). V současné době je známo asi 150 fytokanabinoidů, avšak pouze u některých je prostudována biologická aktivita.⁶⁶⁻⁶⁹ Nejznámější fytokanabinoidy Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC) a kanabidiol (CBD) jsou parciálními agonisty obou zmíněných podtypů receptorů. Obě látky jsou součástí registrovaných léčebných přípravků a užití léčebného konopí je schváleno v řadě indikací, například k léčbě bolesti, příjmu potravy či nevolnosti. Kromě terapeutického použití však nelze přehlížet i nežádoucí účinky, které jsou spojeny především s chronickou aktivací CB receptorů.⁷⁰⁻⁷² Aktivace CB1 receptorů v centrálním a periferním nervovém systému vede k inhibici synaptického přenosu (synaptické transmise). Tím se sníží uvolňování glutamátu a γ -aminomáselné kyseliny (GABA), přičemž dochází k inhibici cholinergní a noradrenergí neurotransmise. Inhibice je založena na redukci uvolňování neurotransmiterů z presynaptických váček v axonech, jako důsledek inhibice Ca^{2+} kanálů, přímé inhibice uvolňování váček nebo hyperpolarizace presynaptického axonu.³⁹ Po navázání ligandu dochází k aktivaci CB1 receptorů spřažených s G proteinem a inhibici adenylátcyklázy, což vede ke

snížení koncentrace cAMP v buňce. Samostatné G β/γ podjednotky inhibují Ca^{2+} kanály, a tím inhibují uvolňování kyseliny glutamové z presynaptických axonů. Role CB2 receptorů při synaptické inhibici je zatím nejasná, ale předpokládá se, že je velmi podobná roli CB1 receptorů.⁷³

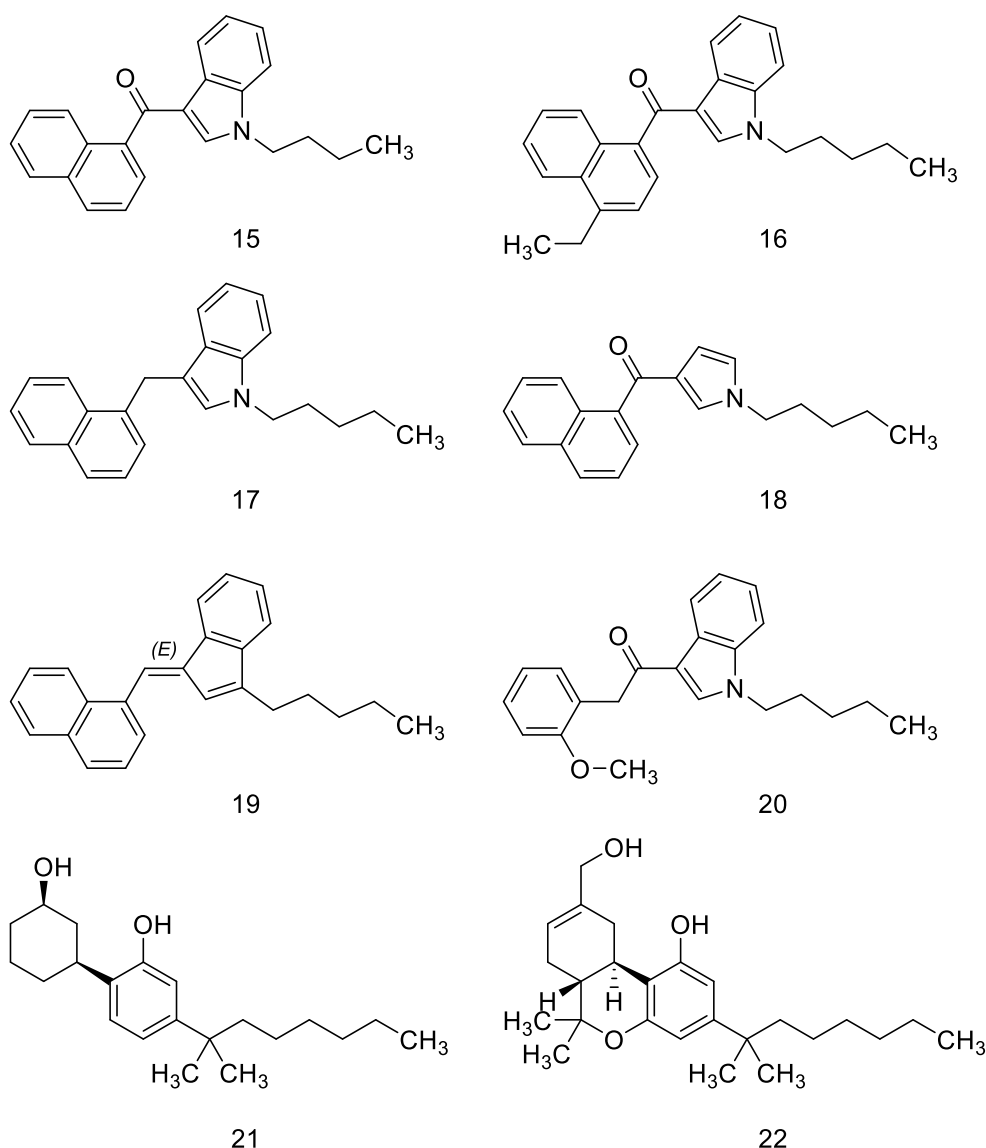
Na rozdíl od THC, který se částečně váže na ortosterické vazebné místo CB1 receptorů, se CBD váže na tzv. alosterické místo. Jedná se tedy o nepřímého antagonistu agonistů CB1/CB2 a inverzního agonistu CB2 receptorů, díky čemuž má opačný účinek než zmiňovaný THC. CBD má nízkou vazebnou afinitu k CB receptorům, ale zároveň je schopný aktivovat několik nekanabinoidních receptorů a iontové kanály. CBD se podílí na zpětném vychytávání (reuptake) a odbourávání endogenních neurotransmiterů, jako je adenosin a anandamid.⁴³ Mimo jiné se CBD váže na serotoninové receptory 5-HT_{1A} , vaniloidní TRPV1 receptory, jaderné receptory PPAR-gama, sirotčí receptor GPR55 a působí i jako alosterický modulátor.⁷⁴ Ve spolupráci s Národní referenční toxikologickou laboratoří a Národním ústavem duševního zdraví jsme se věnovali studiu farmakokinetiky a behaviorálním účinkům CBD a THC v animálním modelu. Překvapivě jsme zjistili, že malá množství CBD mohou v organismu podléhat cykлизaci za vzniku THC, což je nečekané zjištění s celou řadou důsledků i pro forenzní praxi. Pro potvrzení této hypotézy u člověka bude však ještě nutné další studium ideálně se zdravými dobrovolníky v humánní klinické studii (Příloha č. 5).



Obrázek 7 *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* a *Cannabis ruderalis* (převzato McPartland 2018, open access).⁷⁵

5.2.1 Syntetické kanabinoidy

Obliba zneužívání konopí jako rekreační drogy vedla ke snaze nalézt levnou a legální náhradu. V posledních 25 letech byla publikována řada prací, které se věnují syntéze agonistů kanabinoidních receptorů. Přestože se žádná látka nedostala sítím klinických testů k léčebnému využití, rozsáhlé vědecké práce se staly inspirací pro výrobce strukturně rozmanité skupiny NPS - syntetických kanabinoidů, které EMCDDA rozděluje do několika skupin (**Obr. 8**).⁷⁶⁻⁸¹ Tyto látky tak představují nejpočetnější skupiny NPS monitorované systémem včasného varování. Na drogovém trhu jsou známy pod označením "spice", "herbal incense blends" nebo "herbal mixtures". Jedná se o sušenou rostlinnou drť s obsahem syntetických kanabinoidů. Snadná dostupnost těchto přípravků jako levné náhrady konopí vedla k hromadným intoxikacím v Polsku a v USA, v některých případech i s fatálními důsledky. Intoxikace byly popsány jak v odborné literatuře, tak prostřednictvím médií.⁸² Uživatelé syntetických kanabinoidů se potýkají s psychickými problémy a popsány jsou i případy indukované psychózy.⁸²⁻⁸⁷



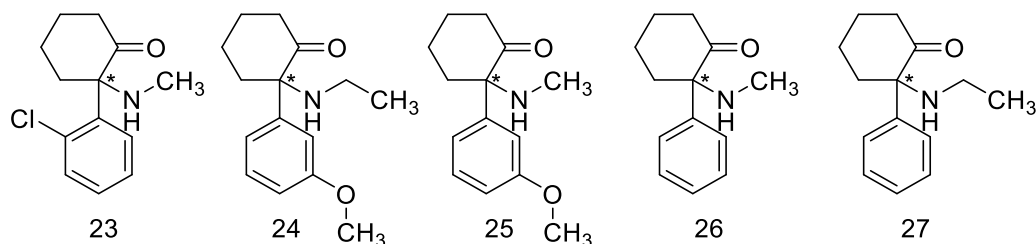
Obrázek 8 Struktury zástupců syntetických kanabinoidů: naftoylindoly: JWH-073 (**15**), JWH 210 (**16**), naftylmethylindoly: JWH-175 (**17**), Naftoylpyroly: JWH-030 (**18**), Naftylmethylindeny: JWH-176 (**19**), Fenylacetylindoly: JWH-250 (**20**), Cyklohexylfenoly CP 47,497 (**21**), Klasické kanabinoidy: HU-210 (**22**).

Pro naši srovnávací studii farmakokinetiky a behaviorálního působení syntetických kanabinoidů a Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC) jsme zvolili JWH-073 (**15**) a JWH-210 (**16**), tedy tzv. první generaci syntetických kanabinoidů.⁸⁸ Jak přírodní, tak zvolené syntetické kanabinoidy mají dvoufázový farmakokinetický profil a shodné jsou nejvyšší plasmatické hladiny v čase jedné hodiny po subkutánním podání. Oproti syntetickým kanabinoidům snižuje THC v testu otevřeného pole tigmotaxi a ovlivňuje prepulsní inhibici zvukového signálu. Tento jev je v souladu s pospanými anxiolytickými účinky nízkých dávek THC. (Příloha č. 6).

5.3 Disociativní anestetika

Poměrně nebezpečnou skupinou nových syntetických drog jsou látky ze skupiny disociativních anestetik se strukturním motivem arylu vázaného na cyklohexylamin, tzv. arylcyklohexylaminy. (**Obr. 9**).

Z jejich struktury je patrné, že se jedná o chirální látky, které se na nelegálním trhu vyskytují jako racemické směsi. Farmakologicky se jedná o antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových receptorů, které jsou jedním z podtypů glutamátových receptorů.⁸⁹ Vazbou na tyto receptory dochází ke snížení excitability neuronů přenášejících bolest. Některá disociativní anestetika jsou také inhibitory zpětného vychytávání dopaminu, noradrenalinu, serotoninu, acetylcholinu a agonisté opioidních receptorů.^{90, 91} V závislosti na množství aplikované látky vykazují arylecyklohexylaminy různé psychotropní účinky. V malých dávkách jsou jejich účinky povzbuzující, stimulační a euforizující, ve velkých naopak sedativní, analgetické, neuroprotektivní, halucinogenní a disociativní.⁹²⁻⁹⁵ Kromě rekreačního užívání se dostalo této skupině látek značné pozornosti v souvislosti s objevem antidepresivního účinku antagonistů NMDA receptorů.



Obrázek 9 Struktury arylecyklohexylaminů: ketamin (23), methoxetamin (24), methoxyketamin (25), deschlorketamin (26), eticyclidon (27).

5.3.1 Ketamin

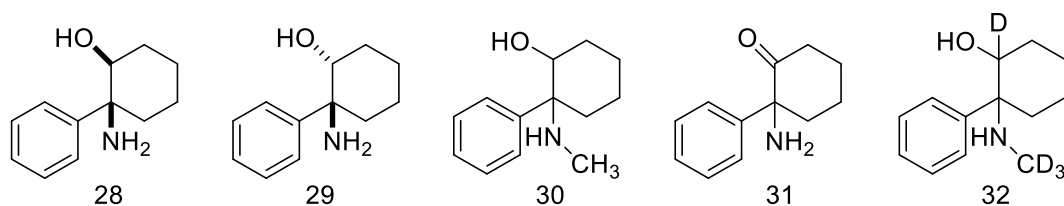
Ketamin (23) patří mezi oblíbená disociativní anestetika a má nezastupitelné místo v humánní a především veterinární medicíně. Přestože chronické užívání ketaminu způsobuje závažné záněty močového měchýře, je předmětem řady psychiatrických studií.⁴⁻⁶ Ukazuje se, že ketamin a potenciálně i jiné látky působící na *N*-methyl-D-D-aspartátové receptory mohou potlačovat deprese u pacientů. Na rozdíl od většiny psychofarmak se však antidepresivní účinek ketaminu dostavuje přibližně už za dvě hodiny po podání a přetrvává i několik týdnů.^{3,7-9} Farmakologický účinek ketaminu je spojen s reverzibilními změnami v buněčné membráně neuronů, které vedou ke snížení excitačních přenosů v synapsích CNS s glutamátem a útlumu mozkové činnosti. Ketamin působí jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, váže se na tzv. PCP-vazebné (fencyklidinové) místo NMDA receptorů, a tím blokuje transmembránový tok Ca^{2+} iontů, který je vyvolán depolarizací membrány neuronu během nervové synapse.⁹⁶ V důsledku těchto změn ketamin blokuje senzorické vstupy do vyšších center CNS, které souvisejí s bolestmi, emocemi, pamětí i procesem učení.⁹⁷ K těmto jevům dochází také díky inhibici receptorů zpětného vychytávání katecholaminů (dopaminu, noradrenalinu a serotoninu).⁹⁸ Ketamin má poměrně rychlou distribuci v organismu a krátký poločas přeměny.⁹⁹ Pomocí jaterních mikrosomálních enzymů obsahujících cytochrom P450 je ketamin metabolizován na další farmakologicky aktivní látky, které prodlužují psychotropní účinek. Nejvýznamnějšími metabolity jsou norketamin, hydroxynorketamin a dehydronorketamin.^{100, 101} V současné době patří ketamin mezi kontrolované látky, nicméně se jedná o látku dobře dostupnou pro medicínální využití.^{102, 103} Klasické projevy abúzu ketaminu jsou halucinační představy, disociativní a paranoidní poruchy osobnosti, snížení pozornosti či změny smyslových vnímání.¹⁰⁴ V roce 2015 bylo potvrzeno celkem 1 200 záchytů ketaminu z 12 zemí světa o celkovém množství 130 kg¹⁰⁵, zatímco v roce 2018 se již jednalo o 2 000 záchytů o celkovém množství 194 kg.²⁸

5.3.2 MXE (*methoxetamin*)

Methoxetamin (**24**) je nová psychoaktivní látka syntetizovaná v roce 2010 s původním záměrem potenciálního antidepresiva.^{106, 107} Strukturně se velmi podobá ketaminu, u kterého je modifikován substituent arylového kruhu.⁹¹ MXE byl uveden na drogový trh jako náhražka za ketamin, u kterého byl zjištěn zvýšený výskyt urogenitálních problémů, spojených se záněty močového měchýře a močových cest při chronickém užívání.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Současné studie na myším modelu však prokazují též renální toxické chování MXE s podobnými účinky na urogenitální trakt jako má právě ketamin.¹¹¹ Oproti ketaminu má však MXE prokazatelně vyšší farmakologický účinek při nižších dávkách.⁹¹ S tím však souvisí i vyšší akumulace léčiva v mozkomíšni tkáni a zvýšená míra negativních toxických účinků na organismus včetně smrtelných intoxikací.^{112, 113} MXE působí jako antagonist NMDA receptorů a potlačuje zpětné vychytávání dopaminu i serotoninu v nervových synapsích CNS.¹¹⁴⁻¹¹⁶ V případových studiích jsou při užívání MXE popsány stavy hlubokého bezvědomí, úzkosti, dezorientace, halucinace, paranoie a psychomotorického neklidu.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Studium methoxetaminu jsme se věnovali podrobně. Pro účely farmakokinetických studií a metabolismu jsme připravili sérii metabolitů včetně jejich deuteriem značených forem (Příloha č. 7). Připravené analytické standardy jsme využili k vývoji velmi efektivní metody analýzy methoxetaminu a jeho metabolitů ve složité matici metodou vysolení analytu a odstranění matrice (SALLE). Tuto levnou a rychlou metodu v různých variantách využíváme na pracovišti stále (Příloha č. 8). Poté jsme studovali farmakokinetiku u potkanů kmene *Wistar* a potvrdili navržené a syntetizované metabolity v potkaní moči. Dále jsme potvrdili anxiolytický efekt methoxetaminu při nízkých dávkách a také delší dobu účinku v porovnání s ketaminem (Příloha č. 9).

5.3.3 DXE (*deschlorketamin*)

Deschlorketamin (**26**) je nový syntetický analog ketaminu, který postrádá atom chloru na benzenovém jádře.⁹¹ První zmínka o DXE pochází z roku 2012 z internetových diskuzních serverů zabývajících se problematikou užívání drog.⁹¹ V roce 2015 se pak policii a místním úřadům ve Španělsku podařilo poprvé zachytit velké množství neznámé látky, jež byla poté identifikována pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) jako DXE.¹²⁰ Podle předběžných zpráv uživatelů je DXE asi 1,5krát účinnější než methoxetamin a 5krát účinnější než ketamin. Aktuálně nejsou k dispozici žádné informace o rozdílu v účinku různých stereoizomerů této látky. Jediné dostupné informace pocházejí zatím přímo od uživatelů drog, kteří rádi experimentují s novými psychoaktivními látkami a kteří sdílejí své poznatky v internetových diskuzích. Oproti studii s methoxetaminem jsme se rozhodli rozšířit část věnovanou *in vitro* experimentům, které předcházely animálnímu modelu. K tomu účelu jsme využili i možnost chirální separace jednotlivých enantiomerů (podrobněji kapitola 6).¹²¹ Izolované enantiomery jsme podrobili sérii vibračně spektroskopických měření podpořených teoretickými výpočty. Také nás zajímala cytotoxicita jednotlivých enantiomerů, kde (*S*)-enantiomer vykazuje vyšší cytotoxicitu. Zaujalo nás, že oba enantiomery nepoškozují v experimentálních koncentracích mitochondrie a endoplasmatické retikulum, což indikuje nižší poškození močového traktu a otevírá tak možnost dalšího medicínálního výzkumu (Příloha č. 10). V další studii jsme se zaměřili na farmakokinetiku a metabolismus deschlorketaminu u potkanů, kterým byl subkutánně podán deschlorketamin.^{122, 123} V moči potkanů jsme identifikovali metabolity prvního a druhého řádu, v séru a mozku změřili koncentrace deschlorketaminu a hlavních metabolitů. Struktura metabolitů byla potvrzena na základě syntetizovaných analytických standardů (**Obr. 10**). Získaná data jsme porovnali s metabolismem methoxetaminu a ketaminu. Ukázalo se, že pro průkaz intoxikace deschlorketaminem je třeba vzít v úvahu i další metabolity kromě *nor*-deschlorketaminu, který je společným metabolitem řady disociativních anestetik (Příloha č. 11).



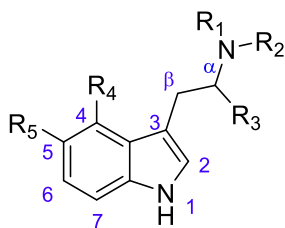
Obrázek 10 Struktury metabolitů DXE: *cis*-dihydronordeschloroketamin (**28**), *trans*-dihydronordeschloroketamin (**29**), dihydrodeschloroketamin (**30**), nordeschloroketamin (**31**), dihydrodeschloroketamin-*d*₄ (**32**).

5.4 Deriváty tryptaminu

Psychoaktivní deriváty tryptaminu (**33**) zahrnují jak přírodní, tak syntetické látky. Přírodní tryptaminy jsou biosyntetizovány z aminokyseliny tryptofanu. Důležitými jsou zejména neurotransmitter serotonin (**34**) a hormon melatonin (**35**), který řídí v lidském mozku cirkadiánní rytmy. Dalšími dobře známými přírodními tryptaminy jsou psilocin (**36**) a psilocybin (**37**), aktivní látky psychedelických hub lysohlávek rodu *Psilocybe*. K významným přírodním halucinogenům patří také dimethyltryptamin (DMT) (**38**), který je spojený především s rituálním nápojem ayahuasca.

Za posledních několik desetiletí bylo připraveno mnoho syntetických tryptaminů, které si postupně našly oblibu mezi uživateli a k jejichž popularizaci ve značné míře přispěl Alexandr Shulgin.¹²⁴ Syntetické deriváty jsou odvozeny od základního skeletu tryptaminu modifikacemi na aminoskupině, v α-poloze postranního řetězce a na indolovém jádře. Modifikace v polohách 6 a 7 indolového jádra vedou ke snížení halucinogenního potenciálu, proto nejvíce modifikací bylo provedeno v polohách 4 a 5.¹²⁵ Výčet vybraných zástupců tryptaminů je znázorněn v tabulce (**Tab. 1**).

Tabulka 1 Struktura a derivatizace vybraných přírodních a syntetických tryptaminů.

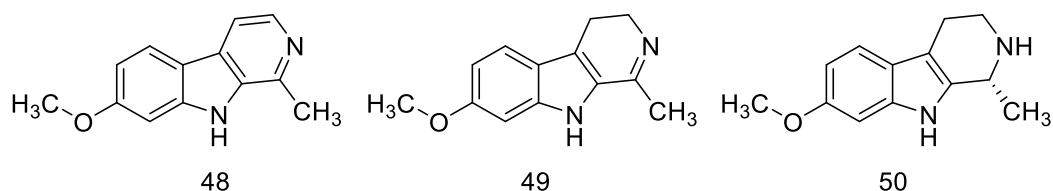


Název	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Tryptamin (33)	H	H	H	H	H
Serotonin (34)	H	H	H	H	OH
Melatonin (35)	H	COCH ₃	H	H	OCH ₃
Psilocin (36)	CH ₃	CH ₃	H	OH	H
Psilocybin (37)	CH ₃	CH ₃	H	OPO ₃ H ₂	H
DMT (38)	CH ₃	CH ₃	H	H	H
Bufotenin (39)	CH ₃	CH ₃	H	H	OH
5-MeO-DMT (40)	CH ₃	CH ₃	H	H	OCH ₃
DiPT (41)	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	H	H	H
5-MeO-DiPT (42)	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	H	H	OCH ₃
AMT (43)	H	H	CH ₃	H	H
5-MeO-AMT (44)	H	H	CH ₃	H	OCH ₃
5-MeO-DALT (45)	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂	H	H	OCH ₃
4-HO-DET (46)	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	OH	H
4-AcO-DET (47)	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	OC(O)CH ₃	H

V lidském organismu vystupují tryptaminy jako agonisté široké škály receptorů, zejména serotoninových.^{126, 127} Oproti halucinogenním fenethylaminům mají nižší selektivitu a afinitu vůči 5-HT_{2A} receptoru. Halucinace vyvolané tryptaminy jsou kromě interakce s 5-HT_{2A} receptorem částečně ovlivněny i vazbou na 5-HT_{1A} typ receptorů.¹²⁸ Působení tryptaminů bývá ale komplexnější a řada látek vystupuje také jako substrát pro serotoninový transportní protein (SERT, 5-HTT), vezikulární monoamin transportér 2 (VMAT2) a další receptory.^{129,126} Tryptaminy substituované v α -poloze mají kromě halucinogenních účinků i entaktogenní a stimulační účinky. Příkladem je α -methyltryptamin (AMT) (43), kde přítomnost α -methylové skupiny způsobuje jistou podobnost s amfetaminem.¹³⁰ Na základě Nicholsovy klasifikace jsou mezi tryptaminy řazeny i ergoliny, tetracycklé látky obsahující tryptaminový skelet.¹³¹ Do této skupiny patří například ergotamin, amid kyseliny lysergové (LSA, ergin) a diethylamid kyseliny lysergové (LSD, LSD-25). LSD je proslulý halucinogen s bohatou historií, jehož psychotropní účinky objevil ve čtyřicátých letech Albert Hoffman¹³² a dodnes zůstává látkou s nejsilnějšími halucinogenními účinky.¹²⁸ Jeho tradiční syntéza vychází z ergotaminu, který se nachází přirozeně v náušnici paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*). Jako prekurzor slouží i ergin, přirozeně obsažený v rostlině *Argyreia nervosa* (havajská lesní růže, lysergová růže). Navzdory vysoké podobnosti s LSD, ergin nevykazuje halucinogenní účinky, ale chová se spíše jako skopolamin.¹³³ LSD i všechny jeho prekurzory jsou obsaženy v seznamu zakázaných psychotropních látek.

Dimethyltryptamin (38) je tradičním halucinogenem rozšířeným v jihoamerických domorodých kulturách, kde je užíván zejména ve formě rituálního nápoje ayahuasca. Nápoj je připravován z několika druhů psychotropních rostlin vyskytujících se v Amazonii, zejména *Psychotria viridis* a *Diplopterys cabrerana*.¹³³ DMT se při perorálním užití metabolicky inaktivuje působením monoaminoxidázy¹²⁵,

proto je důležitou složkou nápoje liána *Banisteriopsis caapi*, která obsahuje β -karbolinové alkaloidy harmin (48), harmalin (49) a (*R*)-tetrahydroharmin (50), (Obr. 11).^{134, 135} Tyto látky patří mezi velmi silné inhibitory MAO. Podle výsledků analýzy McKenny například peruánská ayahuasca v průměrné dávce 100 ml obsahovala celkově 728 mg alkaloidů, z toho 467 mg harminu, 160 mg tetrahydroharminu, 41 mg harmalinu a 60 mg DMT.¹³⁶ V průběhu posledních desetiletí se užívání ayahuascy rozšířilo i do USA a Evropy jako „legal high“ produkt.¹³⁷ Kromě již zmíněných rostlin je DMT běžně rozšířený v rostlinách čeledi *Leguminosae*, zejména rodu *Mimosa*.¹³⁶



Obrázek 11 Struktury harminu (48), harmalinu (49) a (*R*)-tetrahydroharminu (50).

DMT (38) v čisté formě lze užít kouřením či intravenózně. Pokud je aplikován perorálně, je vždy nutné užít jej společně s inhibitory MAO, aby dávka byla účinná (obdobně jako v ayahuasce). Obvyklá dávka při kouření je 60 - 100 mg, nástup účinku je prakticky okamžitý a netrvá déle než hodinu.¹²⁵ Užitím inhibitorů MAO je možné dobu účinku prodloužit. DMT vyvolává intenzivní vizuální halucinace a některé sympatomimetické symptomy. V nízkých dávkách se projevují více stimulační účinky, ale jinak halucinogenní účinky převládají.¹³⁸ Primárním metabolitem je *1H*-indol-3-ylactová kyselina a žádný nemetabolizovaný DMT není obsažen v moči uživatelů.¹³⁹ DMT, ale i jiná psychedelika jsou studována pro svoji schopnost aktivovat nárůst produkce mozkového neurotrofního faktoru (BDNF), který posílením genové exprese umožňuje neuronům tvořit nová synaptická spojení, čemuž se říká mozková neuroplasticita. Ta je naprosto zásadní pro proces učení, regeneraci mozkové tkáně a uchování informací v dlouhodobé paměti.¹⁴⁰

Psilocin (36) a psilocybin (37) se v přírodě vyskytují jako účinné látky různých druhů hub, například lysohlávek (*Psilocybe*), které rostou i na území České republiky.¹⁴¹ Neřadí se do kategorie nových syntetických drog, ale na základě jejich vlastností lze odhadovat vlastnosti strukturně podobných syntetických derivátů. Aktivní látkou po aplikaci psilocybinu je však psilocin vzniklý jeho defosforylací.¹²⁵ Tato přeměna je v čerstvých plodnicích relativně rychlá. Psilocin se následně na vzduchu oxiduje na chinony, které jsou odpovědné za modré zbarvení plodnice na řezu.¹⁴² Typické dávky psilocinu se pohybují mezi 6 - 20 mg a nástup účinku se projeví zpravidla do půl hodiny a trvá 4 - 8 hodin.¹²⁴ Psilocin je užíván perorálně, nejčastěji jako odvar z lysohlávek. Působí jako částečný agonista 5-HT_{2A} a dalších serotonergních receptorů, v malé míře i receptorů dopaminergních a noradrenergických. Vyvolává převážně vizuální halucinace, které doprovázejí sympatomimetické symptomy jako hypertenze a tachykardie.¹⁴³ Psilocin je primárně metabolizován glukuronidací v játrech a částečně vylučován i beze změny.¹⁴⁴

Účinky pravidelného podávání malých dávek psilocybinu jsou aktuálně studovány pod označením „microdosing“. Dávky jsou stanoveny zhruba na 1/10 až 1/20 průměrné psychedelické dávky. U psilocybinu se tak jedná o 1-2 mg v jedné mikrodávce. Princip microdosingu představil na základě mnohaletých zkušeností psychiatr James Fadiman.¹⁴⁵ Nicméně je třeba podotknout, že se nejednalo o klasickou klinickou studii, ale spíše anekdotický sběr informací od individuálních uživatelů.¹⁴⁶ Problematice microdosingu se věnujeme ve spolupráci s Univerzitou v Leidenu a podařilo

se nám dokončit klíčovou fází klinické studie na skupině zdravých dobrovolníků, která vedla k první publikované dvojité zaslepené placebem kontrolované studii (Příloha č. 12).

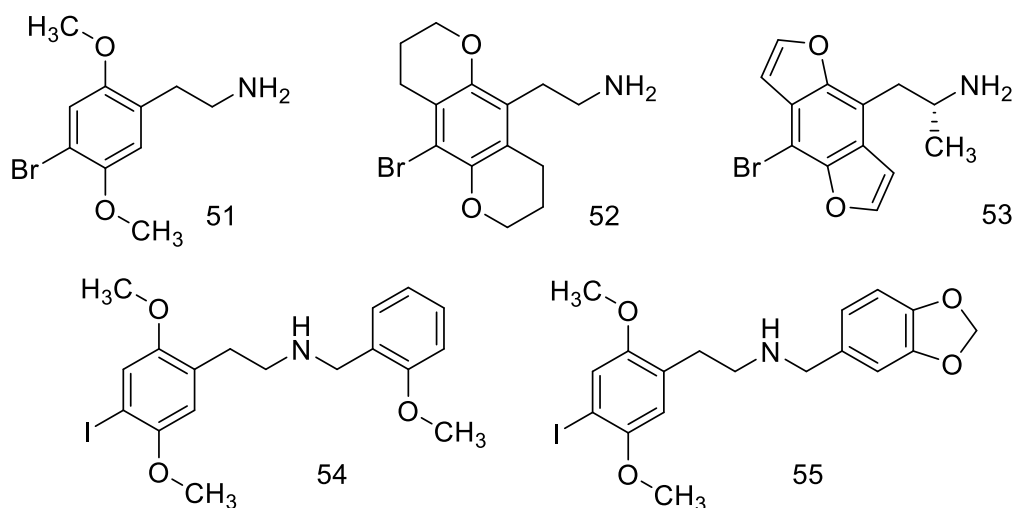
5.4.1 Syntetické tryptaminy

Vlastnosti syntetických tryptaminů jsou závislé na jejich strukturních modifikacích a dají se shrnout do několika základních skupin. Jednoduché syntetické tryptaminy, odvozené od DMT pouze variací alkylových substituentů na aminokyselině, působí na organismus podobně jako DMT, pouze s tím rozdílem, že nejsou po užití rozkládány MAO a jsou účinné i perorálně.¹²⁵ Deriváty substituované v α -poloze jsou díky této substituci účinnými inhibitory MAO a zároveň mají kromě halucinogenních i výraznější stimulační účinky.¹³⁰ Od psilocinu odvozené syntetické tryptaminy derivatizované v poloze 4 (např. 4-HO-DET (46), 4-AcO-DET (47)) mají na základě zkušeností uživatelů podobné účinky jako psilocin.¹⁴⁷ O těchto látkách je ale dostupných jen velmi málo klinických informací.¹²⁵ Deriváty modifikované v poloze 5, nejčastěji methoxyskupinou, vykazují podobné účinky jako látky nesubstituované, jsou však výrazně účinnější.¹⁴⁸ Tyto látky inhibují zpětné vychytávání monoaminových neurotransmiterů, ale jen omezeně ovlivňují jejich uvolňování.¹²⁶ Všechny látky se metabolizují jaterním cytochromem P450 nejprve demethylací methoxyskupiny, hydroxylací v poloze 6 nebo *N*-dealkylací a následnou glukuronidací.¹⁴⁴

Mezi nejčastěji se vyskytující syntetické tryptaminy patří 5-methoxydimethyltryptamin (5-MeO-DMT) (40). Tato látka se nachází i v přírodě, například v jedu ropuchy kolorádské (*Bufo alvarius*) nebo v některých rostlinách Jižní Ameriky, které tamní indiáni používají tradičně k přípravě halucinogenních šňupacích tabáků.¹⁴⁷ 5-MeO-DMT je velmi potentní halucinogen s krátkou dobou účinku (15 - 30 minut). Silného účinku je docíleno kouřením, účinná dávka se pohybuje mezi 1 - 20 mg. Pro perorální užití je nutné, stejně jako v případě DMT, kombinovat tuto látku s inhibitory MAO.¹⁴⁷ Z hlediska mechanismu působení je 5-MeO-DMT agonistou serotonergních 5-HT_{2A/C} a 5-HT_{1A} receptorů.¹⁴⁹ Působení výměšků žaby *Bufo alvarius* při inhalaci u zdravých dobrovolníků bylo předmětem společné práce s výzkumnou skupinou na Universitě v Maastrichtu. Pro účely zevrubné analýzy jsme syntetizovali skupinu tryptaminů, které také byly v žabích výměšcích nalezeny. Podle očekávání byl dominantním tryptaminem 5-MeO-DMT (Příloha č. 13). Dalším relativně často se vyskytujícím syntetickým tryptaminem je 5-methoxydiisopropyltryptamin (5-MeO-DiPT) (42). Jde o velmi potentní psychedelickou látku užívanou nejčastěji perorálně, ale lze ji užít i kouřením či intranasálně. Doba účinku trvá od 4 do 8 hodin. Ve velmi nízkých dávkách (<10 mg) vyvolává zvýšené vnímání sluchových vjemů a má afrodiziakální účinky. V dávkách nad 10 mg způsobuje silné zrakové halucinace a údajně lze tento psychedelický zážitek připodobnit účinkům LSD. Předpokládá se, že dávky nad 25 mg by mohly způsobit předávkování a nebezpečí je umocněno v kombinaci s inhibitory MAO.¹⁴⁷ 5-MeO-DiPT je zřejmě velmi účinný agonista serotonergních receptorů typu 5-HT_{2A}.¹⁴⁷ Strukturně velmi podobný je diisopropyltryptamin (DiPT) (41), který nemá tak velký psychedelický potenciál jako 5-MeO-DiPT, ale je zajímavý tím, že způsobuje výhradně sluchové halucinace.¹²⁴ K častěji se vyskytujícím látkám se řadí i α -methyltryptamin (AMT) (43) a 5-methoxy- α -methyltryptamin (5-MeO-AMT) (44). Kromě toho, že se jedná o potentní halucinogeny, vykazují tyto látky i výrazné stimulační účinky. Tato kombinace je důsledkem silné inhibice zpětného vychytávání monoaminových neurotransmiterů a schopností uvolňovat dopamin, noradrenalin i serotonin.¹²⁶

5.5 Deriváty fenylethylaminu

Fenylethylamin se vyskytuje nejen v lidském organismu, ale i v řadě přírodních produktů a potravinách. Tento biogenní amin vzniká metabolickou přeměnou z fenylalaninu a následně podléhá dalším metabolickým přeměnám působením enzymu MAO a dopamin- β -hydroxylázy.⁵⁶ Fenylethylamin sám o sobě nevykazuje psychoaktivní účinky. Syntetickým derivátům fenylethylaminu se v práci PIHKAL podrobně věnoval Alexander Shulgin.¹⁵⁰ Připravil širokou skupinu látek, do které spadá přinejmenším 200 derivátů s modifikací samotného aromatického jádra, substituentů na aromatickém jádře a postranního řetězce.¹⁵¹ Nejrozšířenějšími látkami z této skupiny jsou extáze (MDMA) a její analoga 3,4-methylendioxyamfetamin (MDA) a 3,4-methylendioxyethylamfetamin (MDEA), dále pak stimulanty amfetamin a metamfetamin. Zvláštní skupinou fenylethylaminů jsou halucinogenní stimulanty, které v sobě kombinují jak psychedelické účinky, tak účinky způsobující zvýšení empatie a euforie.^{152, 153} Strukturně je lze rozdělit do dvou hlavních skupin. Látky řady 2C (**Obr. 12**) se skládají z fenethylaminového základního skeletu, dvou methoxyskupin v polohách 2 a 5 a hydrofobního substituentu v poloze 4. Druhá skupina označovaná jako rodina DOx se liší pouze přítomností methylové skupiny na α -uhlíku. Obě skupiny se vážou na serotoninové receptory, přičemž za halucinogenní účinky je odpovědná vazba na subtyp 5-HT_{2A}.¹⁵⁴ Po intoxikaci byly popsány patologické neuropsychiatrické projevy, kardiovaskulární obtíže a rozvoj serotoninového syndromu.^{155, 156} V některých případech došlo i k fatálnímu předávkování.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Nejznámějším a také nejvíce zneužívaným halucinogenním fenethylaminem je 2,5-dimethoxy-4-bromfenethylamin (2C-B). Poprvé byl syntetizován v polovině 70. let Alexanderem Shulginem pro účely psychiatrického výzkumu.¹⁶⁰ Látka byla dokonce v 80. a 90. letech legálně prodávána jako lék na impotenci a frigiditu.¹⁶¹ Populární je pravděpodobně kvůli relativně krátké době účinku a mírným vedlejším účinkům intoxikace. Přestože dosud nebyla zaznamenána fatální intoxikace, může představovat závažné zdravotní riziko pro citlivé jedince, o čemž svědčí případy indukované psychózy, cerebrální vaskulopatie a opakovaných generalizovaných tonicko-klonických záchvatů.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Vysoká prevalence užívání 2C-B tak vede k potřebě snadné forenzní identifikace této látky v biologické matici.



Obrázek 12 Struktury fenethylaminů skupiny 2C: 2C-B (**51**), 2C-B-Butterfly (**52**), Bromo-dragonFLY (**53**), 25I-NBOMe (**54**) a 25I-NB34MD (**55**).

6 Chirální separace enantiomerů a vibrační spektroskopie nových psychoaktivních látek

6.1 Chirální separace enantiomerů NPS

Poměrně velká část NPS se na trhu vyskytuje v podobě racemických směsí, část je dokonce prodávána v podobě enantiomerně čistých látek. Z farmaceutické praxe je známo, že jednotlivé enantiomery mají různý biologický účinek, který je dán jejich rozdílnou interakcí s chirálním prostředím aktivních center receptorů nebo enzymů. Pro forenzní praxi je také zajímavý poměr jednotlivých enantiomerů nebo informace, zda se mezi uživateli NPS vyskytuje konkrétní enantiomer. V dalším studiu biologických účinků NPS jsme se rozhodli rozdělit vybrané racemické látky na jednotlivé enantiomery.

Klasickou cestou separace enantiomerů je krystalizace výchozího racemátu, který je nutné nejprve vhodně derivatizovat chirálním činidlem. Následně se separují vzniklé diastereomery. Při tomto způsobu separace je možné vázat pomocné chirální činidlo k cílovému enantiomeru kovalentně, nebo ve formě soli. Běžně se pro krystalizaci bází používá směs strukturně příbuzných kyselin a naopak směs aminů pro kyseliny.¹⁶⁵ Podmínky krystalizace byly v minulosti předmětem řady prací a optimalizací procesu (teplota, rozpouštědla).¹⁶⁶ Přestože krystalizace poskytuje velmi dobré výsledky pro izolaci látek a umožňuje separovat velké množství enantiomeru najednou, jedná se často o zdoluhavý proces při hledání vhodných podmínek krystalizace a derivatizace původních enantiomerů. Na našem pracovišti se chirální separaci věnujeme v posledních letech ve spolupráci s docentem Kohoutem, který vyvíjí vhodné chirální selektory pro stacionární fáze v kapalinové chromatografii. Synteticky připravenou skupinu derivátů kathinonu se nám podařilo chirálně rozdělit v preparativním měřítku (Příloha č. 14).^{167, 168} Podobného úspěchu jsme dosáhli i s výzkumnou skupinou docenta Řezanky, kde se podařilo chirálně rozdělit jednotlivé enantiomery kathinonů pomocí elektroforézy s cyklodextrinovou stacionární fází (Příloha č. 15).¹⁶⁹⁻¹⁷²

Detailní znalost trojrozměrné struktury látek může do budoucna umožnit nejen podrobné studium vazebných vlastností, metabolismu, transportu či distribuce těchto látek v organismu, ale také vývoj antagonistických léčiv pro případy předávkování, závislosti či otravy. Detailněji jsme se zaměřili na butylon, který je relativně oblíbeným syntetickým kathinonem. Po optimalizaci preparativní chirální separace jsme jednotlivé čisté enantiomery identifikovali pomocí chiroptických metod a vibrační spektroskopie, které jsou zavedeny na partnerském pracovišti docenta Setničky. Změřená spektra byla porovnána s *in silico* kalkulací ve velmi dobré shodě, což může přispět k predikci spekter pro nové látky ze skupiny syntetických kathinonů. (Příloha č. 16). V podobném duchu jsme postupovali i v případě methylonu a pentylonu (Příloha č. 17).

6.2 XPRD spektroskopie

Rychlé metody identifikace jsou zpravidla založeny na některé z vibračně spektroskopických metod. V laboratorní i terénní praxi se často využívá Ramanova nebo infračervená spektroskopie.^{173, 174} Přestože se jedná o metody v praxi osvědčené, stále se u nich setkáváme s řadou komplikací, které se u Ramanovy spektroskopie projevují například fluorescencí. U vzorků měřených infračervenou spektroskopií je problematická vlhkost a vždy se jedná o problém, pokud reálný vzorek NPS obsahuje anorganické příměsi. Na našem pracovišti jsme se zaměřili na dostupnou alternativní metodu rychlé identifikace psychoaktivních látek a pro forenzní praxi jsme využili neprávem opomíjenou metodu rentgenové práškové difrakce (XPRD).¹⁷⁵ Z pilotní studie se ukazuje velmi výhodné využití XPRD u vzorků, které obsahují různé ředící látky (například sádra), nebo jsou obsaženy ve směsích (Příloha č. 18).

7 Imunochemické metody detekce

Imunochemické metody jsou založeny na vzniku komplexu mezi antigenem a protilátkou. Protilátky jsou globulární glykoproteiny vytvářené imunitním systémem v důsledku kontaktu s cizorodou látkou. Pro imunogenicitu je rozhodující její molekulová hmotnost, neboť malé molekuly nejsou schopny vyvolat imunitní odpověď. Pro účely přípravy kompletních imunogenů tyto malé molekuly označujeme jako hapteny. Jejich navázáním na proteinový nosič je možné vytvořit imunogen a následně připravit protilátky specificky rozpoznávající antigenní determinanty (epitopy) na jeho povrchu. Antigenicitou haptenu je potom nazývána jejich schopnost specificky se vázat ke strukturám protilátek označovaným jako paratopy nebo vazebná místa pro antigen.^{176, 177} Příprava specifických polyklonálních protilátek zacílených na strukturu sledovaných analytů je založena na navázání haptenových molekul na makromolekulární nosič a následné imunizaci takto připraveným konjugátem. Jako nosič nejčastěji slouží některý z následujících proteinů – hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA), ovalbumin, hovězí thyreoglobulin (bovine thyroglobulin, BTG) či hemocyanin z mořského plže *Megathura crenulata* (keyhole limpet hemocyanin, KLH). Při přípravě konjugátů se k vytvoření vazby využívají volné reaktivní skupiny v postranních řetězcích aminokyselinových zbytků proteinu, nejčastěji primární aminoskupiny lysinových zbytků.¹⁷⁶ V molekule haptenu se raménko sloužící k navázání na protein (tzv. linker) umísťuje co nejdále od epitopově významné části molekulární struktury tak, aby nedocházelo k jejich prostorovému stínění proteinem.¹⁷⁸

Při imunizaci je antigen injekčně (obvykle subkutánně) vpraven do organismu laboratorního zvířete, což vyvolá odpověď jeho imunitního systému doprovázenou tvorbou specifických protilátek proti tomuto antigenu. První aplikace antigenu spustí tzv. primární odpověď, jejímž výsledkem je pouze nízká koncentrace protilátek v séru. Teprve po opakovaném styku se stejným antigenem nastává sekundární odpověď imunitního systému s tvorbou většího množství protilátek, čehož se využívá při imunizaci pokusných zvířat. Při imunizaci laboratorních zvířat vznikají polyklonální protilátky, které jsou schopny rozpoznávat různé epitopy imunogenu. Samotné protilátky se ze séra obvykle neizolují, ale využívá se kompletní krevní sérum imunizovaného zvířete (antisérum) či izolovaná imunoglobulinová frakce.¹⁷⁹

Neprecipitační imunochemické metody využívají protilátky ke stanovení nízkých koncentrací látek v komplexních biologických matricích. Metody jsou založeny na primární vazebné interakci protilátky s antigenem, přičemž informace o vazbě je zprostředkována pomocí vhodné značky. Ke značení některého z imunoreaktantů se využívají enzymy, fluorescenční látky či radionuklidy.^{177, 179}

7.1.1 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA)

Metoda ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay) je jednou z nejvíce využívaných imunochemických metod. Metodu ELISA lze využít v několika různých uspořádáních. Imunoreakce využívá heterogenní uspořádání na pevné fázi, což vyžaduje separaci značeného imunoreaktantu vázaného v imunokomplexu od volného imunoreaktantu v roztoku. Byla vyvinuta jak kompetitivní varianta, při níž značené molekuly imunoreaktantu soutěží o omezený počet vazebných míst druhého z imunoreaktantů (protilátky) s molekulami neznačenými, tak nekompetitivní varianta, při které je využíván přebytek imunoreaktantu bez soutěže o vazebná místa. Nekompetitivní ELISA však vyžaduje, aby měl antigen alespoň dva epitopy, což u nízkomolekulárních haptenu není splněno. Pro stanovení haptenu se tak využívá výhradně kompetitivní varianta s imobilizovaným antigenem, a to buď v přímém uspořádání, nebo častěji jako nepřímá kompetitivní ELISA, kdy se pro kompetici použije specifická protilátka neznačená markerem a teprve při následné kvantifikaci imunokomplexů imobilizovaných

na pevné fázi se uplatňuje enzymem značená protilátka. Po přidání vhodného substrátu enzymové reakce vzniká rozpustný barevný produkt a intenzita zbarvení je následně kolorimetricky či spektrofotometricky vyhodnocena.¹⁸⁰

Ve většině případů nelze imunoanalýzu založenou na klasických omamných a psychotropních látkách využít pro látky ze skupiny NPS, neboť specifita protilátek je úzce zaměřená na strukturu klasických drog.¹⁸¹ Vyvinuto však bylo několik imunochemických testů k detekci syntetických kanabinoidů a kathinonů v biologické matrici, které byly uvedeny do praxe například společností Neogen a Randox.^{182, 183} Nejčastěji je pro testování využívána moč, ve které se však původní analyty nemusejí nacházet vůbec nebo jen v nízkých koncentracích. Při evaluaci imunochemických testů je pak důležitá citlivost k jednotlivým metabolitům. Například při biotransformaci syntetických kanabinoidů dochází nejprve k monohydroxylaci alkylového řetězce, indolu, naftylu, fenylu či adamantylu.¹⁸⁴ U fluorovaných derivátů probíhá enzymová dehalogenace.¹⁸⁵ Vznikají také deriváty nesoucí karboxylovou skupinu na posledním uhlíku alkylového řetězce.¹⁸⁶ Biotransformace fenylethylaminů, tryptaminů a některých kathinonů je primárně reprezentována aktivitou enzymů monoaminoxidázy (MAO) a katechol-O-methyltransferázou (COMT), dochází k *N*-dealkylacím a *O*-dealkylacím. Nespecifické hydroxylace aromatického jádra či postranních řetězců pak vedou k široké paletě možných metabolitů. Metabolity druhého řádu jsou potom reprezentovány glukuronidy, sulfáty či konjugáty s jinými karboxylovými kyselinami.¹⁸⁷ Nevýhoda moči jako matrice tedy spočívá v nutnosti nejprve identifikovat metabolity sledovaných nových psychoaktivních látek, než je možné validovat metodu pro jejich detekci. Výhodou je naopak neinvazivní odběr vzorků, vyšší koncentrace a dostatečně dlouhé detekční okno metabolitů v moči.¹⁷⁸ V případě syntetických kanabinoidů byly dosud popsány metody ELISA cílené jak na hydroxylované metabolity syntetických kanabinoidů 5-hydroxypentyl-JWH-018¹⁸⁸ a 4-hydroxypentyl-JWH-250,¹⁸⁹ tak na metabolity nesoucí karboxylovou funkční skupinu na alkylovém řetězci JWH-018-pentanovou kyselinu,¹⁸⁸ UR-144-pentanovou kyselinu^{190, 191} a AB-PINACA-pentanovou kyselinu.¹⁹² Na JWH-018-pentanovou kyselinu¹⁹³ a UR-144-pentanovou kyselinu¹⁹⁴ cílí také homogenní enzymové imunometody (homogeneous enzyme immunoassay, HEIA). V případě tryptaminů bylo zatím však popsáno jen velmi málo příkladů úspěšné imunoanalýzy. Publikováno bylo sestavení ELISA s využitím bufoteninu jako haptenu a stanovení DMT a 5-MeO-DMT ve směsi. Uvedená metoda však nebyla schopná jednotlivé tryptaminy od sebe oddělit.¹⁹⁵ V substrátu plodnic hub se podařilo pomocí ELISA metody stanovit psilocin pomocí monoklonálních protilátek.¹⁹⁶ Imunoanalýza látek ze skupiny fenylethylaminů se opírá o zavedené metody stanovení amfetaminu, metamfetaminu a MDMA. Pro většinu ostatních látek z této skupiny však není k dispozici vhodně validovaná imunoanalytická metoda. Pro skupinu NPS z rodiny 2C a DOx nejsou až na výjimky známy vhodné imunometody, což komplikuje detekci těchto látek v prescreeningových testech.¹⁹⁷

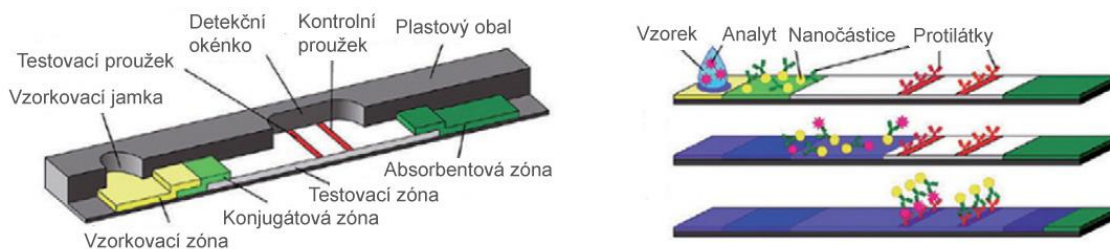
Pro stanovení akutní intoxikace se však ve forenzní toxikologické praxi využívají jiné matrice. Pro terénní detekci akutní intoxikace se osvědčil odběr sliny. Výhodou je rychlost odběru, nejedná se o invazivní odběr a lze jej tedy uskutečnit za pomoci nelékařského personálu. Koncentrace analytů ve slinách jsou odrazem volné sérové koncentrace, nicméně je třeba vzít v úvahu kinetiku přestupu mezi plasmou a slinami, která závisí na pK_a a lipofilitě analytu. Problém při vyhodnocení výsledku může být případná kontaminace a složitost matrice, která může vést k falešně negativním výsledkům. U toxikologicky významných analytů, které se do těla dostávají cestou orální, nasální nebo kouřením, může dojít ke kontaminaci slin samotnou látkou. V případě kvantitativního stanovení analytu pak jde o významné zkreslení výsledku. Díky kratšímu detekčnímu oknu látek v této matrici je navíc možno odlišit akutní intoxikaci od chronického abúzu, kde se s úspěchem využívá stanovení látek ve vlasech. Podobně jako v krevní plasmě nebo séru cílí analýza ve slinách na přítomnost parenterální látky, případně na aktivní metabolit (například psilocin uvolněný z psilocybinu nebo morfin z diacetylmorfinu). Toto je zásadní u látek, které podléhají z velké části nebo kompletně jaternímu

metabolismu. Především lipofilní látky, např. přírodní nebo syntetické kanabinoidy, se v moči nacházejí výlučně v podobě metabolitů.¹⁹⁸ Dosud byl popsán vývoj ELISA metody, která umožňuje detekci první generace syntetických kanabinoidů ve slinách. Jako imunogen byla při vývoji metody využita látka JWH-018 konjugovaná s hovězím thyreoglobulinem (BTG).^{199, 200}

7.1.2 Enzymová imunoanalýza ve formátu LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay)

Imunochemické terénní testovací soupravy jsou v principu založené na formátu LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay). Jejich podstatou je vztlínání směsi kapalného vzorku a imunoreaktantu skrz proužek polymerního materiálu a její specifické interakce s imobilizovaným imunoreaktantem na proužku. Prvním dostupným LFIA testem byl těhotenský test, založený na detekci lidského choriogonadotropinu (hCG), který byl uveden na trh v osmdesátých letech dvacátého století.²⁰¹ V dnešní době jsou komerčně dostupné LFIA testy pro detekci celé řady psychoaktivních látek, různých alergenů, toxinů či patogenů, jakož i pro další diagnostické účely, například potvrzení selhání vnitřních orgánů (infarkt, diabetes, selhání ledvin). K největším výhodám LFIA testů patří jednoduchost, rychlost, nízká cena a možnost okamžitého použití mimo laboratorní podmínky.^{202,203}

LFIA test je obecně rozdělen na 4 zóny: vzorkovací, konjugátovou, testovací a absorbentovou (**Obr. 13**). Vzorkovací zóna slouží k nanesení vzorku a je tvořena z celulosy nebo zesíťovaného silikagelu. Konjugátová zóna je v blízkém kontaktu se vzorkovací i testovací zónou a obsahuje vysušený značený analyt nebo protilátky. Bývá vyrobena ze zesíťovaného silikagelu. Testovací zóna sestává z membrány tvořené nejčastěji nitrocelulosou. Protože membrána je křehká, je přichycena na plastový nosič a obecně je celý test uzavřen v robustním plastovém pouzdru, kde jsou přístupné pouze detekční okénko a vzorkovací část. Testovací zóna obsahuje minimálně dva proužky, testovací a kontrolní. Na testovacím jsou imobilizované protilátky či příslušné konjugáty a slouží k vyhodnocení přítomnosti analytu. U multikomponentních testů může být testovacích proužků více v závislosti na počtu stanovovaných analytů ve vzorku. Kontrolní proužek slouží k potvrzení správného vztlínání kapaliny a věrohodnosti výsledku. Obsahuje zpravidla protilátky vůči značeným částicím a vždy by měl poskytnout pozitivní odezvu.²⁰³



Obrázek 13 Schematické znázornění LFIA testu a uspořádání v případě sendvičového typu.²⁰²

Existují dvě základní uspořádání LFIA, kompetitivní a sendvičové. Kompetitivní uspořádání se používá v případě analytů ze skupiny haptenu, což jsou nízkomolekulární látky mající pouze jedno vazebné místo pro navázání protilátek (tzv. epitop). Analyt ze vzorku konkuruje značenému analytu ve vazbě na protilátky obsažené v testovacím proužku. Druhým možným uspořádáním je nanesení konjugátu proteinu a analytu na testovací proužek a aplikace značených protilátek v konjugátové zóně. Pokud vzorek obsahuje cílový analyt, naváže se na značené protilátky a ty pak nemohou interagovat s konjugátem v testovacím proužku. V obou případech kompetitivního uspořádání je velikost signálu testovacího proužku nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Sendvičové uspořádání lze použít pro analyty s více než jedním epitopem. V tomto případě jsou v testovacím proužku zakotveny protilátky specifické vůči jednomu epitopu analytu a v konjugátové zóně jsou naneseny značené

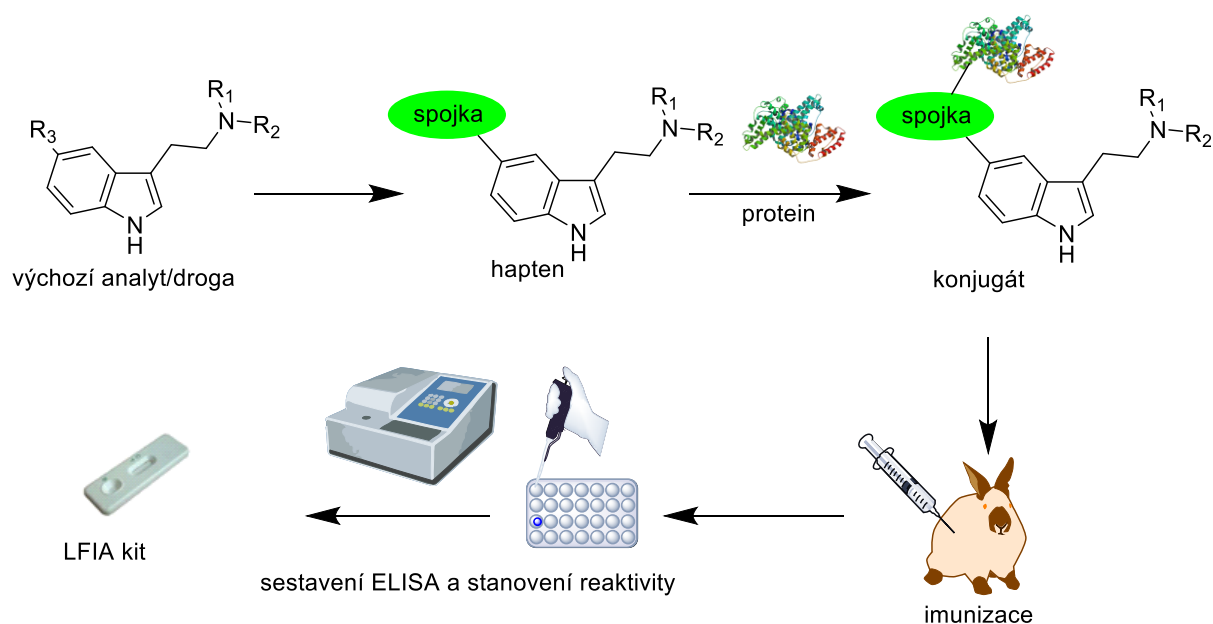
protilátky specifické vůči jinému epitopu. Pokud je ve vzorku obsažen cílový analyt, váže se na značené protilátky a následně na protilátky v testovacím proužku (**Obr. 13**). V tomto uspořádání je velikost signálu přímo úměrná koncentraci analytu.²⁰²

Značení protilátek či analytů je prováděno barevnými či fluorescentními nanočásticemi, nejčastěji se využívá koloidní zlato nebo latex, méně pak selen, uhlík nebo liposomy. Latexové nanočástice jsou barvené pro optickou detekci. V případě liposomů se používají fluorescenční či bioluminiscenční barviva, umožňující i kvantitativní analýzu.²⁰³ Nejnovější technologie zahrnují například i značení pomocí kvantových teček.²⁰⁴ Detekční metody v LFIA jsou hlavně kolorimetrické a dávají kvalitativní či semikvantitativní informaci. V dnešní době existují ale i možnosti detekce fluorescencí či elektrochemicky a tyto mohou poskytnout kvantitativní informace o obsahu cílového analytu.²⁰² Nejnižší detekční limit v případě optické detekce pro LFIA se sendvičovým uspořádáním se pohybuje okolo 1 pg/ml,²⁰⁵ při použití elektrochemické detekce okolo 10 pg/ml.²⁰²

Využitelnost imunochemických testů pro rutinní screening nových psychoaktivních látek je podmíněna jejich rozsáhlou křížovou reaktivitou, tedy schopností rozpoznávat nikoliv jen jeden konkrétní analyt, ale celou skupinu látek daného strukturního typu. Problémem však zůstává špatná adaptovatelnost imunometod na nové látky objevující se na trhu. Pro další generaci nových psychoaktivních látek je zpravidla nutné vyvinout protilátky nové, které by umožňovaly analyty specificky rozpoznat. Tento proces je však zdlouhavý a způsobuje značnou časovou prodlevu mezi vstupem látky na trh a validací metody pro její spolehlivou detekci.^{194, 206, 207} Vysoká potence některých fenethylaminů (například DOB) nebo syntetických kanabinoidů vede k velmi nízkým užívaným dávkám a úměrně tomu klesá i koncentrace těchto látek v biologických vzorcích, což klade vysoké nároky na meze detekce použité metody.²⁰⁸ Dosud používané terénní testy tak nemohou konkurovat instrumentální analýze zaměřené na necílový screening. Pěkný příklad poskytuje nedávná studie z Francie, kde analyzovali rozsáhlý set slinných vzorků získaných na tanečním festivalu.²⁰⁹

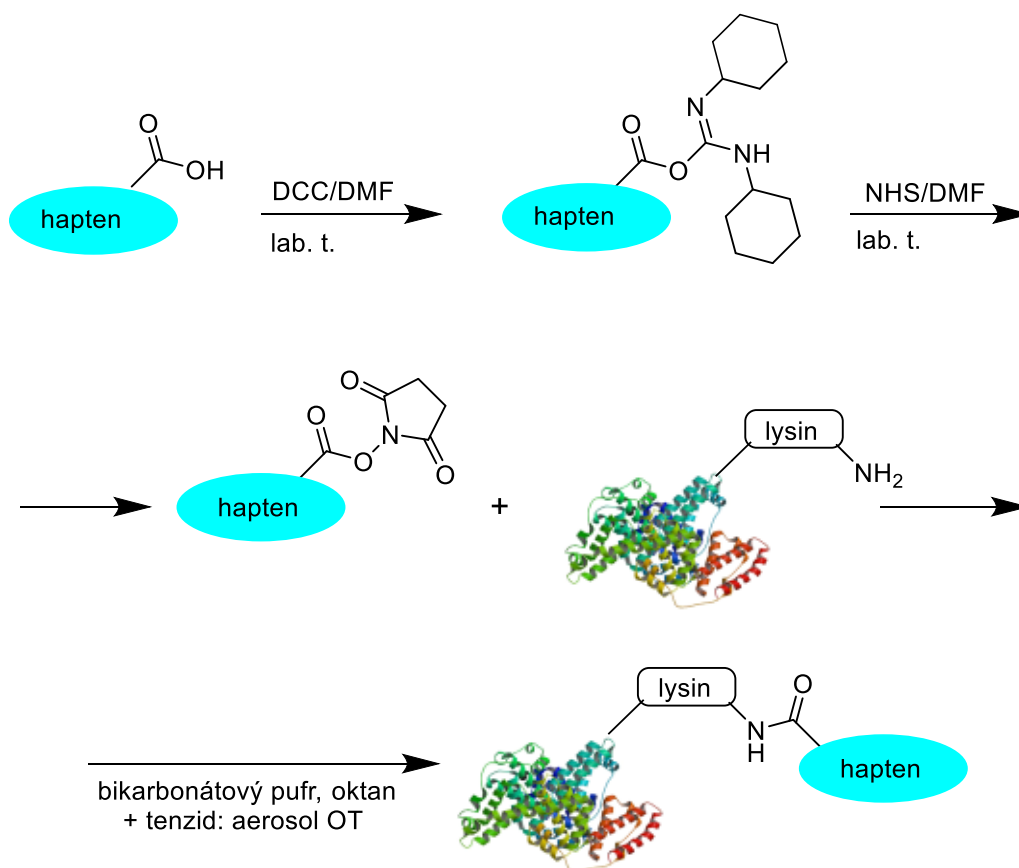
8 Vlastní příspěvek k imunochemické detekci NPS

Z předchozí kapitoly vyplývá, že k sestavení ELISA metody a její validaci pro konkrétní nové psychoaktivní látky je nejprve nutné získat vhodné protilátky. Modelové struktury zájmových skupin NPS (kanabinoidy, tryptaminy a fenethylamin) byly vytipovány na základě informací z Evropské databáze nových drog (European Database on New Drugs, EDND), která je dostupná registrovaným forenzním expertům a spolupracovníkům EMCDDA. V rámci projektu studia nových psychoaktivních látek byly dále vyhodnoceny záchyty v období let 2012 až 2015. Pro konkrétní vytipované modelové látky ze skupiny NPS jsme navrhli syntetické postupy pro přípravu vhodných haptenu (podrobněji kapitoly 8.2-8.4). K získání protilátek je nutné haptenu navázat na vhodný makromolekulární nosič, v našem případě jsme použili hovězí sérový albumin (BSA). Konjugáty jsme připravili reakcí aktivované formy haptenu (reaktivní anhydridy či estery) s ϵ -aminoskupinami lysinových zbytků proteinu za vytvoření amidových vazeb (**Obr. 14**). Konjugací se pak dosáhne statisticky náhodného obsazení lysylů přítomných v proteinu. Jednou z možností přípravy haptenu je modifikovat strukturu drogy krátkou spojkou zakončenou karboxylovou funkcí, kterou se pak haptenu váže na koncovou aminoskupinu lysinu amidovou vazbou. Tímto konjugátem lze imunizovat laboratorní zvířata a z nich získat příslušné polyklonální protilátky. Po jejich otestování na citlivost vůči příslušným analytům a křížovou reaktivitu mohou být finálně sestaveny testy ve formátu LFIA. Z široké plejády nových psychoaktivních látek jsme se rozhodli zvolit modelové látky k návrhu haptenu ze tří skupin, a to syntetických kanabinoidů, tryptaminů a fenylethylaminů.



Obrázek 14 Vývoj imunochemických testovacích kitů na formátu LFIA (ilustrativní obrázek k cílovým analytům ze skupiny tryptaminů).

Hapteny byly konjugovány též s králičím sérovým albuminem (RSA) pro přípravu imobilizačních konjugátů využitelných při sestavování imunometod. Jelikož při přípravě polyklonálních protilátek vznikají protilátky nejen proti samotnému haptenu, ale i proti epitopům bílkovinného nosiče, je využití rozdílných proteinů pro imunizaci a k přípravě imobilizačních konjugátů jednoduchým způsobem, jak omezit nespecifické interakce.¹⁷⁶ Vlastní konjugační reakce s proteinem pak probíhala v reverzním micelárním prostředí anionaktivního tenzidu (**Obr. 15**).²¹⁰ Počet molekul haptenu navázaných na protein byl určen na základě MALDI-TOF/TOF spekter porovnáním molekulových hmotností samotného nosiče, konjugátu a příslušného haptenu.²¹¹



Obrázek 15 Konjugace haptenu s proteinovým nosičem.

8.1 Charakterizace protilátek a vývoj imunochemických testů

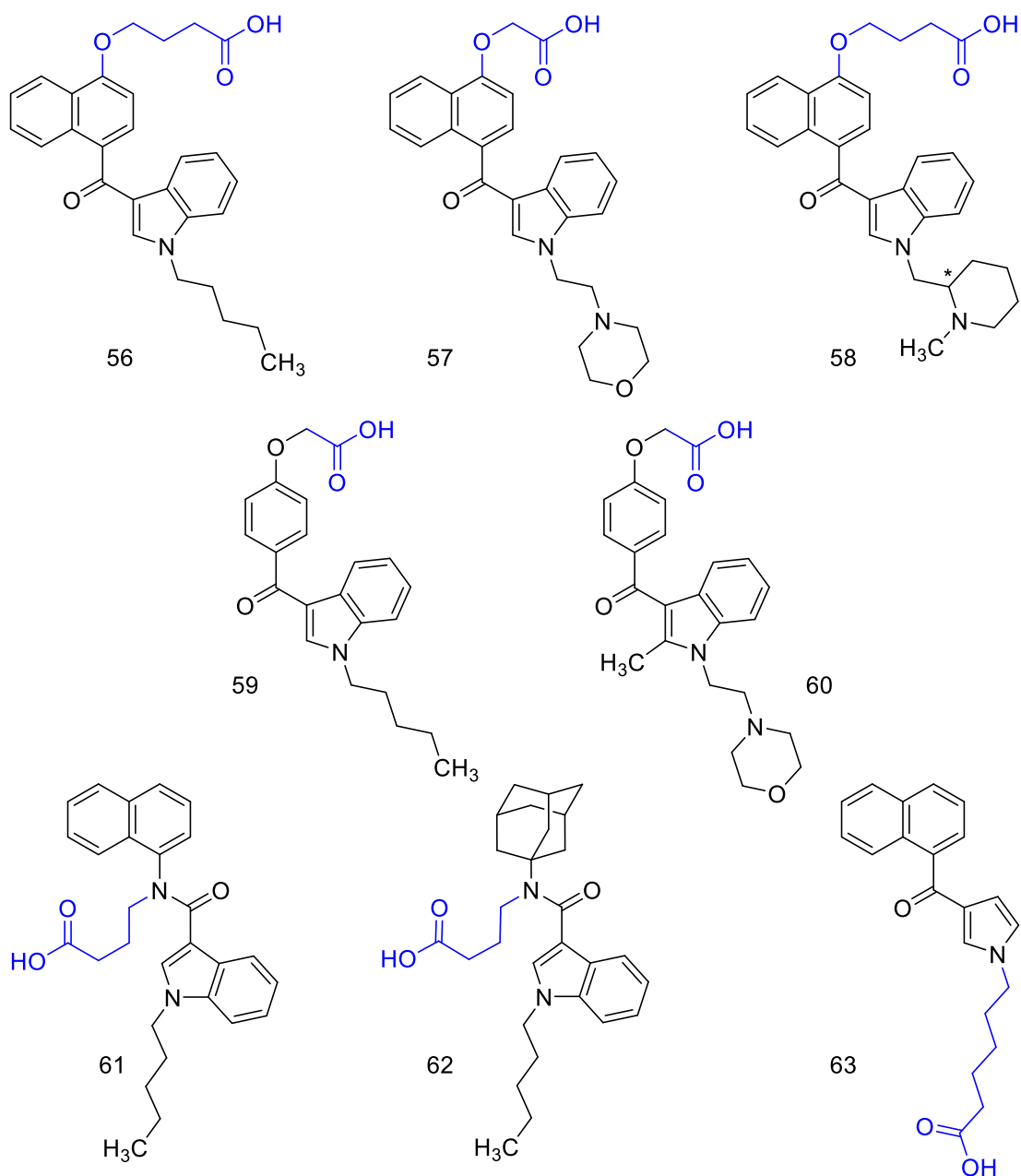
Imunizace králíků imunoreaktivními konjugáty odvozenými od syntetických kanabinoidů, tryptaminů a fenylethylaminů byla provedena dle standardizovaného protokolu na akreditovaném pracovišti MediTox s.r.o., Konárovice. Získaná polyklonální antiséra byla testována metodou enzymové imunoanalýzy ve spolupráci s Laboratorii bioafinitních technik VŠCHT Praha. Pro jednotlivé systémy byla ověřena funkčnost imunoreagencií a byly vybrány vhodné kombinace koncentrací protilátek a imobilizačního konjugátu. Se zvolenými koncentracemi imunoreagencií byly poté sestaveny kalibrační křivky pro cílový analyt. S protilátkami vykazujícími nejvyšší citlivost ke zvolenému analytu byly optimalizovány a charakterizovány varianty ELISA v nepřímém kompetitivním uspořádání. U systémů byly následně určeny významné analytické parametry metody, jako jsou detekční limit (LOD), oblast linearity a tzv. 50% intercept (IC_{50}), který představuje koncentraci analytu potřebnou k vyvážení 50 % protilátek přítomných v reakčním roztoku. Výsledky z analýzy modelových a reálných vzorků byly porovnány s nezávislou metodou LC-MS.

8.2 Syntéza haptenu odvozených od syntetických kanabinoidů

Ze skupiny syntetických kanabinoidů byly v rámci systému včasného varování EMCDDA hlášeny záchyty zejména 3-naftoylindoly různě substituované na indolovém dusíku. Později se ve zvýšené míře

začaly objevovat 3-benzoylindoly a 3-naftoylpyrroly. V roce 2015 pak na ilegálním trhu dominovaly 1-alkylindol-3-karboxamidy. Právě z těchto nejrozšířenějších strukturních podtypů syntetických kanabinoidů jsme zvolili modelové struktury, z nichž vycházel návrh jednotlivých haptenu (Obr. 16). Ze struktur je patrné, že spojka (linker) tvoří součást struktury haptenu, nicméně je zvolena tak, aby její funkční skupiny co nejméně interferovaly v procesu imunizace a nacházely se v molekule haptenu co nejdále od epitopově významných skupin atomů a byly snadno dostupné pro složky imunitního systému.^{176, 178} Připravené 3-naftoylindolové hapteny byly odvozeny od nových psychoaktivních látek s označením JWH-018 (56), JWH-200 (57) a AM-1220 (58), RCS-4 (59) a WIN 48,098 (60). Linker tvořený dvouuhlíkatým či čtyřuhlíkatým řetězcem s karboxylovou funkční skupinou byl ve všech případech umístěn v poloze 4 příslušného aromatického jádra, neboť u celé řady syntetických kanabinoidů se vyskytuje substituent právě v této pozici.

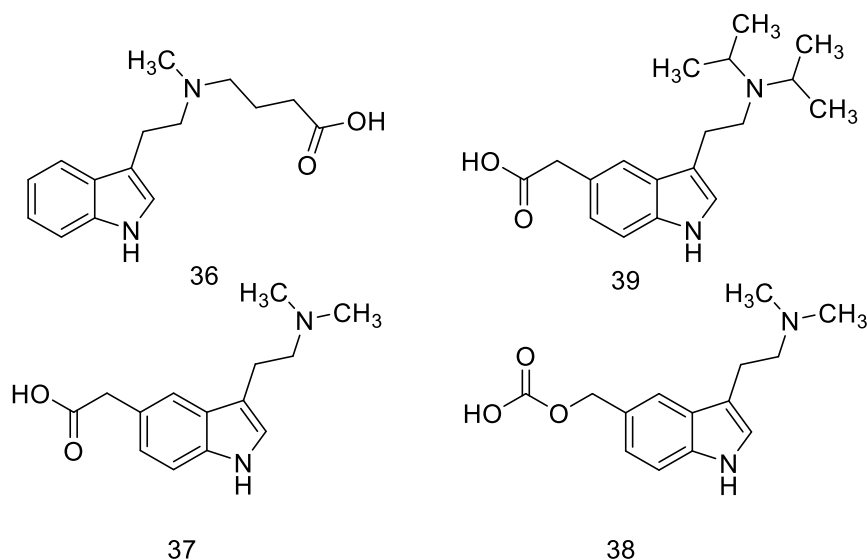
Jako modelová kanabimimetika ze skupiny 1-alkylindol-3-karboxamidů byly zvoleny látky s označením NNEI (61) a APICA (62). Aby zůstaly přístupné všechny významné strukturní prvky zmíněných syntetických kanabinoidů a zároveň byla derivatizace molekul synteticky nenáročná, byl v případě obou navržených haptenu čtyřuhlíkatý linker připojen k dusíku amidové skupiny příslušného 1-pentylindol-3-karboxamidu. Alternativní přístup připojení linkeru v místě alifatického řetězce byl zvolen u modelového kanabinoidu JWH-030 (63). Protilátky vzešlé z této modifikace však nebyly příliš úspěšné. Příprava série haptenu a jejich využití je předmětem dvou udělených českých patentů (Příloha č. 19 a č. 20). Navržené syntézy haptenu, příprava imunogenů a charakterizace protilátek byly úspěšně obhájeny v řadě studentských prací.²¹²⁻²¹⁸ Vhodné protilátky vzešly především z linie imunizací odvozených od haptenu odvozeného od JWH-200, kdy připravená ELISA byla úspěšně otestována na 14 syntetických kanabinoidech a řadě fyto-kanabinoidů (Příloha č. 21). Protilátky jsme následně využili k sestavení funkčních kitů LFIA, které byly certifikovány jako funkční vzorek a licencovány společností Dynex Laboratories (Příloha č. 22). LFIA kity jsou chráněny užitným vzorem (Příloha č. 23).



Obrázek 12 Struktura navržených haptenu s modře vyznačeným linkerem; černě zobrazené struktury odpovídají modelovým syntetickým kanabinoidům JWH-018 (**56**), JWH-200 (**57**), AM-1220 (**58**), RCS-4 (**59**), WIN 48,098 (**60**), NNEI (**61**), APICA (**62**) a JWH-030 (**63**).

8.3 Syntéza haptenuů odvozených od syntetických tryptaminů

Strukturní motiv tryptaminů je odvozen čistě z indolového heterocyklu a variabilita je tak dána především substitucí na aminoskupině nebo poloze 5 indolového heterocyklu. K syntéze haptenuů bylo nutné zavést krátkou spojku zakončenou karboxylovou funkcí na takové místo v molekule, aby tato modifikace neměnila aktivní farmakofor a vzniklými protilátkami bylo možné vázat psychoaktivní substance. Protože tryptaminy jsou nejčastěji substituované na aminoskupině a v poloze 5, byly syntetizovány dvě skupiny haptenuů lišící se polohou spojky (**Obr. 13**). První skupina obsahuje spojku vázanou na aminoskupinu tryptaminu **36**, u těchto haptenuů jsme očekávali vyšší pravděpodobnost vzniku skupinových protilátek pro tryptaminy s různou derivatizací na aminoskupině. Druhá skupina obsahuje spojku v poloze 5 indolového skeletu a to vázanou přímo, či přes kyslík **37**, **38**, **39**. Od této skupiny jsme očekávali možný vznik protilátek selektivních na konkrétní tryptaminové deriváty lišící se substitucí na aminoskupině.



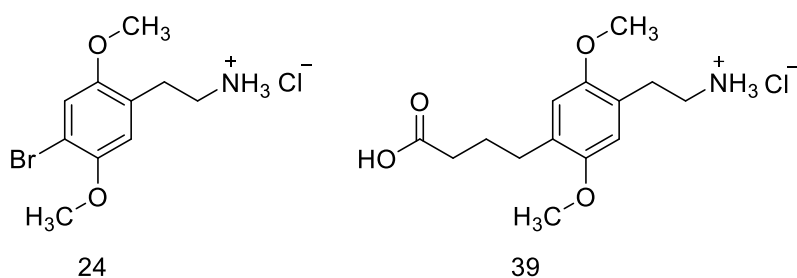
Obrázek 13 Struktury haptenuů odvozené od tryptaminu.

Příprava série haptenuů a jejich využití je předmětem uděleného českého patentu (Příloha č. 24) a obhájené diplomové práce.²¹⁹ Protilátky, které vzešly z připravených haptenuů, jsme následně využili k sestavení funkčních kitů LFIA, které byly certifikovány jako funkční vzory k detekci DMT, 5-MeO-DMT a DiPT v moči a slinách. Výroba je licencována společností Dynex Laboratories (Příloha č. 22) a LFIA kity chráněny užitným vzorem (Příloha č. 25).

8.4 Syntéza derivátů syntetických fenethylaminů

Skupina látek odvozených od 2,5-dimethoxyfenethylaminu byla intenzivně studována Alexandrem Shulginem a stala se základem pro skupinu psychedelických budivých aminů.¹⁵⁰ Kromě zajímavého medicínálního potenciálu, který je zaměřen na jejich serotonergní a adrenergní efekt, se také jedná o skupinu široce zneužívanou.²²⁰

Syntéza vhodného haptenu k získání potřebného imunogenu vychází strukturně přímo z modelové struktury 2C-B, ve které je atom bromu nahrazen spojkou, která je vhodná k vazbě na sérový hovězí albumin (**Obr. 13**). Přestože se jedná o poměrně jednoduchou strukturu, výstavba haptenu z dostupného prekursoru si vyžádala osmistupňovou syntézu, která je předmětem obhájené bakalářské práce.²²¹



Obrázek 13 Struktura 2C-B hydrochloridu (**24**) a odvozeného haptenu **39**.

V následujících krocích jsme získali protilátky, které posloužily k sestavení imunochemické metody nepřímé kompetitivní ELISA. Po optimalizaci a změření křížových reaktivit dostupných fenethylaminů bylo přikročeno k sestavení uživatelsky příjemných LFIA testů, které byly certifikovány jako funkční vzorky k detekci 2C-B v moči a slinách, výroba je licencována společností Dynex (Příloha č. 21). Připravená metoda byla pak úspěšně otestována na vzorcích moči, které byly uměle obohaceny o látku 2C-B a na tabletě extáze, která obsahovala místo MDMA látku 2C-B. Získané hodnoty byly ve výborné shodě ověřeny nezávislou metodou pomocí HPLC-MS²²² (Příloha č. 26).

9 Výhledy dalšího studia v oblasti nových psychoaktivních látek

Ačkoli by se mohlo zdát, že zájem o problematiku NPS začíná postupně ochabovat, je vhodné se na ně dívat nejen jako na zdroj potenciální intoxikace, ale také jako na nositele řady farmakoforů. Za některé objevy molekulární biologie na poli serotonergního systému vděčíme právě studiu agonistů serotoninových receptorů z kategorie NPS.²²³

Na poli neuropsychofarmakologického výzkumu jsme aktuálně ve spolupráci s Národním ústavem duševního zdraví započali pěstování organoidů. Tyto modely diferencované mozkové tkáně, tzv. „minibrains“, mohou posunout výzkum z pozice animálních modelů na rovinu *in vitro* experimentů s podobnou, ne-li vyšší vypovídající hodnotou.²²⁴ Dále se nyní intenzivně věnujeme přírodním psychedelikům, jak z říše rostlin, tak říše hub, kde jsme navázali spolupráci s předním českým mykologem doktorem Borovičkou. V nejbližších letech bychom rádi zmapovali složení alkaloidů v dostupných vzorcích hub rodů *Conocybe* (sametovka), *Galerina* (čepičatka), *Gymnopilus* (šupinovka), *Inocybe* (vláknice), *Panaeolus* a *Panaeolina* (kropenatce), *Pholiotina* (sametovka), *Pluteus* (štítkovka) a zejména *Psilocybe* (lysohlávka). Slibně se rozvíjí spolupráce s nizozemskými pracovišti (univerzitami v Leidenu, Maastrichtu a Amsterdamu), kde očekáváme pokračování klinických studií s tryptaminu, a to především v oblasti microdosingu psychedelik v klinických dvojité zaslepených, placebem kontrolovaných studiích.²²⁵ V již zavedené spolupráci s Národním ústavem duševního zdraví nás čeká expedice, jejímž cílem je zhodnotit vliv tradičního prostředí během ceremonie s ayahuasca u skupiny zdravých dobrovolníků, kde budeme hodnotit individuální neuropsychologické parametry a neurobiologie akutních i přetrvávajících změn prostřednictvím přenosného EEG. Naším příspěvkem bude důkladné studium ceremoniální směsi ayahusca po stránce složení jednotlivých alkaloidů a zavedení jednoduché metody stanovení hladin tryptaminů ve vzorcích kapilární krve. Předmětem našeho etnobotanického výzkumu jsou i další psychoaktivní rostliny, které mají význam jak pro forenzní praxi, tak pro neuropsychofarmakologický výzkum. Příkladem mohou být rostliny rodu *Cannabis*, kde se zaměřujeme na izolaci, purifikaci a syntézu derivátů přírodních fytokanabinoidů. První společná práce s Vincenzem Micale z University of Catania a Masarykovou Univerzitou byla zaměřena na studium schizofrenie v potkaním modelu při perinatální expozici THC.²²⁶ Společně se pak nově podílíme na studiu přírodních kanabinoidů v aktuálně započaté spolupráci s univerzitou v Římě, která již ukazuje první výsledky experimentů s CBD v animálním modelu kognitivně deficitních potkanů (kmen potkanů Fmr1 KO).

Forenzní část aktivit našeho pracoviště se bude nadále věnovat znalecké činnosti pro státní instituce a vývoji metod stanovení psychoaktivních látek a jejich metabolitů v biologických matricích. V tomto duchu se také zaměřujeme na pokrokovější přístup v metabolických studiích, kde budeme postupně nahrazovat experimenty v potkaním modelu za *in vitro* studie s využitím lidských jaterních mikrosomů nebo pomocí metabolizace xenobiotik houbou *Cunninghamella elegans*.²²⁷

10 Seznam zkratk

AcO	acetoxy
AMT	α -methyltryptamin
α -PVP	α -pyrrolidinopentiofenon
AC	adenylátcykláza
BDNF	mozkový neurotrofní faktor
BSA	hovězí sérový albumin
BTG	hovězí thyreoglobulin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
2C-B	2,5-Dimethoxy-4-bromfenethylamin
CB1	kanabinoidní receptor 1
CB2	kanabinoidní receptor 2
CBD	kanabidiol
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CP	skupina syntetických kanabinoidů připravená společností Pfizer
DAG	oslí protilátka proti kozím proteinům
DALT	<i>N,N</i> -diallyltryptamin
DAT	dopaminový transportér
DCC	<i>N,N</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DET	<i>N,N</i> -diethyltryptamin
DIPT	<i>N,N</i> -diisopropyltryptamin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DOB	2,5-dimethoxy-4-bromoamfetamin
DOP	dopamin
DXE	deschlorketamin (2-fenyl)-2-(methylamino)cyklohexan-1-on)
EDND	Evropská databáze nových drog
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi
EMCDDA	Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost

EU	Evropská unie
EWS	system včasného varování
Fmr1 KO	potkaní linie s vyřazeným Fmr1 genem, který kóduje protein odpovědný za normální kognitivní vývoj mozku
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GAR	kozí protilátka proti králičím proteinům
GPCR	receptor spřažený s G proteinem
GPR55	s G proteinem spřažený receptor 55
hCG	lidský choriový gonadotropin
HEIA	homogenní enzymová imunoesej
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
HU	skupina syntetických kanabinoidů připravená na Hebrejské Univerzitě
IC50	50% intercept
IMAO	inhibitor monoaminoxidázy
JHA	Rada pro spravedlnost a vnitřní věci
JWH	skupina syntetických kanabinoidů pojmenovaná po chemikovi Johnu Williamu Huffmanovi
KLH	hemocyanin z mořského plže
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem
LFIA	imunochromatografický test
LOD	detekční limit
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MAO	monoaminoxidáza
MDA	3,4-methylendioxyamfetamin
MDEA	3,4-methylendioxyethylamfetamin
MDMA	3,4-methylendioxy-N-methylamfetamin
MDPV	3,4-Methylenedioxyprovaleron
MeO	methoxy

MS	hmotnostní spektrometrie
MXE	methoxetamin (2-(3-metoxyfenyl)-2-(ethylamino)cyklohexan-1-on)
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NMDAR	<i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická resonance
NMS	národní monitorovací středisko
NOR	noradrenalin
NPS	nové psychoaktivní látky
NSD	nové syntetické drogy
OPL	omamné a psychotropní látky
PPAR	receptory aktivované přes proliferátory peroxisomů
qTOF	sdužený kvadrupólový a průletový hmotnostní analyzátor
RSA	králíčí sérový albumin
SALLE	salting out liquid liquid extraction
SERT	serotoninový transportér
Sb.	Sbírky zákonů
sp. zn. Tpjn	spisová značka stanoviska trestního kolegia Nejvyššího soudu
THC	tetrahydrokanabinol
TOF	hmotnostní spektrometr s detektorem doby letu
TRPV1	tranzientní receptor vaniloidního typu 1
UNODC	United nations office on drugs and crime/ Úřad OSN pro drogy a kriminalitu
VMAT2	vezikulární monoamin transportér 2
XPRD	rentgenové práškové difrakce

11 Literatura

1. Guerra-Doce, E. Psychoactive Substances in Prehistoric Times: Examining the Archaeological Evidence. *Time and Mind* **2015**, 8 (1), 91-112.
2. Woodrow, W.; Marshall, T. R.; Clarke, J. P.; Swanson, C. A., Harrison Anti-Narcotic Act. *Public Law No. 223*, 63rd Cong., 1914.
3. Escobedo, A.; Janda, L. *Stručné dějiny drog*, 1st ed.; Volvox Globator: Praha, 2003.
4. United Nations Office on Drugs and Crime, *World drug report*: New York, 2016.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European drug report 2016: Trend and Developments*: Luxembourg, 2016.
6. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *New psychoactive substances in Europe, Legislation and prosecution — current challenges and solutions*: Luxembourg, 2016.
7. The Council of the European Union, *Rozhodnutí Rady o výměně informací, hodnocení rizika a kontrole nových psychoaktivních látek*. 2005/387/JVV: 2005.
8. United Nations Office on Drugs and Crime, *The challenge of new psychoactive substances*: Vienna, 2013.
9. Schifano, F.; Orsolini, L.; Duccio Papanti, G.; Corkery, J. M. Novel psychoactive substances of interest for psychiatry. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)* **2015**, 14 (1), 15-26.
10. Fojtíková, L.; Holubová, B.; Kuchař, M., Nové psychoaktivní látky. *Chemické Listy* **2017**, 111 (4), 234-238.
11. Mravčík, V.; Chomynová, P.; Grohmannová, K.; Nečas, V.; Grolmusová, L.; Kiššová, L.; Nechanská, B.; Sopko, B.; Fidesová, H.; Vopravil, J.; Jurysto, L. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2013*. Úřad vlády České republiky: Praha, 2014.
12. Mravčík, V.; Běláčková, V.; Drápalová, E.; Zábranský, T. *Nové psychoaktivní látky v České republice: výskyt rizika a související opatření*, 1st ed.; Klinika adiktologie 1. LF UK v Praze a VFN v Praze: Praha, 2015.
13. United Nations Office on Drugs and Crime, *World drug report*: Vienna, 2017.
14. Council decision on the information exchange, risk-assessment and control of new psychoactive substances. 2005/387/JHA, Official Journal of the European Union: Brussel, 2005.
15. Sedefov, R.; Gallegos, A.; Mounteney, J.; Kenny, P. Monitoring novel psychoactive substances, a global perspective. *Novel Psychoactive Substances*, 1st ed.; European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction: Lisbon, 2013.
16. Zákon o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů. Zákon č. 167/1998 Sb., *Sbírka zákonů*, Praha, 1998.
17. Zákon o prekursorech drog. Zákon č. 272/2013 Sb. *Sbírka zákonů*, Praha, 2013.
18. Nařízení vlády o seznamech návykových látek. *Nařízení vlády č. 463/2013*, Úřad vlády ČR: Praha, 2013.
19. Trestní zákoník, Zákon č. 40/2009 Sb., *Sbírka zákonů*, Praha, 2009.
20. Zákon o ochraně zdraví před škodlivými účinky návykových látek. Zákon č. 65/2017 Sb., *Sbírka zákonů*, Praha, 2017.
21. Sumnall, H. R. Epidemiology of Use of Novel Psychoactive Substances. *Handbuch Psychoaktive Substanzen*, 2016; pp 1-19.
22. van Amsterdam, J. G.; Nabben, T.; Keiman, D.; Haanschoten, G.; Korf, D. Exploring the attractiveness of new psychoactive substances (NPS) among experienced drug users. *Journal of Psychoactive Drugs* **2015**, 47 (3), 177-181.
23. Fojtíková, L.; Holubová, B.; Kuchař, M. Nové psychoaktivní látky. *Chemické Listy* **2017**, 111, 234-238.
24. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *New psychoactive substances in Europe. An update from the EU Early Warning System*: Luxembourg, 2015.
25. Mravčík, V.; Chomynová, P.; Grohmannová, K.; Janíková, B.; Leštinová, Z. T.; Rous, Z.; Kiššová, L.; Kozák, J.; Nechanská, B.; Vlach, T.; Černíková, T.; Fidesová, H.; Jurysto, L.; Vopravil, J. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2015*. Úřad vlády České republiky: 2015.
26. United Nations Office on Drugs and Crime, *World drug report*: Vienna, 2019.

27. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *EU Drug markets report in depth analysis*: Luxembourg, 2016.
28. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European drug report 2019: Trends and Developments*: Luxembourg, 2019.
29. Mravčík, V.; Běláčková, V.; Grohmannová, K.; Zábranský, T., Nové psychoaktivní látky a jejich výskyt v České republice. *Časopis lékařů českých* **2015**, 154 (5), 216-221.
30. United Nations Office on Drugs and Crime, *Current NPS Threats*: Vienna, 2019.
31. National Institute of Justice, Office of Science and Technology, *Color Test Reagents/Kits for Preliminary Identification of Drugs of Abuse*; NCJ 183258: Washington, DC, 2000.
32. Fitzgerald, T. J.; Walaszek, E. J., Drug Detection with Color Tests. *Clinical toxicology* **1973**, 6 (4), 599-605.
33. Hajkova, K.; Jurasek, B.; Sykora, D.; Palenicek, T.; Miksatkova, P.; Kuchar, M. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction as a suitable approach for determination of methoxetamine in large sets of tissue samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, 408 (4), 1171-1181.
34. United Nations Office on Drugs and Crime, *Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials*: New York, 2013.
35. Archer, R. P.; Treble, R.; Williams, K. Reference materials for new psychoactive substances. *Drug Testing and Analysis* **2011**, 3 (7-8), 505-514.
36. Griffiths, P.; Götz, W.; Hammond, B., Forewords. *Novel Psychoactive Substances*, Dargan, P. I.; Wood, D. M., Eds. Academic Press: Boston, 2013; pp ix-xi.
37. Gambaro, V.; Arnoldi, S.; Colombo, M. L.; Dell'Acqua, L.; Guerrini, K.; Roda, G. Determination of the active principles of Catha Edulis: Quali-quantitative analysis of cathinone, cathine, and phenylpropanolamine. *Forensic Science International* **2012**, 217 (1-3), 87-92.
38. Odenwald, M.; Klein, A.; Warfa, N. Užívání katy v Evropě: důsledky pro evropskou politiku. *Periodikum Evropského monitorovacího centra pro drogy a drogovou závislost* **2011**.
39. Coppola, M.; Mondola, R. Synthetic cathinones: chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as "bath salts" or "plant food". *Toxicology Letters* **2012**, 211 (2), 144-149.
40. Schechter, M. D. Dopaminergic nature of acute cathine tolerance. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **1990**, 36 (4), 817-820.
41. Kalix, P.; Geissshusler, S.; Brenneisen, R.; Koelbing, U.; Fisch, H. U. Cathinone, a phenylpropylamine alkaloid from khat leaves that has amphetamine effects in humans. *NIDA research monograph* **1990**, 105 (105), 289-290.
42. Brenneisen, R.; Fisch, H. U.; Koelbing, U.; Geissshusler, S.; Kalix, P. Amphetamine-like effects in humans of the khat alkaloid cathinone. *British journal of clinical pharmacology* **1990**, 30 (6), 825-828.
43. Colzato, L. S.; Ruiz, M. J.; van den Wildenberg, W. P.; Hommel, B. Khat use is associated with impaired working memory and cognitive flexibility. *PloS one* **2011**, 6 (6), e20602.
44. Zuba, D. Identification of cathinones and other active components of legal highs' by mass spectrometric methods. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 32, 15-30.
45. Mohr, S.; Pilaj, S.; Schmid, M. G. Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2012**, 33 (11), 1624-1630.
46. Merola, G.; Fu, H.; Tagliaro, F.; Macchia, T.; McCord, B. R. Chiral separation of 12 cathinone analogs by cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection. *Electrophoresis* **2014**, 35 (21-22), 3231-3241.
47. Tyrkko, E.; Andersson, M.; Kronstrand, R. The toxicology of new psychoactive substances: synthetic Cathinones and Phenylethylamines. *Therapeutic Drug Monitoring* **2016**, 38 (2), 190-216.
48. Borek, H. A.; Holstege, C. P. Hyperthermia and multiorgan failure after abuse of "bath salts" containing 3,4-methylenedioxypyrovalerone. *Annals of Emergency Medicine* **2012**, 60, 103-105.
49. Adebamiro, A.; Perazella, M. A. Recurrent acute kidney injury following bath salts intoxication. *American Journal of Kidney Diseases* **2012**, 59, 273-275.
50. Wood, D. M.; Greene, S. L.; Dargan, P. I. Clinical pattern of toxicity associated with the novel synthetic cathinone mephedrone. *Emergency medicine journal* **2011**, 28, 280-282.

51. Warrick, B. J.; Wilson, J.; Hedge, M.; Freeman, S.; Leonard, K.; Aaron, C. Lethal serotonin syndrome after methylone and butylone ingestion. *Journal of medical toxicology* **2012**, *8*, 65-68.
52. Páleníček, T. Syntetické drogy nově se vyskytující na ilegální drogové scéně. *Psychiatrie pro praxi* **2005**, *5*, 241-246.
53. Ashrafioun, L.; Bonadio, F. A.; Baik, K. D.; Bradbury, S. L.; Carhart, V. L.; Cross, N. A.; Davis, A. K.; Feuille, M.; Harper, A. R.; Lackey, J. H.; Lang, B.; Lauritsen, K. J.; Leith, J.; Osborn, L. A.; Rosenberg, H.; Stock, J.; Zaturenskaya, M. Patterns of use, acute subjective experiences, and motivations for using synthetic Cathinones ("Bath Salts") in recreational users. *Journal of Psychoactive Drugs* **2016**, *48* (5), 336-343.
54. Hohmann, N.; Mikus, G.; Czock, D. Effects and risks associated with novel psychoactive substances: mislabeling and sale as bath salts, spice, and research chemicals. *Deutsches Ärzteblatt international* **2014**, *111* (9), 139-147.
55. Khullar, V.; Jain, A.; Sattari, M. Emergence of new classes of recreational drugs-synthetic cannabinoids and cathinones. *Journal of general internal medicine* **2014**, *29* (8), 1200-1204.
56. Kuchar, M. Nové psychoaktivní látky. *Klinická adiktologie*, 1st ed.; Grada: Praha, 2015; pp 84-95.
57. Belaňová, I. Analýza stimulantů amfetaminového typu ve vzorcích novorozeneckého mekonia. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2019.
58. Kelly, B. C. Legally tripping: a qualitative profile of Salvia divinorum use among young adults. *Journal of Psychoactive Drugs* **2011**, *43* (1), 46-54.
59. Jacob, P.; Shulgin, A. T. Neurobiological Technologies, Preparation of Novel N-Substituted-2-Amino-3',4'-Methylenedioxy Propiophenone As Anti-Depressant and Anti-Parkinsonism Agents. US Patent WO9639133. 1996.
60. Liechti, M. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Medical Weekly* **2015**, *145*, w14043.
61. Bossong, M. G.; Van Dijk, J. P.; Niesink, R. J. Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? *Addiction Biology* **2005**, *10* (4), 321-323.
62. Baumann, M. H.; Partilla, J. S.; Lehner, K. R.; Thorndike, E. B.; Hoffman, A. F.; Holy, M.; Rothman, R. B.; Goldberg, S. R.; Lupica, C. R.; Sitte, H. H.; Brandt, S. D.; Tella, S. R.; Cozzi, N. V.; Schindler, C. W. Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive 'bath salts' products. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38* (4), 552-562.
63. Simmler, L. D.; Buser, T. A.; Donzelli, M.; Schramm, Y.; Dieu, L. H.; Huwyler, J.; Chaboz, S.; Hoener, M. C.; Liechti, M. E. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *British Journal of Pharmacology* **2013**, *168* (2), 458-470.
64. Meyer, M. R.; Du, P.; Schuster, F.; Maurer, H. H. Studies on the metabolism of the alpha-pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC-MS and LC-high-resolution MS and its detectability in urine by GC-MS. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45* (12), 1426-1442.
65. Feriančíková, B. Analýza psychoaktivní látky MDPV v biologické matrici metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2016.
66. Mechoulam, R.; Hanus, L. O.; Pertwee, R.; Howlett, A. C. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature reviews. Neuroscience* **2014**, *15* (11), 757-764.
67. Bhattacharyya, S.; Morrison, P. D.; Fusar-Poli, P.; Martin-Santos, R.; Borgwardt, S.; Winton-Brown, T.; Nosarti, C.; CM, O. C.; Seal, M.; Allen, P.; Mehta, M. A.; Stone, J. M.; Tunstall, N.; Giampietro, V.; Kapur, S.; Murray, R. M.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A.; Atakan, Z.; McGuire, P. K. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology* **2010**, *35* (3), 764-774.
68. Englund, A.; Atakan, Z.; Kralj, A.; Tunstall, N.; Murray, R.; Morrison, P. The effect of five day dosing with THCV on THC-induced cognitive, psychological and physiological effects in healthy male human volunteers: A placebo-controlled, double-blind, crossover pilot trial. *Journal of psychopharmacology* **2016**, *30* (2), 140-151.
69. Monnet-Tschudi, F.; Hazekamp, A.; Perret, N.; Zurich, M. G.; Mangin, P.; Giroud, C.; Honegger, P. Delta-9-tetrahydrocannabinol accumulation, metabolism and cell-type-specific adverse effects in aggregating brain cell cultures. *Toxicology and applied pharmacology* **2008**, *228* (1), 8-16.

70. Whiting, P. F.; Wolff, R. F.; Deshpande, S.; Di Nisio, M.; Duffy, S.; Hernandez, A. V.; Keurentjes, J. C.; Lang, S.; Misso, K.; Ryder, S.; Schmidtkofer, S.; Westwood, M.; Kleijnen, J. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* **2015**, 313 (24), 2456-2473.
71. Zhornitsky, S.; Potvin, S. Cannabidiol in humans-the quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals* **2012**, 5 (5), 529-552.
72. Alexander, S. P. Therapeutic potential of cannabis-related drugs. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2016**, 64, 157-166.
73. Atwood, B. K.; Straiker, A.; Mackie, K. CB(2) cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology* **2012**, 63 (4), 514-523.
74. Paloczi, J.; Varga, Z. V.; Hasko, G.; Pacher, P. Neuroprotection in Oxidative Stress-Related Neurodegenerative Diseases: Role of Endocannabinoid System Modulation. *Antioxidants and Redox Signaling* **2018**, 29 (1), 75-108.
75. McPartland, J. M. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research* **2018**, 3 (1), 203-212.
76. Lainton, J. A. H.; Huffman, J. W.; Martin, B. R.; Compton, D. R. 1-Alkyl-3-(1-naphthoyl)pyrroles: A new class of cannabinoid. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36 (9), 1401-1404.
77. Huffman, J. W.; Lu, J.; Dai, D.; Kitaygorodskiy, A.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. Synthesis and pharmacology of a hybrid cannabinoid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2000**, 8 (2), 439-447.
78. Huffman, J. W.; Lu, J.; Hynd, G.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. A Pyridone Analogue of Traditional Cannabinoids. A New Class of Selective Ligands for the CB2 Receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2001**, 9 (11), 2863-2870.
79. Huffman, J. W.; Mabon, R.; Wu, M.-J.; Lu, J.; Hart, R.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. 3-Indolyl-1-naphthylmethanes: new cannabimimetic indoles provide evidence for aromatic stacking interactions with the CB1 cannabinoid receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2003**, 11 (4), 539-549.
80. Huffman, J. W.; Zengin, G.; Wu, M.-J.; Lu, J.; Hynd, G.; Bushell, K.; Thompson, A. L. S.; Bushell, S.; Tartal, C.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H.; Selley, D. E.; Cassidy, M. P.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl)indoles at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB2 receptor agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2005**, 13 (1), 89-112.
81. Huffman, J. W.; Padgett, L. W.; Isherwood, M. L.; Wiley, J. L.; Martin, B. R. 1-Alkyl-2-aryl-4-(1-naphthoyl)pyrroles: New high affinity ligands for the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16 (20), 5432-5435.
82. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol, *EU Drug Markets Report: Strategic Overview*: Luxembourg, 2016.
83. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *Perspectives on drugs: Synthetic cannabinoids in Europe*: Luxembourg, 2016.
84. Harris, C. R.; Brown, A. Synthetic cannabinoid intoxication: a case series and review. *The Journal of emergency medicine* **2013**, 44 (2), 360-366.
85. Yeakel, J. K.; Logan, B. K. Blood synthetic cannabinoid concentrations in cases of suspected impaired driving. *Journal of analytical toxicology* **2013**, 37 (8), 547-551.
86. McGuinness, T. M.; Newell, D. Risky recreation: Synthetic cannabinoids have dangerous effects. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services* **2012**, 50 (8), 16-18.
87. Hoyte, C. O.; Jacob, J.; Monte, A. A.; Al-Jumaan, M.; Bronstein, A. C.; Heard, K. J. A characterization of synthetic cannabinoid exposures reported to the National Poison Data System in 2010. *Annals of Emergency Medicine* **2012**, 60 (4), 435-438.
88. Cahová, K. Farmakokinetická studie syntetického kanabinoidu JWH-073 metodou HPLC-MS. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2017.
89. Domino, E. F. Taming the ketamine tiger. 1965. *Anesthesiology* **2010**, 113 (3), 678-684.

90. Karinen, R.; Hoiseth, G. A literature review of blood concentrations of new psychoactive substances classified as phenethylamines, aminoindanes, arylalkylamines, arylcyclohexylamines, and indolalkylamines. *Forensic Science International* **2017**, *276*, 120-125.
91. Morris, H.; Wallach, J. From PCP to MXE: a comprehensive review of the non-medical use of dissociative drugs. *Drug Testing and Analysis* **2014**, *6* (7-8), 614-632.
92. Albers, G. W.; Clark, W. M.; Atkinson, R. P.; Madden, K.; Data, J. L.; Whitehouse, M. J. Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke. *Stroke* **1999**, *30* (3), 508-513.
93. Studerus, E.; Gamma, A.; Vollenweider, F. X. Psychometric evaluation of the altered states of consciousness rating scale (OAV). *PloS one* **2010**, *5* (8), e12412.
94. Reissig, C. J.; Carter, L. P.; Johnson, M. W.; Mintzer, M. Z.; Klinedinst, M. A.; Griffiths, R. R. High doses of dextromethorphan, an NMDA antagonist, produce effects similar to classic hallucinogens. *Psychopharmacology (Berl)* **2012**, *223* (1), 1-15.
95. Newcomer, J. W.; Farber, N. B.; Jevtovic-Todorovic, V.; Selke, G.; Melson, A. K.; Hershey, T.; Craft, S.; Olney, J. W. Ketamine-Induced NMDA Receptor Hypofunction as a Model of Memory Impairment and Psychosis. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *20* (2), 106-118.
96. Tyler, M. W.; Yourish, H. B.; Ionescu, D. F.; Haggarty, S. J. Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine. *ACS Chemical Neuroscience* **2017**, *8* (6), 1122-1134.
97. Bergman, S. A. Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. *Anesthesia Progress* **1999**, *46* (1), 10-20.
98. Can, A.; Zanos, P.; Moaddel, R.; Kang, H. J.; Dossou, K. S.; Wainer, I. W.; Cheer, J. F.; Frost, D. O.; Huang, X. P.; Gould, T. D. Effects of Ketamine and Ketamine Metabolites on Evoked Striatal Dopamine Release, Dopamine Receptors, and Monoamine Transporters. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2016**, *359* (1), 159-170.
99. Holík, M. Analýza ketaminu a norketaminu v biologické matrici metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2016.
100. Sinner, B.; Graf, B. M. Ketamine. *Handbook of experimental pharmacology* **2008**, (182), 313-333.
101. van Velzen, M.; Dahan, A. Ketamine metabolomics in the treatment of major depression. *Anesthesiology* **2014**, *121* (1), 4-5.
102. Bowdle, T. A.; Radant, A. D.; Cowley, D. S.; Kharasch, E. D.; Strassman, R. J.; Roy-Byrne, P. P. Psychedelic effects of ketamine in healthy volunteers: relationship to steady-state plasma concentrations. *Anesthesiology* **1998**, *88* (1), 82-88.
103. Oranje, B.; van Berckel, B. N.; Kemner, C.; van Ree, J. M.; Kahn, R. S.; Verbaten, M. N. The effects of a sub-anaesthetic dose of ketamine on human selective attention. *Neuropsychopharmacology* **2000**, *22* (3), 293-302.
104. World Health Organization, *34th ECDD of the World Health Organisation: Critical review of Ketamine*: Geneva, 2006.
105. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European drug report 2017: Trends and Developments*: Luxembourg, 2017.
106. Hays, P. A.; Casale, J. F.; Berrier, A. L. The characterization of 2-(3-methoxyphenyl)-2-(ethylamino)cyclohexanone (methoxetamine). *Microgram journal* **2012**, *9*, 3-17.
107. Sos, P.; Klirova, M.; Novak, T.; Kohutova, B.; Horacek, J.; Palenicek, T. Relationship of ketamine's antidepressant and psychotomimetic effects in unipolar depression. *Neuro Endocrinology Letters* **2013**, *34* (4), 287-293.
108. Shahani, R.; Streutker, C.; Dickson, B.; Stewart, R. J. Ketamine-associated ulcerative cystitis: a new clinical entity. *Urology* **2007**, *69* (5), 810-812.
109. Muetzelfeldt, L.; Kamboj, S. K.; Rees, H.; Taylor, J.; Morgan, C. J.; Curran, H. V. Journey through the K-hole: phenomenological aspects of ketamine use. *Drug and Alcohol Dependence* **2008**, *95* (3), 219-229.
110. Chu, P. S.; Ma, W. K.; Wong, S. C.; Chu, R. W.; Cheng, C. H.; Wong, S.; Tse, J. M.; Lau, F. L.; Yiu, M. K.; Man, C. W. The destruction of the lower urinary tract by ketamine abuse: a new syndrome? *British Journal of Urology International* **2008**, *102* (11), 1616-1622.

111. Dargan, P. I.; Tang, H. C.; Liang, W.; Wood, D. M.; Yew, D. T. Three months of methoxetamine administration is associated with significant bladder and renal toxicity in mice. *Clinical Toxicology (Phila)* **2014**, 52 (3), 176-180.
112. Horsley, R. R.; Lhotkova, E.; Hajkova, K.; Jurasek, B.; Kuchar, M.; Palenicek, T. Detailed pharmacological evaluation of methoxetamine (MXE), a novel psychoactive ketamine analogue-Behavioural, pharmacokinetic and metabolic studies in the Wistar rat. *Brain Research Bulletin* **2016**, 126, 102-110.
113. Adamowicz, P.; Zuba, D. Fatal intoxication with methoxetamine. *Journal of Forensic Sciences* **2015**, 60 Suppl 1, S264-268.
114. Davidson, C.; Hashemi, G.; Gant, A.; Fergus, S.; Benha, C.; Lione, L. Effects of methoxetamine in rat bladder and nucleus accumbens brain tissue. *Research and Advances in Psychiatry*, 2014; Vol. 39. 3rd International Conference on Novel Psychoactive Substances (NPS), Rome, Italy, May 15, 2014.
115. Roth, B. L.; Gibbons, S.; Arunotayanun, W.; Huang, X. P.; Setola, V.; Treble, R.; Iversen, L. The ketamine analogue methoxetamine and 3- and 4-methoxy analogues of phencyclidine are high affinity and selective ligands for the glutamate NMDA receptor. *PloS one* **2013**, 8 (3), e59334.
116. Zanda, M. T.; Fadda, P.; Chiamulera, C.; Fratta, W.; Fattore, L. Methoxetamine, a novel psychoactive substance with serious adverse pharmacological effects: a review of case reports and preclinical findings. *Behavioural Pharmacology* **2016**, 27 (6), 489-496.
117. Rosenbaum, C. D.; Carreiro, S. P.; Babu, K. M. Here today, gone tomorrow...and back again? A review of herbal marijuana alternatives (K2, Spice), synthetic cathinones (bath salts), kratom, Salvia divinorum, methoxetamine, and piperazines. *Journal of medical toxicology* **2012**, 8 (1), 15-32.
118. Kjellgren, A.; Jonsson, K. Methoxetamine (MXE) - a phenomenological study of experiences induced by a "legal high" from the internet. *Journal of Psychoactive Drugs* **2013**, 45 (3), 276-286.
119. Corazza, O.; Schifano, F.; Simonato, P.; Fergus, S.; Assi, S.; Stair, J.; Corkery, J.; Trincas, G.; Deluca, P.; Davey, Z.; Blaszkowski, U.; Demetrovics, Z.; Moskalewicz, J.; Enea, A.; di Melchiorre, G.; Mervo, B.; di Furia, L.; Farre, M.; Flesland, L.; Pasinetti, M.; Pezzolesi, C.; Pisarska, A.; Shapiro, H.; Siemann, H.; Skutle, A.; Enea, A.; di Melchiorre, G.; Sferrazza, E.; Torrens, M.; van der Kreeft, P.; Zummo, D.; Scherbaum, N. Phenomenon of new drugs on the Internet: the case of ketamine derivative methoxetamine. *Human Psychopharmacology* **2012**, 27 (2), 145-149.
120. Frison, G.; Zamengo, L.; Zancanaro, F.; Tisato, F.; Traldi, P. Characterization of the designer drug deschloroketamine (2-methylamino-2-phenylcyclohexanone) by gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry, multistage mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, 30 (1), 151-160.
121. Kolderová, N. Chirální separace deschlorketaminu a jeho metabolitů v biologických matricích superkritickou fluidní chromatografií. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2019.
122. Vágnerová, M. Farmakokinetická studie deschlorketaminu metodou HPLC-MS. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2018.
123. Pánková, T. Určení metabolického profilu deschlorketaminu v biologické matrici metodou HPLC-MS. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2017.
124. Shulgin, A.; Shulgin, A. *TiHKAL: The Continuation*. 1st ed.; Transform Press: California, 1997.
125. Hill, S. L.; Thomas, S. H. Clinical toxicology of newer recreational drugs. *Clinical toxicology* **2011**, 49 (8), 705-719.
126. Nagai, F.; Nonaka, R.; Satoh Hisashi Kamimura, K. The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *European journal of pharmacology* **2007**, 559 (2-3), 132-137.
127. Ray, T. S. Psychedelics and the human receptorome. *PloS one* **2010**, 5 (2), e9019.
128. Fantegrossi, W. E.; Murnane, K. S.; Reissig, C. J. The behavioral pharmacology of hallucinogens. *Biochemical pharmacology* **2008**, 75 (1), 17-33.
129. Cozzi, N. V.; Gopalakrishnan, A.; Anderson, L. L.; Feih, J. T.; Shulgin, A. T.; Daley, P. F.; Ruoho, A. E. Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate

- behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. *Journal of Neural Transmission* **2009**, 116 (12), 1591-1599.
130. Lessin, A. W.; Long, R. F.; Parkes, M. W. Central Stimulant Actions of α -Alkyl Substituted Tryptamines in Mice. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* **1965**, 24 (1), 49-67.
 131. Nichols, D. E. Hallucinogens. *Pharmacology and Therapeutics* **2004**, 101 (2), 131-181.
 132. Hoffman, A. How LSD originated. *Journal of Psychedelic Drugs* **1979**, 11 (1-2), 53-60.
 133. Arunotayanun, W.; Gibbons, S. Natural product 'legal highs'. *Natural product reports* **2012**, 29 (11), 1304-1316.
 134. Milen, M.; Hazai, L.; Kolonits, P.; Kalaus, G.; Szabó, L.; Gömöry, Á.; Szántay, C. Studies on stereoselective approaches to β -carboline derivatives. *Open Chemistry*, **2005**, 3 (1), 118-136.
 135. Freedland, C. S.; Mansbach, R. S. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug and Alcohol Dependence* **1999**, 54 (3), 183-194.
 136. McKenna, D. J.; Towers, G. H.; Abbott, F. S. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants Part 2: Constituents of orally-active Myristicaceous hallucinogens. *Journal of ethnopharmacology* **1984**, 12 (2), 179-211.
 137. Moura, S.; Carvalho, F. G.; de Oliveira, C. D. R.; Yonamine, M. qNMR: An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. *Phytochemistry Letters* **2010**, 3 (2), 79-83.
 138. Strassman, R. J.; Qualls, C. R. Dose-response study of *N,N*-dimethyltryptamine in humans. I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. *Archives of general psychiatry* **1994**, 51 (2), 85-97.
 139. Szara, S. Dimethyltryptamin: its metabolism in man; the relation to its psychotic effect to the serotonin metabolism. *Experientia* **1956**, 12 (11), 441-442.
 140. Ly, C.; Greb, A. C.; Cameron, L. P.; Wong, J. M.; Barragan, E. V.; Wilson, P. C.; Burbach, K. F.; Soltanzadeh Zarandi, S.; Sood, A.; Paddy, M. R.; Duim, W. C.; Dennis, M. Y.; McAllister, A. K.; Ori-McKenney, K. M.; Gray, J. A.; Olson, D. E. Psychedelics Promote Structural and Functional Neural Plasticity. *Cell Reports* **2018**, 23 (11), 3170-3182.
 141. Gotvaldová, K. Návrh analýzy psychoaktivních látek v houbách rodu *Psilocybe* metodou LC-MS. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2016.
 142. Gotvaldová, K. Kvantifikace tryptaminových alkaloidů ve stopkovýtrusých houbách metodou HPLC-MS. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2018.
 143. Peden, N. R.; Bissett, A. F.; Macaulay, K. E.; Crooks, J.; Pelosi, A. J. Clinical toxicology of "magic mushroom" ingestion. *Postgraduate medical journal* **1981**, 57 (671), 543-545.
 144. Kamata, T.; Katagi, M.; Tsuchihashi, H. Metabolism and toxicological analyses of hallucinogenic tryptamine analogues being abused in Japan. *Forensic Toxicology* **2010**, 28 (1), 1-8.
 145. Fadiman, J.; Krob, S. Microdosing: the phenomenon, research results, and startling surprises. Presented at the Psychedelic Science 2017 conference, Oakland, CA, 2017.
 146. Fadiman, J.; Korb, S. Might Microdosing Psychedelics Be Safe and Beneficial? An Initial Exploration. *Journal of Psychoactive Drugs* **2019**, 51 (2), 118-122.
 147. Páleníček, T. Syntetické drogy nově se vyskytující na ilegální drogové scéně. *Psychiatrie pro Praxi* **2005**, 5, 241-245.
 148. Rogawski, M. A.; Aghajanian, G. K. Serotonin autoreceptors on dorsal raphe neurons: structure-activity relationships of tryptamine analogs. *The Journal of neuroscience* **1981**, 1 (10), 1148-1154.
 149. Winter, J. C.; Filipink, R. A.; Timineri, D.; Helsley, S. E.; Rabin, R. A. The paradox of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine: an indoleamine hallucinogen that induces stimulus control via 5-HT_{1A} receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2000**, 65 (1), 75-82.
 150. Shulgin, A. T.; Shulgin, A. *Pihkal : a chemical love story*. Transform Press: Berkeley, CA, 1991.
 151. Caudevilla-Galligo, F.; Riba, J.; Ventura, M.; Gonzalez, D.; Farre, M.; Barbanoj, M. J.; Bouso, J. C. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): presence in the recreational drug market in Spain, pattern of use and subjective effects. *Journal of psychopharmacology* **2012**, 26 (7), 1026-1035.
 152. Pasin, D.; Cawley, A.; Bidny, S.; Fu, S. Characterization of hallucinogenic phenethylamines using high-resolution mass spectrometry for non-targeted screening purposes. *Drug Testing and Analysis* **2017**, 9 (10), 1620-1629.

153. Zawilska, J. B. "Legal Highs"--An Emerging Epidemic of Novel Psychoactive Substances. *International Review of Neurobiology* **2015**, 120, 273-300.
154. Theobald, D. S.; Putz, M.; Schneider, E.; Maurer, H. H. New designer drug 4-iodo-2,5-dimethoxy-beta-phenethylamine (2C-I): studies on its metabolism and toxicological detection in rat urine using gas chromatographic/mass spectrometric and capillary electrophoretic/mass spectrometric techniques. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, 41 (7), 872-886.
155. Bosak, A.; LoVecchio, F.; Levine, M. Recurrent Seizures and Serotonin Syndrome Following "2C-I" Ingestion. *Journal of medical toxicology* **2013**, 9 (2), 196-198.
156. Carmo, H.; de Boer, D.; Remiao, F.; Carvalho, F.; dos Reis, L. A.; de Lourdes Bastos, M. Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration. *Journal of Chromatography B* **2004**, 811 (2), 143-152.
157. Sacks, J.; Ray, M. J.; Williams, S.; Opatowsky, M. J. Fatal toxic leukoencephalopathy secondary to overdose of a new psychoactive designer drug 2C-E ("Europa"). *Baylor University Medical Center Proceedings* **2012**, 25 (4), 374-376.
158. Balikova, M. Nonfatal and fatal DOB (2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine) overdose. *Forensic Science International* **2005**, 153 (1), 85-91.
159. Curtis, B.; Kemp, P.; Harty, L.; Choi, C.; Christensen, D. Postmortem Identification and Quantitation of 2,5-Dimethoxy-4-n-propylthiophenethylamine Using GC-MSD and GC-NPD*. *Journal of analytical toxicology* **2003**, 27 (7), 493-498.
160. Shulgin, A. T.; Carter, M. F. Centrally active phenethylamines. *Psychopharmacology Communications* **1975**, 1 (1), 93-98.
161. Kerrigan, S.; Mellon, M. B.; Banuelos, S.; Arndt, C. Evaluation of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to Identify Psychedelic Phenethylamines. *Journal of analytical toxicology* **2011**, 35 (7), 444-451.
162. King, L. A. New phenethylamines in Europe. *Drug Testing and Analysis* **2014**, 6 (7-8), 808-818.
163. Ambrose, J. B.; Bennett, H. D.; Lee, H. S.; Josephson, S. A. Cerebral vasculopathy after 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine ingestion. *Neurologist* **2010**, 16 (3), 199-202.
164. Huang, H. H.; Bai, Y. M. Persistent psychosis after ingestion of a single tablet of '2C-B'. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **2011**, 35 (1), 293-294.
165. Vries, T.; Wynberg, H.; van Echten, E.; Koek, J.; Ten Hoeve, W.; Kellogg, R. M.; Broxterman, Q. B.; Minnaard, A.; Kaptein, B.; van der Sluis, S.; Hulshof, L.; Kooistra, J. The Family Approach to the Resolution of Racemates. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37 (17), 2349-2354.
166. Fogassy, E.; Nogradi, M.; Kozma, D.; Egri, G.; Palovics, E.; Kiss, V. Optical resolution methods. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, 4 (16), 3011-3030.
167. Maříková, T. Vývoj metod preparativní HPLC enantioseparace katinonů. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2018.
168. Kolderová, N. Chirální separace syntetických katinonů. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2017.
169. Hegrová, M. Analýza psychoaktivních látek ze skupiny syntetických katinonů kapilární elektroforézou. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2015.
170. Matůšková, K. Enantioseparace psychoaktivních látek ze skupiny syntetických katinonů kapilární elektroforézou s využitím cyklodextrinů jako chirálních selektorů. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2016.
171. Hercíková, J. Využití nových chirálních ionexů pro enantioseparaci syntetických drog. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2017.
172. Lacková, M. Analýza syntetických katinonů v biologické matrici pomocí kapilární elektroforézy. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2017.
173. Fenton, O. S.; Tonge, L. A.; Moot, T. H.; Frederick, K. A. Quantitative Analysis of Simulated Illicit Street-Drug Samples Using Raman Spectroscopy and Partial Least Squares Regression. *Spectroscopy Letters* **2011**, 44 (4), 229-234.
174. Risoluti, R.; Materazzi, S.; Gregori, A.; Ripani, L. Early detection of emerging street drugs by near infrared spectroscopy and chemometrics. *Talanta* **2016**, 153, 407-413.
175. Datta, S.; Grant, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3 (1), 42-57.
176. Fukal, L.; Holubová, B. *Imunochemie a imunoanalýza*. 1st ed.; L. Fukal: Praha, 2007.

177. Daussant, J.; Desvaux, F. X. *Introduction to Immunochemical Techniques for Medical Diagnosis, Food Quality Control and Environmental Testing*. 1st ed.; VŠCHT Praha: Praha, 2007.
178. Langer, N.; Steinicke, F.; Lindigkeit, R.; Ernst, L.; Beuerle, T. Determination of cross-reactivity of poly- and monoclonal antibodies for synthetic cannabinoids by direct SPR and ELISA. *Forensic Science International* **2017**, *280*, 25-34.
179. Králová, B. *Bioanalytické metody*. 3rd ed.; VŠCHT Praha: Praha, 2001.
180. Karim, M., *ELISA: History, Types and Applications*. Nova Science Publishers: Shiyang, Hubei, P.R. China, 2018.
181. Páleníček, T.; Kuchař, M. Je možná detekce a identifikace nových syntetických drog (NSD) pomocí orientačních testů? *Adiktologie* **2011**, *11* (4), 208-214.
182. Roda, E.; Lonati, D. Evaluation of Two Different Screening ELISA Assays for Synthetic Cathinones (Mephedrone/Methcathinone and MDPV) with LC-MS Method in Intoxicated Patients. *Journal of Clinical Toxicology* **2016**, *6* (3), 302-311.
183. Synthetic Cathinones Test. <https://toxicology.neogen.com/en/synthetic-cathinones-forensic> (accessed 8.9.2019).
184. Wintermeyer, A.; Moller, I.; Thevis, M.; Jubner, M.; Beike, J.; Rothschild, M. A.; Bender, K. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398* (5), 2141-2153.
185. Wohlfarth, A.; Pang, S.; Zhu, M.; Gandhi, A. S.; Scheidweiler, K. B.; Liu, H. F.; Huestis, M. A. First metabolic profile of XLR-11, a novel synthetic cannabinoid, obtained by using human hepatocytes and high-resolution mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **2013**, *59* (11), 1638-1648.
186. Hutter, M.; Broecker, S.; Kneisel, S.; Auwarter, V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47* (1), 54-65.
187. Knittel, J. L.; Holler, J. M.; Chmiel, J. D.; Vorce, S. P.; Magluilo, J., Jr.; Levine, B.; Ramos, G.; Bosy, T. Z. Analysis of Parent Synthetic Cannabinoids in Blood and Urinary Metabolites by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of analytical toxicology* **2016**, *40* (3), 173-186.
188. Spinelli, E.; Barnes, A. J.; Young, S.; Castaneto, M. S.; Martin, T. M.; Klette, K. L.; Huestis, M. A. Performance characteristics of an ELISA screening assay for urinary synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis* **2015**, *7* (6), 467-474.
189. Arntson, A.; Ofsa, B.; Lancaster, D.; Simon, J. R.; McMullin, M.; Logan, B. Validation of a novel immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids and metabolites in urine specimens. *Journal of Analytical Toxicology* **2013**, *37* (5), 284-290.
190. Benchikh, E.; Fitzgerald, P.; Lowry, P.; McConnell, I. Immunoassay for cyclopropylindole based synthetic cannabinoids, metabolites and derivatives thereof. European patent 2 781 527 A1, Sept 24, 2014.
191. Mohr, A. L.; Ofsa, B.; Keil, A. M.; Simon, J. R.; McMullin, M.; Logan, B. K. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of use of the synthetic cannabinoid agonists UR-144 and XLR-11 in human urine. *Journal of analytical toxicology* **2014**, *38* (7), 427-431.
192. Fitzgerald, P.; Lowry, P.; McConnell, I.; Benchikh, E. Detection of indazole synthetic cannabinoids. European Patent 2 998 743 A2, March 23, 2016.
193. Barnes, A. J.; Young, S.; Spinelli, E.; Martin, T. M.; Klette, K. L.; Huestis, M. A. Evaluation of a homogenous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. *Forensic Science International* **2014**, *241*, 27-34.
194. Franz, F.; Angerer, V.; Jechle, H.; Pegoro, M.; Ertl, H.; Weinfurter, G.; Janele, D.; Schlogl, C.; Friedl, M.; Gerl, S.; Mielke, R.; Zehnle, R.; Wagner, M.; Moosmann, B.; Auwarter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids - an evaluation of the diagnostic efficiency. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **2017**, *55* (9), 1375-1384.
195. Skerritt, J. H.; Guihot, S. L.; McDonald, S. E.; Culvenor, R. A. Development of immunoassays for tyramine and tryptamine toxins of *Phalaris aquatica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48* (1), 27-32.

196. Yamaguchi, M.; Saito, T.; Horiguchi, Y.; Ogawa, K.; Tsuchiya, Y.; Hishinuma, K.; Chikuma, T.; Makino, Y.; Hojo, H. Preparation of Monoclonal Antibodies Reactive to a Hallucinogenic Drug, Psilocin. *Journal of Health Science* **2004**, 50 (6), 600-604.
197. Petrie, M.; Lynch, K. L.; Ekins, S.; Chang, J. S.; Goetz, R. J.; Wu, A. H.; Krasowski, M. D. Cross-reactivity studies and predictive modeling of "Bath Salts" and other amphetamine-type stimulants with amphetamine screening immunoassays. *Clinical Toxicology (Phila)* **2013**, 51 (2), 83-91.
198. Kneisel, S.; Speck, M.; Moosmann, B.; Corneillie, T. M.; Butlin, N. G.; Auwarter, V. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405 (14), 4691-4706.
199. Fitzgerald, S. P.; McConnell, I. R.; Innocenzi, P. J.; Benchikh, E.; Lowry, P. A. Detection of synthetic cannabinoids. US Patent 2013/0066053 A1, March 14, 2013.
200. Rodrigues, W. C.; Catbagan, P.; Rana, S.; Wang, G.; Moore, C. Detection of Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid Using ELISA and LC-MS-MS. *Journal of analytical toxicology* **2013**, 37 (8), 526-533.
201. Leuvers, J. H.; Thal, P. J.; Van der Waart, M.; Schuurs, A. H. A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin. *Journal of immunological methods* **1981**, 45 (2), 183-194.
202. de la Escosura-Muniz, A.; Parolo, C.; Merkoci, A. Immunosensing using nanoparticles. *Mater Today* **2010**, 13 (7-8), 17-27.
203. Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; van Amerongen, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393 (2), 569-582.
204. Goldman, E. R.; Clapp, A. R.; Anderson, G. P.; Uyeda, H. T.; Mauro, J. M.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Analytical Chemistry* **2004**, 76 (3), 684-688.
205. Tanaka, R.; Yuhi, T.; Nagatani, N.; Endo, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Tamiya, E. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 385 (8), 1414-1420.
206. Gual, F.; Shahreza, S.; Walterscheid, J. P.; Chen, H. H.; Arndt, C.; Kelly, A. T.; Mozayani, A. Validation of LC-TOF-MS screening for drugs, metabolites, and collateral compounds in forensic toxicology specimens. *Journal of analytical toxicology* **2013**, 37 (1), 17-24.
207. Kronstrand, R.; Brinkhagen, L.; Birath-Karlsson, C.; Roman, M.; Josefsson, M. LC-QTOF-MS as a superior strategy to immunoassay for the comprehensive analysis of synthetic cannabinoids in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, 406 (15), 3599-3609.
208. Castaneto, M. S.; Wohlfarth, A.; Desrosiers, N. A.; Hartman, R. L.; Gorelick, D. A.; Huestis, M. A. Synthetic cannabinoids pharmacokinetics and detection methods in biological matrices. *Drug Metabolism Reviews* **2015**, 47 (2), 124-174.
209. Richeval, C.; Dumestre-Toulet, V.; Wiart, J. F.; Vanhoye, X.; Humbert, L.; Nachon-Phanithavong, M.; Allorge, D.; Gaulier, J. M. New psychoactive substances in oral fluid of drivers around a music festival in south-west France in 2017. *Forensic Science International* **2019**, 297, 265-269.
210. Yatsimirskaya, E. A.; Gavrilova, E. M.; Egorov, A. M.; Levashov, A. V. Preparation of conjugates of progesterone with bovine serum albumin in the reversed micellar medium. *Steroids* **1993**, 58 (11), 547-550.
211. Wengatz, I.; Schmid, R. D.; Kreißig, S.; Wittmann, C.; Hock, B.; Ingendoh, A.; Hillenkamp, F. Determination of the Hapten Density of Immuno-Conjugates by Matrix-Assisted UV Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Letters* **1992**, 25 (11), 1983-1997.
212. Žlebčíková, E. Charakterizace polyklonálních protilátek proti syntetickým kanabinoidům a jejich využití pro vývoj enzymové imunoanalýzy. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2016.
213. Pokorná, M. Vývoj diagnostického proužku LFIA pro rychlou detekci nových syntetických drog. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2017.
214. Baubínová, B. Charakterizace protilátek pro detekci syntetického kanabinoidu AM-1220. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2018.
215. Mužíková, Š. Imunochemická detekce syntetických kanabinoidů. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2018.

216. Španková, D. Vývoj multianalytové ELISA pro detekci vybraných syntetických drog. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2018.
217. Bicanová, Š. Komponenty imunochemických souprav pro detekci syntetických kanabinoidů. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2015.
218. Šuláková, A. Imunoreaktivní deriváty nových syntetických drog. Disertační práce, VŠCHT Praha, 2019.
219. Maryška, M. Komponenty imunochemických souprav pro detekci syntetických derivátů tryptaminů. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2014.
220. de Boer, D.; Bosman, I. A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. *Pharmacy World Science* **2004**, 26 (2), 110-113.
221. Bártová, K. Komponenty imunochemických souprav pro detekci syntetických derivátů fenylethylaminu. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2014.
222. Sulakova, A.; Fojtikova, L.; Holubova, B.; Bartova, K.; Lapcik, O.; Kuchar, M. Two immunoassays for the detection of 2C-B and related hallucinogenic phenethylamines. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **2019**, 95, 36-46.
223. Halberstadt, A. L. Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens. *Behavioural Brain Research* **2015**, 277, 99-120.
224. Lancaster, M. A.; Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **2014**, 345 (6194), 1247125.
225. Prochazkova, L.; Lippelt, D. P.; Colzato, L. S.; Kuchar, M.; Sjoerds, Z.; Hommel, B. Exploring the effect of microdosing psychedelics on creativity in an open-label natural setting. *Psychopharmacology (Berl)* **2018**, 235 (12), 3401-3413.
226. Stark, T.; Ruda-Kucerova, J.; Iannotti, F. A.; D'Addario, C.; Di Marco, R.; Pekarik, V.; Drazanova, E.; Piscitelli, F.; Bari, M.; Babinska, Z.; Giurdanella, G.; Di Bartolomeo, M.; Salomone, S.; Sulcova, A.; Maccarrone, M.; Wotjak, C. T.; Starcuk, Z., Jr.; Drago, F.; Mechoulam, R.; Di Marzo, V.; Mical, V. Peripubertal cannabidiol treatment rescues behavioral and neurochemical abnormalities in the MAM model of schizophrenia. *Neuropharmacology* **2019**, 146, 212-221.
227. Palmer-Brown, W.; Miranda-CasoLuengo, R.; Wolfe, K. H.; Byrne, K. P.; Murphy, C. D. The CYPome of the model xenobiotic-biotransforming fungus *Cunninghamella elegans*. *Scientific Reports* **2019**, 9 (1), 9240-9249.

12 Seznam příloh a přílohy

Tato habilitační práce se opírá o původní vědecké články v impaktovaných časopisech, přijatých patentech, užitečných vzorech a funkčních vzorcích. Publikace a výsledky s ochranou duševního vlastnictví jsou přiloženy v následujícím pořadí:

Příloha 1

Nemeskalova, A.; Bursova, M.; Sykora, D.; Kuchar, M.; Cabala, R.; Hlozek, T. Salting out assisted liquid-liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2019**, 172, 42-49.

Příloha 2

Sichova, K.; Pinterova, N.; Zidkova, M.; Horsley, R. R.; Lhotkova, E.; Stefkova, K.; Vejmla, C.; Uttl, L.; Balikova, M.; Kuchar, M.; Palenicek T. Mephedrone (4-Methylmethcathinone): acute Behavioral effects, hyperthermic, and Pharmacokinetic Profile in rats. *Frontiers in Psychiatry* **2018**, 8, 306-317.

Příloha 3

Stefkova, K.; Zidkova, M.; Horsley, R. R.; Pinterova, N.; Sichova, K.; Uttl, L.; Lhotkova, E.; Balikova, M.; Danda, H.; Kuchar, M.; Palenicek T. Pharmacokinetic, Ambulatory, and Hyperthermic Effects of 3,4-Methylenedioxy-N-Methylcathinone (Methylone) in Rats. *Frontiers in Psychiatry* **2017**, 8, 232-233.

Příloha 4

Horsley, R.R; Lhotkova, E.; Hajkova, K.; Feriančíková, B.; Himl, M.; Kuchar, M.; Palenicek, T. Behavioural, pharmacokinetic, metabolic and hyperthermic profile of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) in the Wistar rat. *Frontiers in Psychiatry* **2018**, 9, 144-157.

Příloha 5

Hlozek, T.; Uttl, L.; Kaderabek, L.; Balikova, M.; Lhotkova, E.; Horsley, R.R.; Novakova, P.; Sichova, K.; Stefkova, K.; Tyls, F.; Kuchar, M.; Palenicek, T. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC plus CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *European Neuropsychopharmacology* **2017**, 27 (12) 1223-1237.

Příloha 6

Uttl, L.; Szczurowska, E.; Hájková, K.; Horsley, R. R.; Štefková, K.; Hložek, T.; Šíchová, K.; Balíková, M.; Kuchař, M.; Micale, V.; Páleníček, T. Behavioral and Pharmacokinetic Profile of Indole-Derived Synthetic Cannabinoids JWH-073 and JWH-210 as Compared to the Phytocannabinoid Δ⁹-THC in Rats. *Frontiers in Neuroscience* **2018**, 12, 703-713.

Příloha 7

Jurasek. B.; Himl, M.; Jurok, R.; Hajkova, K.; Vobinusikova, A.; Rezanka, P.; Kuchar., M. Synthesis of methoxetamine, its metabolites and deuterium labelled analog as analytical standards and their HPLC and chiral capillary electrophoresis separation. *RSC Advances* **2017**, 7 (89) 56691-56696.

Příloha 8

Hajkova, K.; Jurasek, B.; Sykora, D.; Palenicek, T.; Miksatkova, P.; Kuchar, M. Salting-out-assisted liquid-liquid extraction as a suitable approach for determination of methoxetamine in large sets of tissue samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, 408 (4), 1171-1181.

Příloha 9

Horsley, R. R.; Lhotkova, E.; Hajkova, K.; Jurasek, B.; Kuchar, M.; Palenicek, T. Detailed pharmacological evaluation of methoxetamine (MXE), a novel psychoactive ketamine analogue-Behavioural, pharmacokinetic and metabolic studies in the Wistar rat. *Brain Research Bulletin* **2016**, 126, 102-110.

Příloha 10

Jurasek, B.; Kralik, F.; Rimpelová, S.; Cejka, J.; Setnička, V.; Ruml, T.; Kuchar, M.; Kohout, M. Synthesis, absolute configuration and in vitro cytotoxicity of deschloroketamine enantiomers: Rediscovered and abused dissociative anaesthetic. *New Journal of Chemistry* **2018**, 42 (24), 19360-19368.

Příloha 11

Hajkova, K.; Jurasek, B.; Cejka, J.; Stefkova, K.; Palenicek, T.; Sykora, D.; Kuchar, M. Synthesis and identification of deschloroketamine metabolites in rats' urine and a quantification method for deschloroketamine and metabolites in rats' serum and brain tissue using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* **2020**, 1-18.

Příloha 12

Prochazkova, L.; Lippelt, D. P.; Colzato, L. S.; Kuchar, M.; Sjoerds, Z.; Hommel, B. Exploring the effect of microdosing psychedelics on creativity in an open-label natural setting. *Psychopharmacology (Berl)* **2018**, 235 (12), 3401-3413.

Příloha 13

Uthaug, M. V.; Lancelotta, R.; van Oorsouw, K.; Kuypers, K. P. C.; Mason, N.; Rak, J.; Sulakova, A.; Jurok, R.; Maryska, M.; Kuchar, M.; Palenicek, T.; Riba, J.; Ramaekers, J. G. A single inhalation of vapor from dried toad secretion containing 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) in a naturalistic setting is related to sustained enhancement of satisfaction with life, mindfulness-related capacities, and a decrement of psychopathological symptoms. *Psychopharmacology (Berl)* **2019**, 236 (9), 2653-2666.

Příloha 14

Wolrab, D.; Fruhauf, P.; Moulisova, A.; Kuchar, M.; Gerner, C.; Lindner, W.; Kohout, M. Chiral separation of new designer drugs (Cathinones) on chiral ion-exchange type stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, 120, 306-315.

Příloha 15

Řezanková, K.; Kohoutová, R.; Kuchař, M.; Král, V.; Řezanka, P. Enantioseparation of novel psychoactive chiral amines and their mixture by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. *Chemical Papers* **2018**, 72 (11), 2737-2743.

Příloha 16

Spálovská, D.; Králík, F.; Kohout, M.; Jurásek, B.; Habartová, L.; Kuchař, M.; Setnička, V. Structure Determination of Butylone as a New Psychoactive Substance Using Chiroptical and Vibrational Spectroscopies. *Chirality* **2018**, 30, 548-559.

Příloha 17

Spalovska, D.; Marikova, T.; Kohout, M.; Kralik, F.; Kuchar, M.; Setnicka, V. Methylone and pentylone: structural analysis of new psychoactive substances. *Forensic Toxicology* **2019**, 37 (2), 366-377.

Příloha 18

Jurasek, B.; Bartunek, V.; Huber, S.; Kuchar, M. X-Ray powder diffraction - A non-destructive and versatile approach for the identification of new psychoactive substances, *Talanta*, **2019**, 195, 414-418.

Příloha 19

Kuchař, M.; Šuláková, A.; Fojtíková, L.; Lapčík, O. Derivát syntetického kanabinoidu, způsob jeho přípravy a použití. CZ Patentový spis č. 305780, PV 2014-985 (Datum udělení patentu: 27. 01. 2016, Datum publikace patentu: 09. 03. 2016)

Příloha 20

Kuchař, M.; Šuláková, A.; Fojtíková, L.; Lapčík, O., Holubová, B. Derivát syntetického kanabinoidu, způsob přípravy a použití. CZ Patentový spis č. 306547, PV 2015-657 (Datum udělení patentu: 9. 03. 2016, Datum publikace patentu: 01. 03. 2017)

Příloha 21

Fojtikova, L.; Sulakova, A.; Blazkova, M.; Holubova, B.; Kuchar, M.; Miksatkova, P.; Lapcik, O.; Fukal, L. Lateral flow immunoassay and enzyme linked immunosorbent assay as effective immunomethods for the detection of synthetic cannabinoid JWH-200 based on the newly synthesized hapten. *Toxicology Reports* **2018**, 5, 65-75.

Příloha 22

Funkční vzorky

Certifikovány společností Lloyd's Quality Assurance Limited

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog ze slin - JWH-200, RIV/60461373:22330/15:43901560

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog z moči- dimethyltryptamin (DMT), RIV/60461373:22330/15:43901554

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog ze slin - dimethyltryptamin (DMT), RIV/60461373:22330/15:43901557

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog z moči - 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamin (5-MeO-DMT), RIV/60461373:22330/15:43901558

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog ze slin - 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamin (5-MeO-DMT), RIV/60461373:22330/15:43901559

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog ze slin - JWH-200, RIV/60461373:22330/15:43901560

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog ze slin - diisopropyltryptamin (DiPT), RIV/60461373:22330/15:43901561

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog z moči - diisopropyltryptamin (DiPT), RIV/60461373:22330/15:43901562

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog ze slin - 4-brom-2,5-dimethoxyfenylethylamin (2-CB), RIV/60461373:22330/15:43901563

Kuchař, M.; Pravečková, M.; Fojtíková, L.; Šuláková, A.; Maryška, M.; Lapčík, O. Rychlý imunochemický test k detekci nových syntetických drog z moči - 4-brom-2,5-dimethoxyfenylethylamin (2-CB), RIV/60461373:22330/15:43901564

Příloha 23

Kuchař, M.; Šuláková, A.; Fojtíková, L.; Lapčík, O.; Maryška, M. Imunochromatografický test syntetických kanabinoidů. CZ Užitný vzor 28908 (Datum zápisu: 30. 11. 2015, Datum zveřejnění zápisu: 9. 12. 2015)

Příloha 24

Kuchař, M.; Šuláková, A.; Fojtíková, L.; Lapčík, O.; Maryška, M.; Holubová, B. Použití derivátu tryptaminu. CZ Patentový spis č. 307719, PV 2015-962 (Datum udělení patentu: 6. 02. 2019, Datum publikace patentu: 20. 03. 2019)

Příloha 25

Kuchař, M.; Šuláková, A.; Fojtíková, L.; Lapčík, O.; Maryška, M. Imunochromatografický test dimethyltryptaminových drog. CZ Užitný vzor 28938 (Datum zápisu: 07. 12. 2015, Datum zveřejnění zápisu: 16. 12. 2015)

Příloha 26

Sulakova, A.; Fojtikova, L.; Holubova, B.; Bartova, K.; Lapcik, O.; Kuchar, M. Two immunoassays for the detection of 2C-B and related hallucinogenic phenethylamines. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2019**, 95, 36-46.