

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vývoj metody plynové chromatografie s hmotnostní
spektrometrií pro průkaz vybraných kationů v biologickém
materiálu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Barbora Jančálková**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Zuzana Birkáš**
Termín odevzdání práce: 2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Barbora Jančálková
Název práce	Vývoj metody plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií pro průkaz vybraných katinonů v biologickém materiálu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoře AGEL a.s. Nový Jičín
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Birkáš
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Tato práce se zabývá vývojem metody pro průkaz katinonů v biologickém materiálu. V teoretické části je uvedena charakteristika katinonů, jsou popsány jejich jednotlivé deriváty (methkatinon, mefedron, pyrovaleron, butylon) a analytické metody jejich identifikace a stanovení. Pro průkaz katinonů byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Jako vhodné derivatizační činidlo se osvědčil pentafluorobenzoylchlorid.
Klíčová slova	Katinon, methkatinon, mefedron, pyrovaleron, butylon, plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
Počet stran	39
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Barbora Jančálková
Title of thesis	The development of a gas chromatography mass spectrometry method for the determination of selected cathinones in biological samples
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory AGEL a.s. Nový Jičín
Supervisor	Mgr. Zuzana Birkáš
The year of presentation	2018
Abstract	<p>The thesis describes the development of a method of cathinones determination in biological samples. Theoretical part describes the characteristics of cathinones, their individual derivatives (methcathinone, mephedrone, pyrovalerone, butylone) and analytical methods of their identification and determination. For identification of cathinones, gas chromatography mass spectrometry was used. Pentafluorobenzoylchloride has been proven as a suitable derivatizing agent.</p>
Keywords	Cathinone, methcathinone, mephedrone, pyrovalerone, butylone, gas chromatography mass spectrometry
Number of pages	39
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Zuzaně Birkáš za odbornou pomoc, vstřícnost, připomínky při vypracovávání mé bakalářské práce a čas strávený se mnou v laboratoři. Poděkování patří také kolektivu laboratoře Úseku instrumentálních metod Laboratoře AGEL a.s., v Novém Jičíně za spolupráci a příjemné prostředí.

OBSAH

	SEZNAM ZKRATEK	8
1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Historie kathinonů	10
2.2	Kathinony	10
2.2.1	Methkathinon	13
2.2.2	Mefedron	13
2.2.3	Pyrovaleron	14
2.2.4	Butylon	15
2.3	Incidence a prevalence	16
2.4	Metody analýzy kathinonů	16
2.4.1	Imunochemické metody	17
2.4.2	Chromatografické metody	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Použitý materiál a přístroje	19
3.1.1	Biologický materiál	19
3.1.2	Chemikálie	19
3.1.3	Ostatní materiál	20
3.1.4	Přístrojové vybavení	20
3.2	Příprava vzorků	20
3.2.1	Příprava vzorků metodou extrakce do kapaliny	20
3.2.2	Příprava vzorků metodou extrakce na pevné fázi	21
3.3	Optimalizace podmínek GC-MS	21
3.3.1	Optimální parametry GC	21
3.3.2	Optimální parametry MS	22
3.4	Optimalizace derivatizačního postupu	22
4	VÝSLEDKY	23
4.1	Ověření screeningových metod	23
4.2	Optimalizace GC-MS podmínek	25
4.3	Selektivita metody	31
4.4	Ověření pracovního rozsahu metody	32
5	DISKUSE	36

6	ZÁVĚR	37
7	POUŽITÁ LITERATURA	38

SEZNAM ZKRATEK

BSTFA + TMCS	N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid + trimethylchlorosilan
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HFBA	Heptafluorobutyrová kyselina
HPLC-DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IS	Interní standard
LC	Kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS-ESI	Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
PFBCl	Pentafluorobenzoylchlorid
PFPA	Pentafluoropropanová kyselina
TFAA	Trifluoroctová kyselina
TGA	Termogravimetrická analýza

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Syntetické katinony tvoří skupinu nových drog, na evropském nelegálním trhu se objevily v roce 2005 a nyní je známo více než 80 syntetických derivátů katinonů. Chemickými strukturami se podobají amfetaminům, tudíž mají i analogické psychostimulační účinky. Častým užíváním dochází k nežádoucím účinkům, jako jsou srdeční, psychické, neurologické obtíže a závislost.

Zneužívání syntetických katinonů rapidně roste, prodávají se pod názvem rostlinné hnojivo či soli do koupele, ve světě dominuje užívání mefedronu, methkatinonu, pyrovaleronu a butylonu. Ke stále nově objevujícím se psychoaktivním sloučeninám, jsou v toxikologii nutnou součástí analytické metody pro účinnou a rychlou identifikaci těchto látek. Citlivou instrumentální metodu pro analýzu syntetických katinonů představuje plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Tato metoda je nezbytná v toxikologii pro identifikaci a stanovení těkavých psychoaktivních látek a její výhodou je její robustnost.

Cílem mé práce je vyvinout a ověřit novou a robustní metodu pomocí GC-MS, která umožní průkaz vybraných syntetických katinonů (butylon, ethylkatinon, ethylon, mefedron, methkatinon a pyrovaleron) v biologickém materiálu (moč). Metoda byla zavedena v laboratoři klinické biochemie na Úseku instrumentálních metod Laboratoře AGEL a.s., v Novém Jičíně.

Teoretická část je zaměřena na toxikologické vlastnosti a charakteristické rysy studovaných katinonů, dále na stručný přehled vývoje kvalitativních i kvantitativních metod v biologickém materiálu.

V experimentální části je provedena extrakce vzorků a derivatizace jednotlivých analytů s následnou optimalizací GC a MS parametrů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie kathinonů

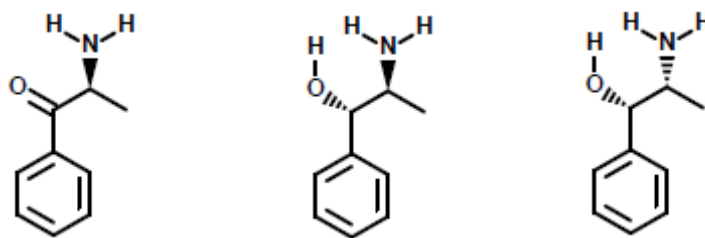
Kathinon je přirozeně se vyskytující stimulant, objevený v rostlině khat. Jedná se o biologický aktivní alkaloid s psychoaktivními vlastnostmi (Majchrzak et al., 2018). První poznatky o užití khat se datují ve 14. století. Počátky pěstování těchto keřů pochází z Arabského poloostrova a z oblastí východní Afriky. Čerstvé listy keře khat jsou žvýkány nebo připravovány jako čaj pro jejich centrální stimulační účinky (DE Felice et al., 2014). Žvýkání čerstvých khatových listů je považováno za záležitost kultury a místní tradice. (Majchrzak et al., 2018).

V roce 1930 byl z khatové rostliny izolován kathin, u kterého se zjistilo, že je mírný centrální stimulant. Následující výzkumy vedly ke zjištění, že khat může obsahovat i další stimulační sloučeniny. Pracovní skupina OSN v roce 1975 izolovala látku z čerstvých listů khat a nazvala ji kathinon. Termín kathinon byl vyhrazen pro přirozeně se vyskytující (*S*)-kathinon, v současné době se pojem kathinon vztahuje na racemát (DE Felice et al., 2014).

Ve třetím desetiletí dvacátého století byly první syntetické deriváty kathinonů syntetizovány pro léčebné účely, vzhledem k jejich účinkům na centrální nervový systém. Během posledních patnácti let se deriváty kathinonů objevily na nelegálním trhu a postupně se stávaly dostupnější i přes internet, jako bílé nebo barevné krystalické prášky, tablety či kapsle pod názvem rostlinné hnojivo nebo koupelové soli (Majchrzak et al., 2018).

2.2 Kathinony

Khat (*Catha edulis*) je psychostimulantní rostlina vyskytující se v divoké přírodě, nebo je komerčně pěstována v Africe a Jemenu. Patří do čeledi *Celastraceae*. Mezi hlavní aktivní složky khat patří kathinon, katin, a norefedrin (Obr. 1), které jsou strukturně blízké s amfetaminem a noradrenalinem. Průměrně 100 g čerstvého listu obsahuje 36 mg kathinonu, 120 mg katinu a 8 mg norefedrinu, přičemž kathinon má nejsilnější stimulační účinky (Alfaifi et al., 2017).



Obr. 1. Strukturní vzorec katinonu, katinu a norefedrinu.

Kathinon se systematickým názvem 2-amino-1-fenylpropan-1-on je přirozeně se vyskytující β -ketonový analog amfetaminu a slouží k syntéze dalších derivátů katinonů (Baumann et al., 2012). Farmakologické vlastnosti derivátů mohou být podobné amfetaminu, který má schopnost inhibovat serotonin s následnými psychoaktivními účinky. Od konce dvacátých let 20. století dochází k syntéze derivátů katinonů a některé jsou zkoumány k léčebným účelům. Derivát bupropion je cyklonem substituovaný kathinon, má antidepresivní účinky a slouží k odvykání kouření. Nyní je jediným derivátem katinonů, který má v USA a v Evropě zdravotní indikaci. K léčbě chronické únavy, letargie a obezity byl podáván lék na předpis zvaný pyrovaleron, pro zneužívání a závislost na uživateli byl lék stažen (Prosser a Nelson, 2012).

Od přirozeného katinonu lze odvodit všechny jeho syntetické fenylalkylaminové deriváty, které jsou strukturně podobné molekule amfetaminu. Syntetické katinony mají karbonylovou skupinu v poloze α bočního řetězce, který sousedí s aromatickým kruhem.

Deriváty katinonů lze dělit do čtyř skupin. Do první skupiny se řadí *N*-alkylované sloučeniny nebo sloučeniny s alkylovým nebo halogenovým substituentem v libovolné poloze aromatického kruhu (ethkathinon, efedron, mefedron, flephedron, buphedron a pentedron). Ve druhé skupině jsou methyldioxysubstituované sloučeniny se substituenty v libovolné poloze aromatického kruhu (metylon, pentylon, etylon a butylon). Třetí skupina zahrnuje analogy přírodního katinonu s *N*-pyrrolidinylovým substituentem (pyrovaleron). Čtvrtou skupinou jsou sloučeniny methyldioxyl a také *N*-pyrrolidinylové substituenty (3,4-methyldioxypyrovaleron (MDPV)).

Kathinony dobře pronikají přes hematoencefalickou bariéru, tím se zvýší koncentrace katecholaminů v mezisynaptických prostorech a následkem jsou silnější stimulační a sympatomimetické účinky na centrální nervový systém než účinky amfetaminu. Odlišné účinnosti katinonů jsou dány existencí dvou stereoizomerních

forem. Vzhledem ke schopnosti syntetických kathinonů uvolňovat nebo inhibovat zpětné vychytávání dopaminu, noradrenalinu a serotoninu se rozdělují do tří skupin. První skupinu kathinonů tvoří látky s účinkem podobným kokainu a 3,4-methylendioxyamfetamin (MDMA). Mechanismus působení spočívá v neselektivní inhibici serotoninu, dopaminu a noradrenalinu. Do této skupiny patří mefedron, metylon, etylon, butylon a nafyron. Druhá skupina má podobný biologický účinek jako amfetamin. Zde dochází k inhibici zpětného vychytávání katecholaminů a uvolňování dopaminu. Do této skupiny se řadí methkathinon, flephedron a clephedron. Třetí skupinu tvoří syntetické kathinony, které indukují neurotransmisi. Typickým zástupcem je pyrovaleron. Sloučeniny MDPV a 1-(3,4-methylendioxyfenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)-1-butanon (MDPBP) jsou selektivní inhibitory zpětného vychytávání katecholaminů a neprokazují efekt uvolňování neurotransmitery (Majchrzak et al., 2018).

Kathinony jsou slabé báze a vzhledem k nízké molekulové hmotnosti se mohou vyskytovat ve tkáních a biologických tekutinách (krev a moč), jejíž pH je nižší než krev. Nalezeny byly také v potu, perorální tekutině a ve vlasech (Mohamed et al., 2017).

Způsoby podávání kathinonů do organismu jsou perorálně (kapsle, tablety nebo prášek zabalený v cigaretovém papíru), rektálně, nasální insuflací, intravenózně, subkutánní a intramuskulární injekcí (Kuš et al., 2017). Při jejich užívání dochází k hypertenzi a tachykardii důsledkem sympatomimetické aktivity kathinonů. Vzestupem krevního tlaku a srdeční frekvence paralelně roste i hladina kathinonů v krevní plazmě. Kathinon je nepřímě působící sympatomimetikum, který při dopaminergních a serotonergních synapsích uvolňuje katecholaminy na periferních úložištích. Žvýkání khatu vede ke zvýšenému diastolickému krevnímu tlaku, na systolický krevní tlak nemá vliv. Kathinony způsobují těžké koronární vazokonstrikce a tyto koronární spasmy přispívají k rozvoji akutního infarktu myokardu. A také mají vliv na vývojové vrozené srdeční vady (El-Menyar et al., 2015).

Užívání přírodního khatu vyvolává euforické účinky, zvyšuje bdělost a snižuje fyzickou únavu (Ketema et al., 2015). Zlepšuje paměť, zmírňuje bolesti hlavy, zlepšuje depresi a má afrodiziacké účinky. Mezi nežádoucí účinky užívání khat, které souvisejí s centrálním nervovým systémem, jsou zvýšené stavy paranoie, agrese, halucinace a závislosti na užití (Mohan et al., 2016).

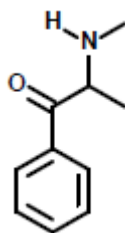
2.2.1 Methkathinon

Methkathinon je β -ketonový analog metamfetaminu (Obr. 2), působí při uvolňování dopaminu, noradrenalinu a serotoninu. Jde o výchozí sloučeninu pro výrobu mefedronu a flephedronu (Suyama et al., 2016).

Methkathinon je syntetizován oxidací manganistanu draselného v přítomnosti kyseliny octové, efedrinu a pseudoefedrinu. Při intravenózní aplikaci je jedinec vystaven vysoké dávce manganu, protože methkathinon není izolován v čisté formě. U jedince se vyvíjejí neurologické poruchy, jako jsou hypokinézy, dysartrie, dystonie a posturální nestabilita (Stepens et al., 2010). Při intravenózním zneužívání methkathinonu a hromadění manganu v krvi, má za následek změny struktury a funkce šedé hmoty mozkové. Dochází k těžkým a trvalým pohybovým poruchám (Juurmaa et al., 2016).

Do skupiny psychoaktivních substituovaných methkathinonů jsou zahrnuty tyto látky: butylon, 4-fluorometakathinon, mefedron, metylon, nafyron a MDPV. Butylon, metylon a MDPV obsahují 3,4-methylendioxy skupinu. Mefedron a 4-fluorometakathinon mají oproti methkathinonu na fenylovém kruhu navíc metyl, resp. fluor.

Mezi nežádoucí účinky psychoaktivní substituované sloučeniny patří srdeční komplikace, úzkost, psychóza a halucinace. (Eshleman et al., 2013).



Obr. 2. Strukturní vzorec methkathinonu.

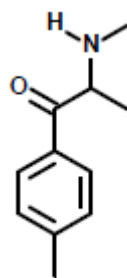
2.2.2 Mefedron

Mefedron neboli 4-methylmethkathinon je substituovaný kathinonový homolog efedrinu (Obr. 3). Vyskytuje se jako bílý, žlutý, béžový nebo hnědý prášek rozpustný ve vodě. Patří mezi látky způsobující závislost, na trhu se objevuje pod názvem Meow Meow, Bubbles nebo Mef (Hassan, 2017).

Mefedron se metabolizuje *N*-demetylací na bazické aminy, následuje redukce ketonové funkční skupiny na 4-methylnorefedrin a hydroxylace methylového substituentu aromatického kruhu, což vede k jeho konečné oxidaci na příslušné karboxylové kyseliny (Majchrzak, 2018).

Do organismu se vpravuje perorálně, intranasálně, intramuskulárně, intravenózně nebo rektálně. Účinky nástupu a délky trvání jsou různé, záleží na typu podání. Při intranasálním podání je psychoaktivní účinek vyvolaný do několika minut, s délkou trvání jedné hodiny. Rychlý nástup a dlouhotrvající efekt je dosažen nasální insuflací s opakovaným perorálním užitím.

Účinky mefedronu způsobují pocit intenzivní euforie a pohody, zvýšené sebevědomí, sníženou únavu, zvýšenou ostražitost a koncentraci. Při vysoké dávce nebo chronické spotřebě mefedronu se objevuje tachykardie, hypertenze, arytmie, bolesti na hrudi, rozšíření zornic, bolesti hlavy, nevolnost, rhabdomyolýza a může dojít k renálnímu selhání. Při závislosti s intravenózní aplikací dochází k lokalizovaným infekcím kůže až k nekrotám v místě vpichu. Mefedron ovlivňuje rovněž psychiku a chování jedince, navozuje úzkost, depresi, halucinace, bludy a agresivní chování. Nebezpečným vedlejším účinkem s následnou smrtí je hyponátemie, která je pravděpodobně vyvolána kombinací pocení, ztráty elektrolytů a sníženou sekrecí antidiuretického hormonu (Hassan, 2017).



Obr. 3. Strukturální vzorec mefedronu.

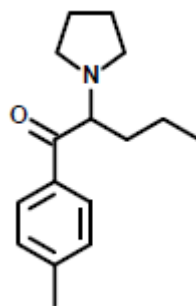
2.2.3 Pyrovaleron

Pyrovaleron, 1-(4-methylfenyl)-2-pyrrolidin-1-ylpentat-1-on (Obr. 4), je účinný a selektivní inhibitor dopaminového a noradrenalinového transporteru, nevyvolává uvolňování monoaminů (Simmler et al., 2013).

Mezi inhibiční účinky pyrovaleronu patří zpětné vychytávání noradrenalinu a dopaminu. Pokud jde o chiralitu, (*S*)-enantiomer je více biologicky aktivní než (*R*)- enantiomer. Nejvyšší koncentrace dané látky je v játrech a v ledvinách, naopak nejnižší koncentrace je v mozku (Prosser a Nelson, 2012).

Pyrovaleron se strukturně podobá s bupropionem, ale má vyšší vazebnou afinitu v dopaminovém transportéru. Bupropion je lék nacházející se na trhu k odvykání kouření pod názvem Zyban, nebo jako antidepresivum, Wellbutrin (Lapinsky et al., 2009).

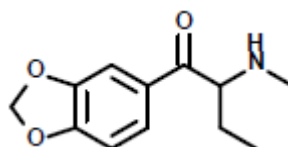
Výsledkem studií bylo zjištěno, že pyrovaleron snižuje příznaky chronické únavy u lidí. (Meltzer et al., 2006)



Obr. 4. Strukturní vzorec pyrovaleronu.

2.2.4 Butylon

Butylon neboli β -keto-*N*-methylbenzodioxolylbutanamin (β k-MBDB) (Obr. 5) patří mezi syntetické katinony, které mají psychostimulantní a sympatomimetické účinky (Watterson a Olive, 2014). Butylon inhibuje transport serotoninu, dopaminu a snižuje jejich vychytávání. Zvyšuje lokomotorickou aktivitu blokovanou dopaminergními antagonisty (Gatch et al., 2013).



Obr. 5. Strukturní vzorec butylonu.

2.3 Incidence a prevalence

Khat se řadí mezi zneužívané drogy, které jsou méně návykové než alkohol či tabák. V současné době je khat legální v Etiopii, Jemenu, Somálsku a Izraeli. V Evropě, v USA a Kanadě se zařazuje mezi zakázané látky. Podle průzkumu pravidelně užívá khat 20 milionů lidí na celém světě. V jemenské populaci je žvýkání khatu součástí kulturního zvyku. Odhaduje se, že až 90 % mužů, více než 50 % žen a 15 – 20 % dětí mladších 12-ti let jsou denními konzumenty této rostliny (El-Menyar et al., 2015).

Od roku 2007 je mefedron považován za zneužívanou drogu. Jeho popularita v Evropě do roku 2010 rychle rostla, a to v 6 % u mladistvých ve věku 15 – 24 let. Následně se tato látka dostala na stejnou úroveň užívání jako MDMA a kokain (Hassan et al., 2017).

Při průzkumu ve Velké Británii bylo zjištěno, že 41 % účastněných užívalo methedron a 10 % metylon. Při dalším průzkumu vysokoškolských studentů mladších 21 let bylo zjištěno, že mefedron alespoň jednou užilo 20 % dotazovaných a denní užívání bylo zaznamenáno u 4 % jedinců. V Irsku studie prokázala u 14 % účastněných pozitivitu na mefedron a u 3 % pozitivitu na metylon. Ve Finsku absolvovalo vyšetření krve 3000 řidičů, u kterých bylo podezření, že řídí pod vlivem drog. Analýza krve prokázala u 286 jedinců přítomnost látky MDPV (Prosser a Nelson, 2012).

V roce 2008 byla ve Švédsku hlášená první smrt způsobená intoxikací mefedronem. Následně do srpna roku 2011 bylo hlášeno ve Velké Británii 90 úmrtí, taktéž způsobené užitím mefedronu (většinou se jednalo o muže mezi 25 až 34 lety). První hlášená oběť předávkováním MDPV byla v USA roku 2012. Dívka ve věku 18-ti let zemřela po požití PV9 (1-fenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)oktan-1-onu). Po pitvě byla naměřená nejvyšší koncentrace v ledvinách, s největší pravděpodobností je látka rychle vylučována močí (Majchrzak et al., 2018).

2.4 Metody analýzy katinonů

K interpretaci výsledků analýzy je důležitá znalost toxikokinetických vlastností látek. K předběžným a poměrně rychlým analytickým testům v biologickém materiálu se používá inumoanalýza, zejména v případě, že nejsou dostupné informace o suspektní intoxikaci jedince návykovou látkou. Při vyhodnocení může dojít k falešným

výsledkům, jak pozitivním, tak negativním, důsledkem křížové reaktivity s jinou sloučeninou nebo nízkou koncentrací pod mezní hodnotu (Liakoni et al., 2018).

Identifikace psychoaktivních látek začíná použitím nescifických screeningových metod. Ke zjištění látky, která ve své molekule obsahuje atom dusíku, se nejčastěji používá test Markiskovo činidlo, obsahující kyselinu sírovou a formaldehyd. Je-li přítomnost syntetického katinonu odvozeného od mefdronu, nedochází k barevné reakci. Pozitivní výsledek nastane v případě přítomnosti methyldioxylového substituentu ve sloučenině jako je MDPV. Dalším testem je použití Chenova činidla vhodného pro deriváty efedrinu a MDPV. Toto činidlo obsahuje kyselinu octovou, sulfid měďnatý a hydroxid sodný (Majchrzak et al., 2018). Zmíněné testy se v rutinním nemocničním či laboratorním zařízení nepoužívají.

2.4.1 Imunochemické metody

Nescifický imunochromatografický rychlý test pro kvalitativní detekci několika drog v moči je za použití destičky. Její součástí jsou membránové pásky, předem potažené imobilizovaným drogovým konjugátem (antigen). Při kontaktu membránové pásky se vzorkem moče, dojde ke vztlínání protilátky kapilárou do T-místa, které udává přítomnost nebo nepřítomnost drogy. Přítomnost drogy je zjistitelná pouze při vysoké koncentraci látky v moči. Při nízké koncentraci, pod hraniční hodnotu nelze látku detekovat, proto se provádějí další analytické metody.

Jednou z imunochemických metod je kinetická interakce mikročastic v roztoku (KIMS), která umožňuje semikvantitativní stanovení relativně širokého spektra drog (např. látek ze skupiny amfetaminů) v moči. Stanovení přítomnosti látek je vyhodnoceno analyzátozem, na základě kinetické interakce mikročastic v roztoku, měřené jako změna průchodu světla v roztoku. Pokud v moči není přítomná droga, volný konjugát drogy se váže na protilátku a dochází k agregaci. S tvorbou agregátů roste absorbance. Je-li droga přítomna v moči, je vázána na protilátku a nedochází k tvorbě agregátu.

2.4.2 Chromatografické metody

K ověření pozitivního nálezu látky v moči se využívají citlivější a specifické chromatografické metody, mezi které patří kapalinová chromatografie (LC), plynová chromatografie (GC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) (Liakoni et al., 2018).

Analytické údaje o identifikaci a fyzikálně chemické charakterizaci pro deriváty kathinonů 4-fluor-PV9 (1-(4-fluorfenyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)oktan-1-on) a α -PHP (1-fenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-hexanon) jsou dostupné metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodového pole (HPLC-DAD), hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (MS-ESI) a GC-MS (Majchrzak et al., 2016).

Metodou GC-MS lze identifikovat methkathinon a mefedron v perorální tekutině za použití derivatizačního činidla pentafluoropropanové kyseliny (PFPA) (Mohamed et al., 2017).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Biologický materiál

Negativní moč (Banka Laboratoře AGEL a.s. v Novém Jičíně)

3.1.2 Chemikálie

Standardy

Butylon (Sigma-Aldrich, USA)

Ethylkathinon (Sigma-Aldrich, USA)

Ethylon (Sigma-Aldrich, USA)

Mefedron (Sigma-Aldrich, USA)

Methkathinon (Sigma-Aldrich, USA)

Pyrovaleron (Sigma-Aldrich, USA)

Izotopově značený vnitřní standard

Methkathinon-d3 (Sigma-Aldrich, USA)

Derivatizační činidla

Pentafluorobenzoylchlorid, PFBCl (Sigma-Aldrich, USA)

Pentafluoropropanová kyselina, PFPA (Sigma-Aldrich, USA)

N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid + trimethylchlorosilan, BSTFA + TMCS (Sigma-Aldrich, USA)

Pufry

0,1 M acetátový pufr, pH 4,0 (Lékárna AGEL, Nový Jičín)

0,1 M borátový pufr, pH 9,0 (Lékárna AGEL, Nový Jičín)

Ostatní chemikálie

Amoniak (Lach-Ner, Česká republika)

Cyklohexan (Lach-Ner, Česká republika)

Deionizovaná voda (Lach-Ner, Česká republika)

Methanol (Lach-Ner, Česká republika)

Triethylamin (Lach-Ner, Česká republika)

1 M vodný roztok NaOH (PENTA, Česká republika)

3.1.3 Ostatní materiál

DB-5MS (0,25 μm ; 30 m x 0,25 mm) (Agilent, USA)

SPE kolona Bond Elut Certify (Agilent, USA)

Multi-Drug Test (BIOSYNEX, Francie)

3.1.4 Příkladové vybavení

COBAS INTEGRA 400 plus (Roche, Česká republika)

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu)

Třepačka (Edmund Bühler, Německo)

Vortex (Vibromix, ČR)

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 Příprava vzorků metodou extrakce do kapaliny

Do 10 ml zábrusové zkumavky byly připraveny vzorky napipetováním 2 ml moče společně se směsí standardů (methkathinon, ethylkathinon, butylon, pyrovaleron, ethylon a mefedron) o koncentraci 0, 25, 50, 100, 250 a 500 $\mu\text{g/l}$. Poté bylo přidáno 100 μl interního standardu methkathinonu-d₃ o koncentraci 4000 $\mu\text{g/l}$, dále 0,3 ml 1 M vodného roztoku hydroxidu sodného, 4 ml cyklohexanu, 50 μl triethylaminu. Dále byly vyzkoušeny tři postupy zpracování vzorku: bez derivatizace, s derivatizačním činidlem PFBCl (10 μl 10 % cyklohexanového roztoku do připraveného vzorku), nebo s derivatizačním činidlem PFPA (10 μl do připraveného vzorku). Vzniklá směs se 5 minut protřepávala na třepačce, pak se nechala reagovat 10 minut za laboratorní teploty v uzavřené zkumavce. Následně byly odebrány 3 ml organické fáze a odpařeny za

laboratorní teploty v proudu dusíku. Odparek byl rekonstituován v 50 µl cyklohexanu. Následovala analýza GC-MS po dobu 35 minut s nástřikem 1 µl.

3.2.2 Příprava vzorků metodou extrakce na pevné fázi

Do 10 ml zábrusové zkumavky byly připraveny vzorky napipetováním 2 ml moče společně se směsí standardů (methkathinon, ethylkathinon, butylon, pyrovaleron, ethylon a mefedron) o koncentraci 0, 25, 50, 100, 250 a 500 µg/l. Poté byly přidány 4 ml 0,1 M borátového pufru (pH 9,0). Extrakce na pevné fázi byla za použití kolonky Bond Elute Certify se sorbentem C8 a SCX. Kondicionace sorbentu byla provedena napipetováním 2 ml methanolu a 2 ml 0,1 M borátového pufru o pH 9,0. Poté se aplikoval vzorek a následovalo promytí 2 ml deionizované vody, 2 ml 0,1 M acetátového pufru (pH 4,0) a 2 ml methanolu a vysušení sorbentu za plného vakua. Dalším krokem byla eluce do reakční vialky, přidáním 2 ml 2 % amoniakálního roztoku methanolu. Eluát byl odpařen pod dusíkem při teplotě 40 °C. K odparku bylo přidáno 50 µl derivatizační činidlo BSTFA + TMCS a 50 µl ethylacetátu. Poté se směs inkubovala 30 minut při 60 °C a po vychladnutí na laboratorní teplotu následovala analýza GC-MS po dobu 30 minut s nástřikem vzorku 1 µl.

3.3 Optimalizace podmínek GC-MS

3.3.1 Optimální parametry GC

Teplota na koloně	70 °C	Tlak	76,6 kPa
Teplota nástřiku	270 °C	Celkový průtok	32,9 ml/min
Nástřik bez děliče toku (splitless)		Průtok kolonou	1,20 ml/min
Sampling time	1 min	Lineární průtoková rychlost	40,8 cm/s
Objem nástřiku	1 µl	Proplachování nástřiku	10 ml/min
Analytická kolona	DB-5MS		
Nosný plyn	helium		

3.3.2 Optimální parametry MS

Teplota iontového zdroje	250 °C
Teplota rozhraní	300 °C
Solvent cut time	3 min
Napětí detektoru	3,5 kV
Threshold	300



Obr. 6. Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu).

3.4 Optimalizace derivatizačního postupu

GC-MS analýza bez derivatizace analytů je možná, nicméně derivatizace se využívá pro zlepšení chromatografických vlastností analytů, jako je například tepelná stabilita, zvýšení těkavosti, citlivosti a selektivity analyzovaných látek. Volbou vhodně zvoleného činidla (např. HFBA, PFPA, PFBCl, TFAA nebo BSTFA + TMCS) je docíleno potřebných chemických modifikací struktury sloučenin, jako je acylace, silylace nebo alkylace aminoskupin kationů. Volbou vhodné derivatizace analytů je dosaženo účinné separace a symetrie píků (Mohamed et al., 2017).

4 VÝSLEDKY

4.1 Ověření screeningových metod

K orientační identifikaci přítomnosti kationů v moči byl zvolen imunochromatografický test za použití komerčně dostupné destičky Multi-Drug Test. Tyto jednorázové screeningové testy a jejich obdoby se používají v ordinacích nemocničních a zdravotnických zařízeních, také je lze zakoupit bez předpisu v lékárně. Existují jednoscreeningové i multiscreeningové testy, které detekují nejčastěji zneužívané návykové látky (např. opiáty, kanabinoidy, amfetaminy, benzodiazepiny, barbituráty, antidepresiva aj.) Destičkový screeningový test kationů není komerčně dostupný, proto tato zkouška byla provedena vzhledem k analogické struktuře kationů a amferaminů. Pro amfetamin i metamfetamin je hraniční hodnota 1000 ng/ml. Výsledky přítomnosti kationů v moči jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1. Screening kationů pomocí destičky Multi-Drug Test.

Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	Výsledek
500	negativní
2000	negativní
4000	negativní



Obr. 7. Screening kationů v moči o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$ na destičce Multi-Drug Test.



Obr. 8. Screening kathinonů v moči o koncentraci 2000 µg/l na destičce Multi-Drug Test.



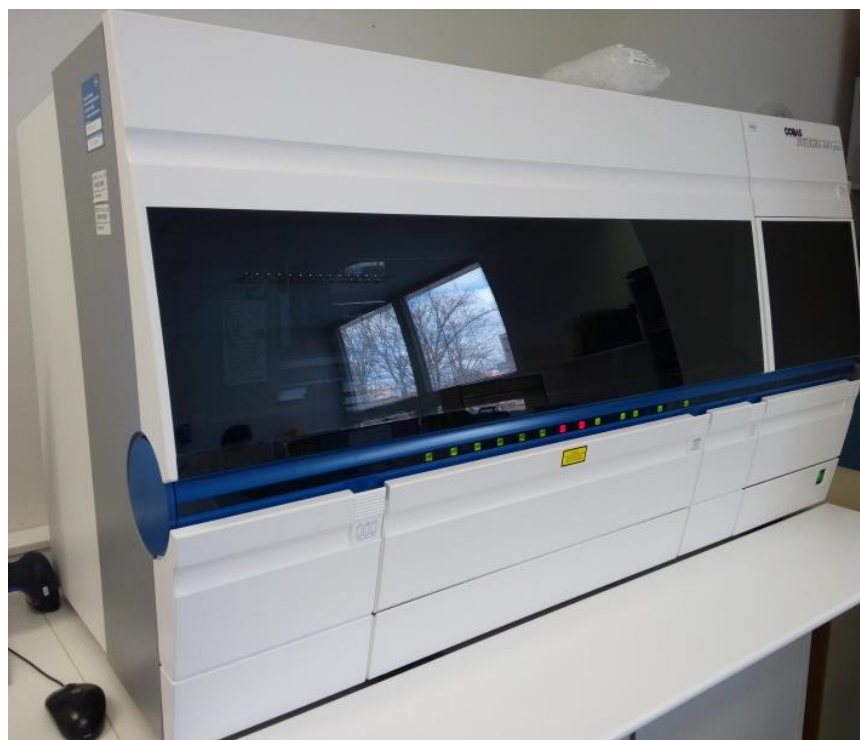
Obr. 9. Screening kathinonů v moči o koncentraci 4000 µg/l na destičce Multi-Drug Test.

Další zvolený citlivější screening byl proveden metodou KIMS na laboratorním analyzátoru COBAS INTEGRA 400 plus. Z důvodu podobnosti látek ze skupiny amfetaminů vs. kathinonů, byla analýza provedena na komerčně dostupné soupravě pro semikvantitativní stanovení látek ze skupiny amfetaminů v moči. Hraníční hodnota

pro posouzení výsledku screeningu je pro amfetamin 300 µg/l. Výsledky semikvantitativního stanovení katinonů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2. Screening katinonů metodou KIMS

Koncentrace katinonů ve vzorku [µg/l]	Odezva analyzátoru [µg/l]	Výsledek
500	<300	negativní
2000	506	pozitivní
3000	>2000	pozitivní



Obr. 10. Analyzátor COBAS INTEGRA 400 plus od firmy Roche.

4.2 Optimalizace GC-MS podmínek

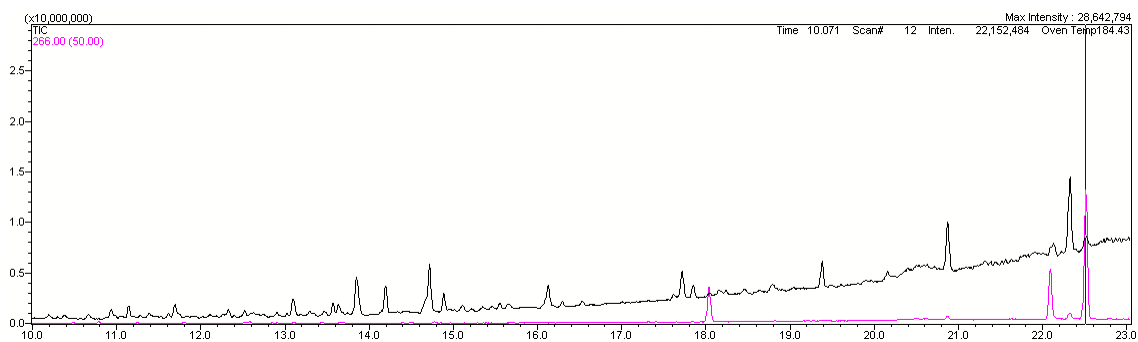
K identifikaci zkoumaných katinonů se jako nejvhodnější postup ověřila extrakce do kapaliny s derivatizací pomocí PFBCl s následnou GC-MS analýzou. Charakteristické zastoupení iontů analyzovaných analytů a jejich retenční časy jsou

přehledně shrnuty v Tab. 3. Tučně je vyznačený charakteristický ion pro identifikaci každého analytu.

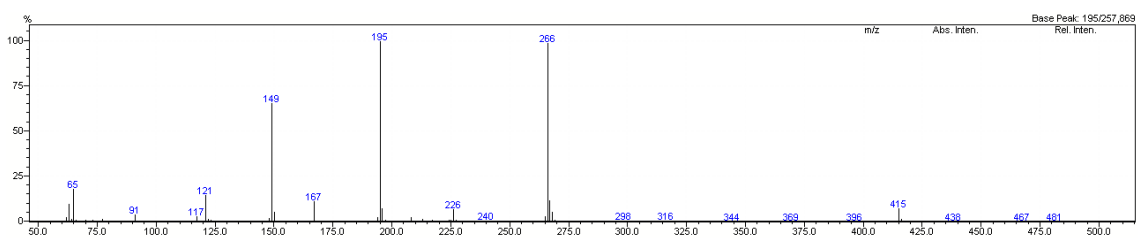
Tab. 3. Charakteristické ionty a jejich relativní intenzity s retenčním časem u zkoumaných PFB derivátů kathinonů o koncentraci 500 µg/l.

Analyt	m/z [Da]	Relativní intenzita [%]	Retenční čas [min]
Butylon	266	75,44	22,51
	195	100	
	149	59,31	
	167	13,21	
	121	19,12	
Ethylkathinon	266	59,22	18,04
	195	100	
	267	27,08	
	248	7,88	
	232	5,41	
Ethylon	266	69,62	22,09
	195	100	
	149	47,27	
	178	4,02	
	121	16,84	
Mefedron	252	79,4	17,72
	195	100	
	119	83,55	
	167	14,12	
	91	40,38	
Methkathinon	252	75,06	16,13
	195	100	
	167	14,22	
	105	29,08	
	77	38,96	
Methkathinon-d3	255	54,31	16,10
	195	100	
	167	14,23	
	105	28,33	
	77	38,15	
Pyrovaleron	126	100	14,72
	127	8,97	
	91	9,88	
	96	4,09	

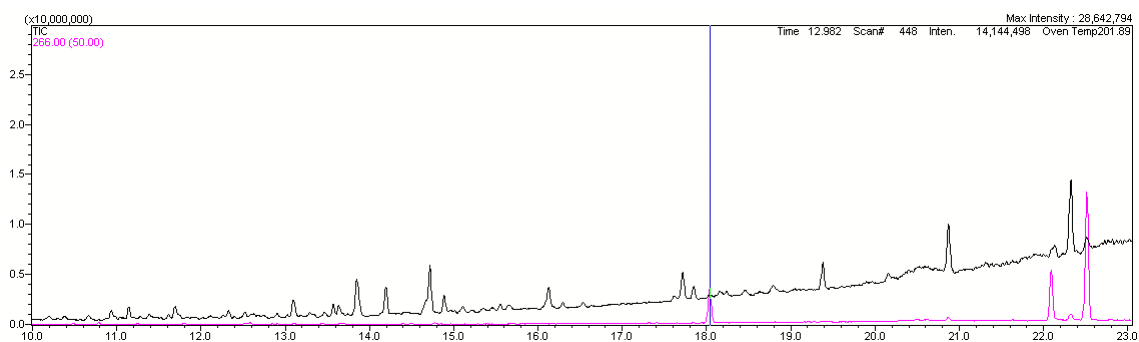
Na Obr. 11 – 24 jsou uvedeny chromatogramy a hmotnostní spektra PFB derivátů butylonu, ethylkathinonu, ethylonu, mefedronu, methkathinonu, methkathinonu-d3 a pyrovaleronu. V každém záznamu je vyselektovaný charakteristický ion, u kterého se odečítala plocha píku pro kvantifikaci.



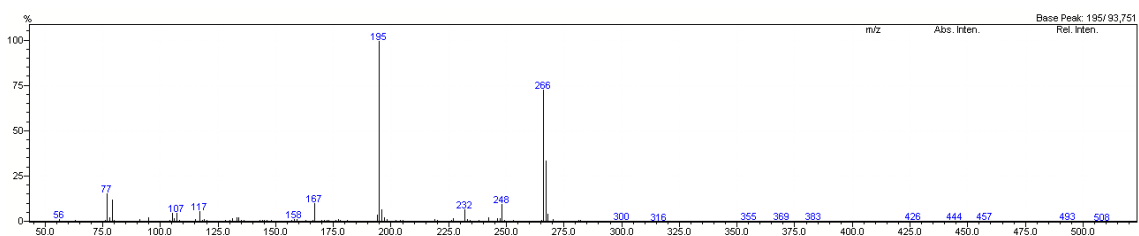
Obr. 11. Chromatogram PFB derivátu butylonu o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$, v retenčním čase 22,51 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 266.



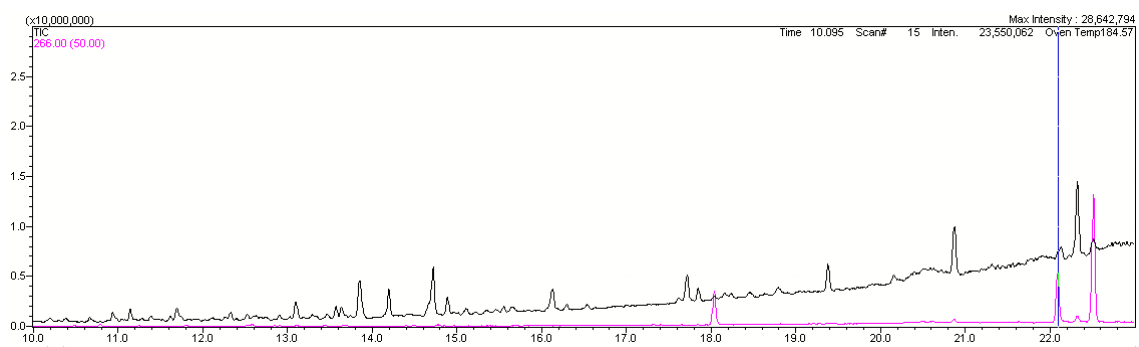
Obr. 12. Hmotnostní spektrum PFB derivátu butylonu.



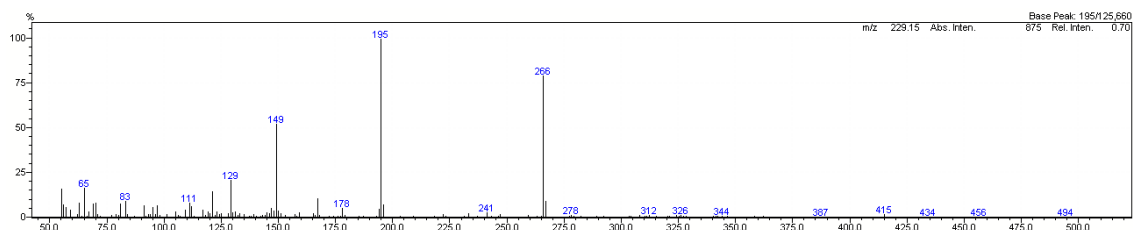
Obr. 13. Chromatogram PFB derivátu ethylkathinonu o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$, v retenčním čase 18,04 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 266.



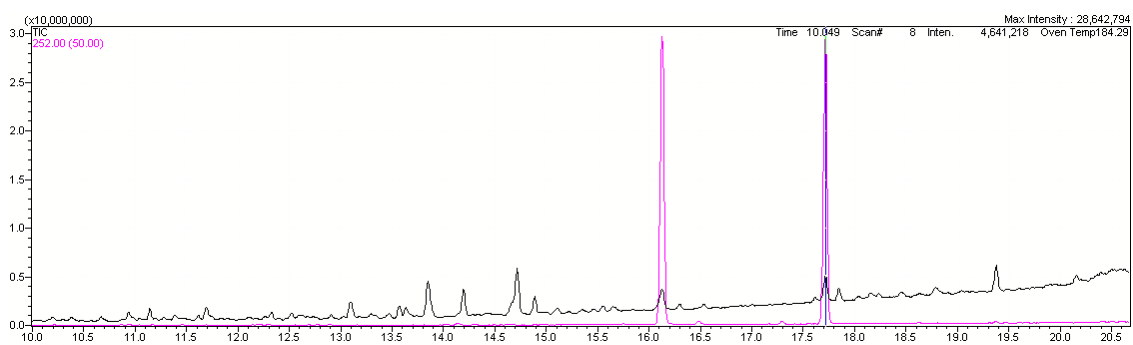
Obr. 14. Hmotnostní spektrum PFB derivátu ethylkathinonu.



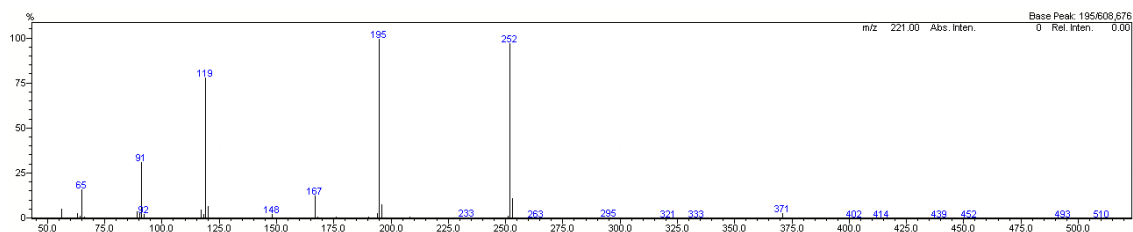
Obr. 15. Chromatogram PFB derivátu ethylonu o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$, v retenčním čase 22,09 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 266.



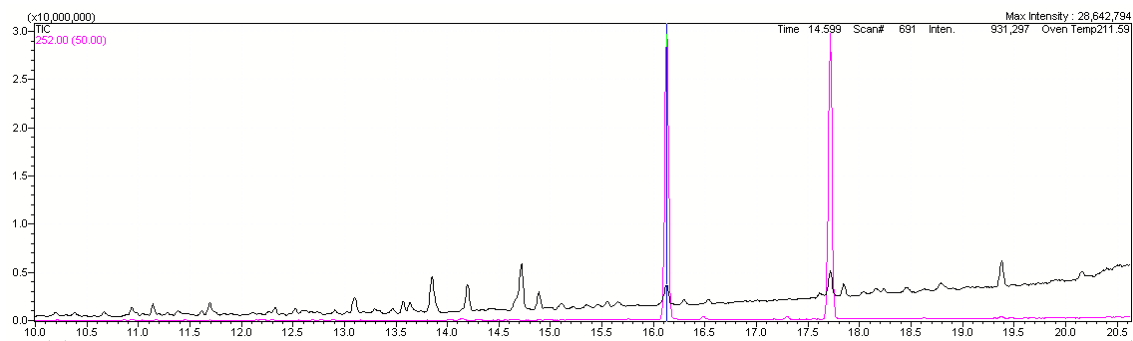
Obr. 16. Hmotnostní spektrum PFB derivátu ethylonu.



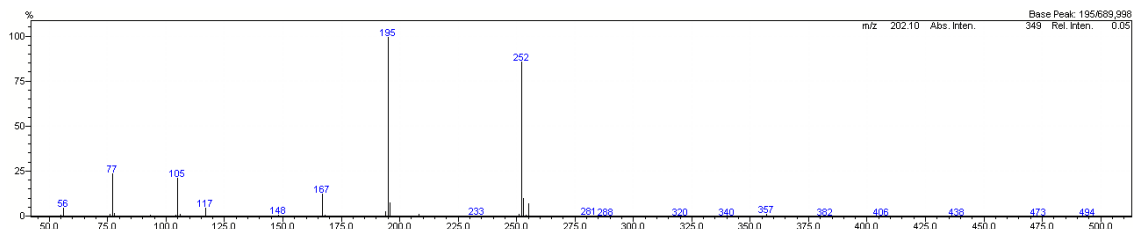
Obr. 17. Chromatogram PFB derivátu mefedronu o koncentraci 500 µg/l, v retenčním čase 17,72 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 252.



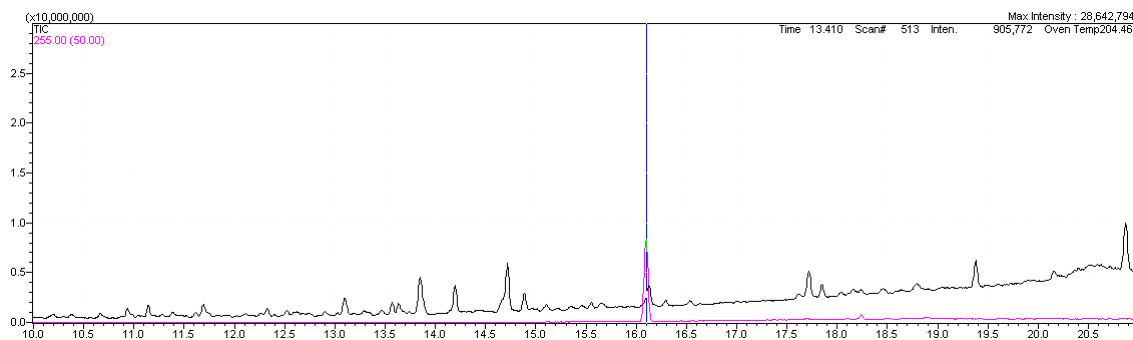
Obr. 18. Hmotnostní spektrum PFB derivátu mefedronu.



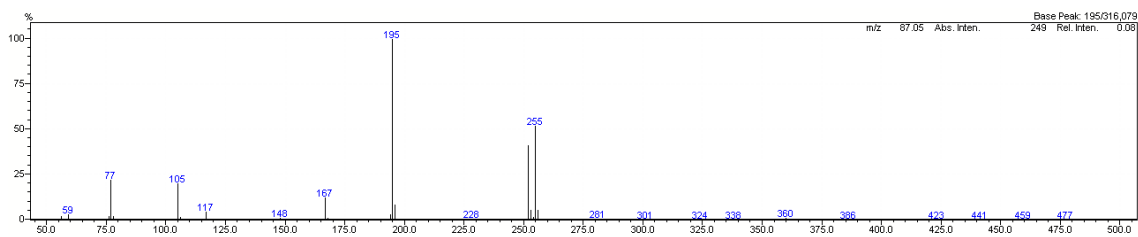
Obr. 19. Chromatogram methkathinon PFB derivátu o koncentraci 500 µg/l, v retenčním čase 16,13 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 252.



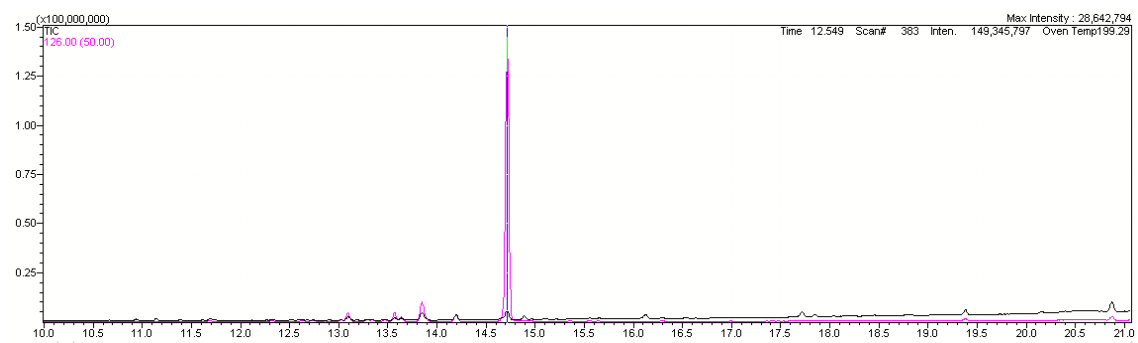
Obr. 20. Hmotnostní spektrum PFB derivátu methkathinonu.



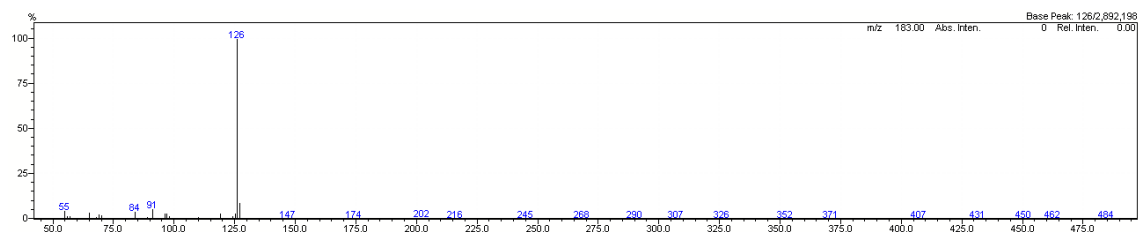
Obr. 21. Chromatogram PFB derivátu methkathinonu-d3 o koncentraci 500 µg/l, v retenčním čase 16,10 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 255.



Obr. 22. Hmotnostní spektrum PFB derivátu methkathinonu-d3.



Obr. 23. Chromatogram PFB derivátu pyrovaleronu o koncentraci 500 µg/l, v retenčním čase 14,72 minut. V záznamu je vyselektovaný charakteristický ion m/z 126.



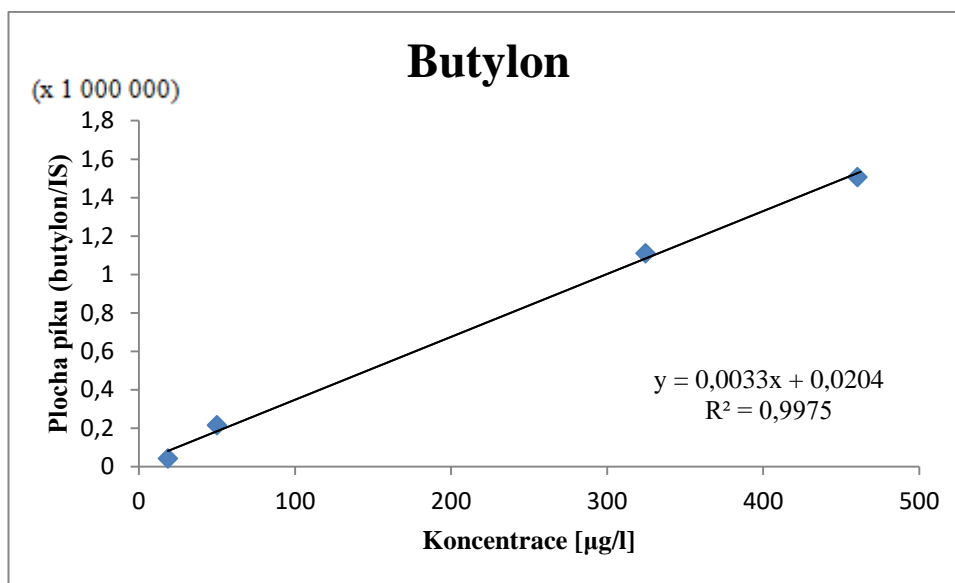
Obr. 24. Hmotnostní spektrum PFB derivátu pyrovaleronu.

4.3 Selektivita metody

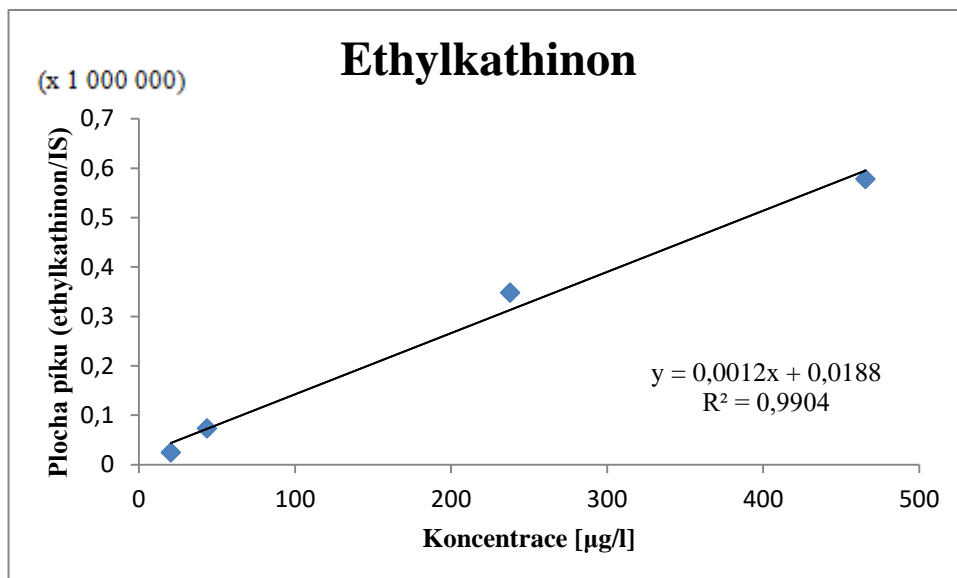
Analýzou negativní moče nebyla prokázána přítomnost zkoumaných analytů. Byla ověřena správná negativita.

4.4 Ověření pracovního rozsahu metody

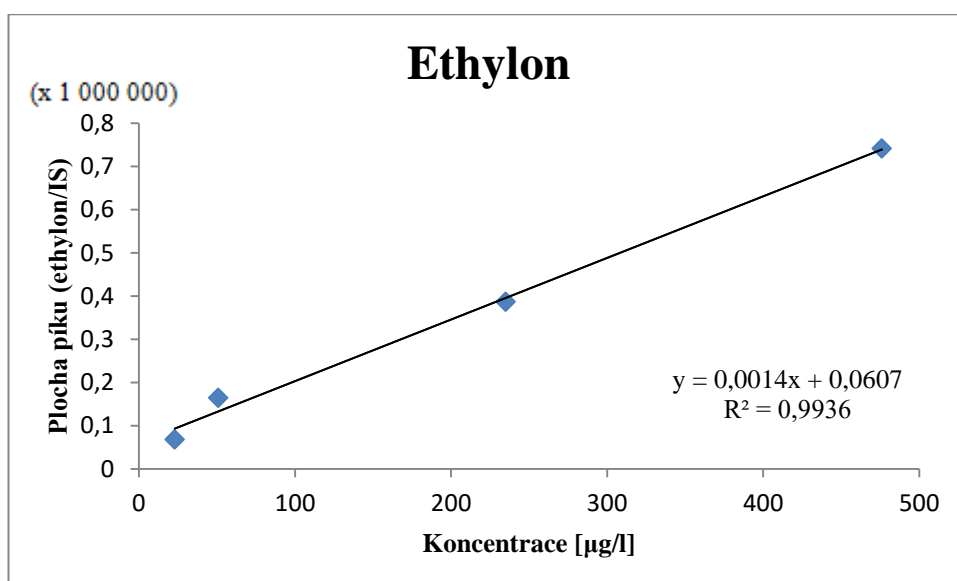
Pro jednotlivé analyty byl ověřen pracovní rozsah zkoumané metody v rozmezí 25 – 500 µg/l (Obr. 25 – 30). Kvantifikace byla provedena metodou interního standardu (IS, methkathinon-d3). Mírou lineárního vztahu je korelační koeficient (R^2) a kalibrační přímka je popsána obecnou regresní rovnicí ($y = ax + b$). Pracovní rozsah byl ověřen měřením pětibodové koncentrační řady ve třech opakováních.



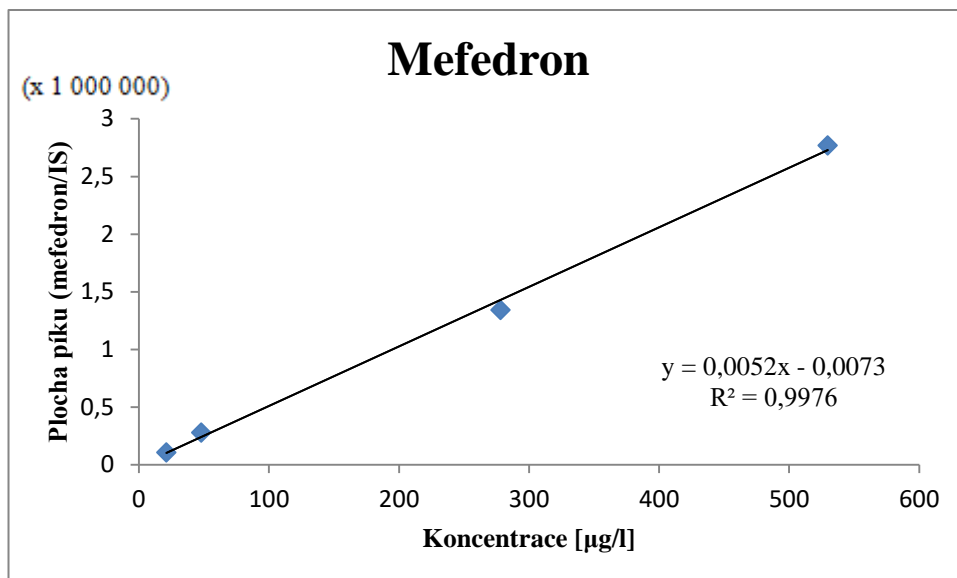
Obr. 25. Graf závislosti poměru plochy píku PFB derivátu butylonu a interního standardu na koncentraci ve vzorku. Pracovní rozsah byl ověřen v rozmezí 25 – 500 µg/l.



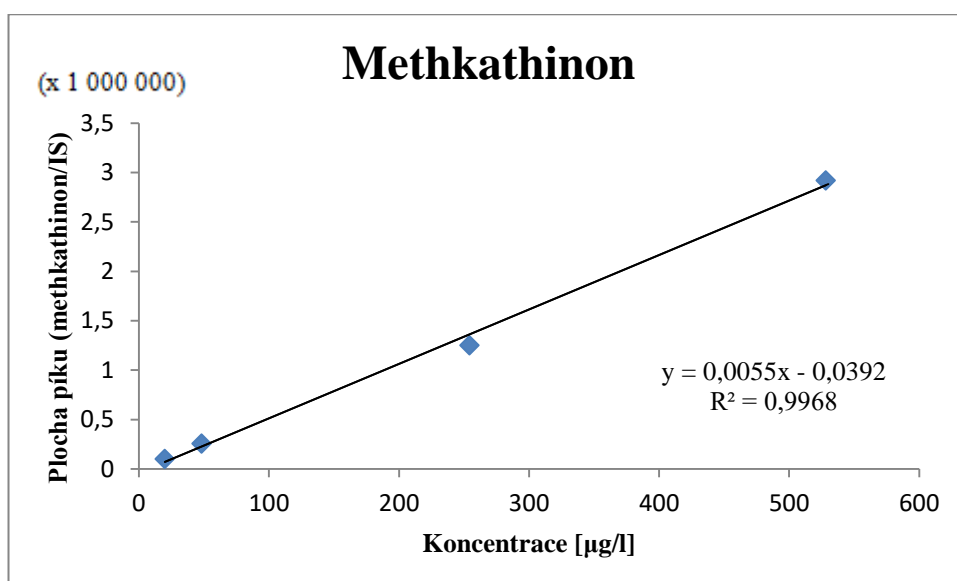
Obr. 26. Graf závislosti poměru plochy píku PFB derivátu ethylkathinonu a interního standardu na koncentraci ve vzorku. Pracovní rozsah byl ověřen v rozmezí 25 – 500 µg/l.



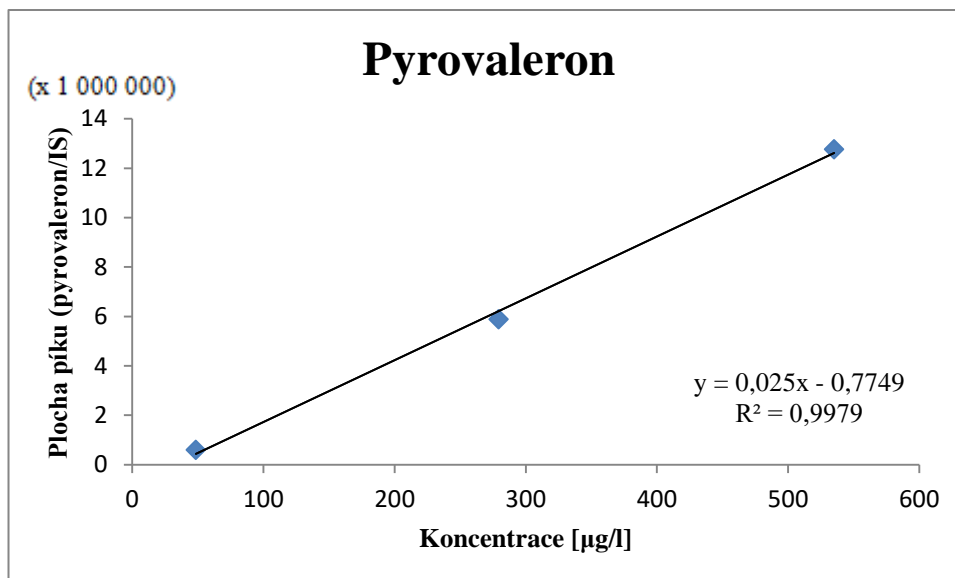
Obr. 27. Graf závislosti poměru plochy píku PFB derivátu ethylonu a interního standardu na koncentraci ve vzorku. Pracovní rozsah byl ověřen v rozmezí 25 – 500 µg/l.



Obr. 28. Graf závislosti poměru plochy píku PFB derivátu mefedronu a interního standardu na koncentraci ve vzorku. Pracovní rozsah byl ověřen v rozmezí 25 – 500 $\mu\text{g/l}$.



Obr. 29. Graf závislosti poměru plochy píku PFB derivátu methkathinonu a interního standardu na koncentraci ve vzorku. Pracovní rozsah byl ověřen v rozmezí 25 – 500 $\mu\text{g/l}$.



Obr. 30. Graf závislosti poměru plochy píku PFB derivátu pyrovaleronu a interního standardu na koncentraci ve vzorku. Pracovní rozsah byl ověřen v rozmezí 50 – 500 µg/l.

Korelační koeficienty lineární závislosti vybraných analytů vyhovují požadavkům validace, resp. verifikace metody, tj. $R^2 \geq 0,99$.

5 DISKUSE

Ke stále nově objevujícím se kathinonovým derivátům a k jejich identifikaci a charakterizaci se také vyvíjejí analytické metody. Má experimentální práce byla zaměřena na optimalizaci přípravy vzorků a GC-MS podmínek. Byly analyzovány modelové vzorky biologického materiálu (moč) o různé koncentraci (0, 25, 50, 100, 250 a 500 µg/l) vybraných syntetických derivátů kathinonů (butylon, ethylkathinon, ethylon, mefedron, methkathinon a pyrovaleron). Vzorky byly připraveny bez derivatizačního činidla a s vybranými derivatizačními činidly (BSTFA + TMCS, PFPA a PFBCl). Separace proběhla v koloně DB-5MS při teplotě 70 °C, teplota nástřiku byla 270 °C a teplota iontového zdroje 250 °C. Jednotlivé analyty byly identifikovány podle svých charakteristických iontů m/z a retenčních časů. Jako nejvhodnější derivatizační činidlo se z testovaných jeví PFBCl z důvodů nejvyšší odezvy detektoru a dobré separace jednotlivých derivátů.

Mohamed a kolektiv (2017) ve své studii stanovovali analyty methkathinon a mefedron metodou GC-MS, za použití tří derivatizačních činidel HFBA (heptafluorobutyrová kyselina), TFAA (trifluoroctová kyselina) a PFPA. Dle tohoto výzkumu bylo prokázáno, že nejcitlivější je derivatizační činidlo PFPA pro analýzu GC-MS.

Majchrzak a kolektiv (2016) ve své studii identifikovali a charakterizovali nový derivát kathinonů 4-fluor-PVP9 pomocí následujících metod HPLC-MS, HPLC-DAD, MS-ESI a GC-MS.

6 ZÁVĚR

S ohledem na narůstající se počet uživatelů těchto psychostimulačních látek, bylo nutné zavést spolehlivou a robustní metodu do klinické praxe. V nemocničních ambulancích a ordinacích praktických lékařů jsou dostupné pouze základní screeningové testy, které nezahrnují průkaz katinonů. V rutinních nemocničních biochemických laboratořích jsou analyzovány pouze běžné skupiny návykových látek. Z těchto důvodů byla na pracovišti Laboratoří AGEL a.s. v Novém Jičíně vyvinuta a verifikována specifická GC-MS metoda pro průkaz a stanovení vybraných syntetických katinonů v moči.

Pracovní rozsah měření pro zkoumané katinony byl 25 – 500 µg/l. Pyrovaleron při koncentraci 25 µg/l nebyl detekován. Korelační koeficienty závislostí splňují požadavky pro validaci, resp. verifikaci metody.

7 POUŽITÁ LITERATURA

Alfaifi H, Abdelwahab SI, Mohan S, Taha MME, Syame SM, Shaala LA, dAlsanosy R. (2017) *Catha edulis* Forsk. (Khat): Evaluation of its Antidepressant-like Activity. *Pharmacognosy Magazine*, **13**, 354-358.

Baumann MH, Ayestas MA, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, Brandt SD, Rothman RB, Ruoho AE, Cozzi NV. (2012) The Designer Methcathinone Analogs, Mephedrone and Methydone, are Substrates for Monoamine Transporters in Brain Tissue. *Neuropsychopharmacology* **37**, 1192-1203.

DE Felice LJ, Glennon RA, Negus SS. (2014) Synthetic Cathinones: Chemical Phylogeny, Physiology, and Neuropharmacology. *Life sciences* **97**, 20-26.

El-Menyar A, Mekkodathil A, Al-Thani H, Al-Motarreb A. (2015) Khat Use: History and Heart Failure. *Oman Medical Journal* **30**, 77-82.

Eshleman AJ, Wolfrum KM, Hatfield MG, Johnson RA, Murphy KV, Janowsky A. (2013) Substituted methcathinones differ in transporter and receptor interactions. *Biochemical pharmacology* **85**, 1803-1815.

Gatch MB, Taylor CM, Forster MJ. (2013) Locomotor Stimulant and Discriminative Stimulus Effects of „Bath Salt“ Cathinones. *Behavioural pharmacology* **24**, 437-447.

Hassan Z, Bosch OG, Singh D, Narayanan S, Kasinather BV, Seifritz E, Kornhuber J, Quednow BB, Müller ChP. (2017) Novel Psychoactive Substances – Recent Progress on Neuropharmacological Mechanisms of Action for Selected Drugs. *Frontiers in Psychiatry* **8**, 152.

Juurmaa J, Menke RAL, Vila P, MürseppA, Tomberg T, Ilves P, Nigul M, Johansen-Berg H, Donaghy M, Stagg ChJ, Stephens A, Taba P. (2016) Grey matter abnormalities in methcathinone abusers with a Parkinsonian syndrome. *Brain and Behavior* **6**.

Ketema T, Yohannes M, Alemayehu E, Ambelu A. (2015) Evaluation of immunomodulatory activities of methanolic extract of khat (*Catha edulis*, Forsk) and cathinone in Swiss albino mice. *BMC Immunology* **16**, 9.

Kuś P, Kusz J, Książek M, Pieprzyca E, Rojkiewicz M. (2017) Spectroscopic characterization and crystal structures of two cathinone derivatives: *N*-ethyl-2-amino-1-phenylpropan-1-one (ethcathinone) hydrochloride and *N*-ethyl-2-amino-1-(4-chlorophenyl)propan-1-one (4-CEC) hydrochloride. *Forensic Toxicology* **35**, 114-124.

Lapinsky DJ, Aggarwal S, Huang Y, Surratt CK, Lever JR, Foster JD, Vaughan RA. (2009) A novel photoaffinity ligand for the dopamine transporter based on pyrovalerone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 3770-3774.

- Liakoni E, Yates C, Dines AM, Dargan PI, Heyerdahl F, Hovda KE, Liechti ME. (2018) Acute recreational drug toxicity: Comparison of self-reports and results of immunoassay and additional analytical methods in a multicenter European case series. *Medicine* **97**.
- Majchrzak M, Rojkiewicz M, Celiński R, Kús P, Sajewicz M. (2016) Identification and characterization of new designer drug 4-fluoro-PV9 and α -PHP in the seized materials. *Forensic Toxicology* **34**, 115-124.
- Majchrzak M, Celiński R, Kús P, Kowalska T, Sajewicz M. (2018) The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol* **36**, 33-50.
- Meltzer PC, Butler D, Deschamps JR, Madras BK. (2006) 1-(4-Methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogs. A promising class of monoamine uptake inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 1420-1432.
- Mohamed KM, Bakdash A. (2017) Comparison of 3 Derivatization Methods for the Analysis of Amphetamine-Related Drugs in Oral Fluid by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry Insights* **12**.
- Mohan S, Abdelwahab SI, Hobani YH, et al. (2016) *Catha edulis* Extract Induces H9c2 Cell Apoptosis by Increasing Reactive Oxygen Species Generation and Activation of Mitochondrial Proteins. *Pharmacognosy Magazine*. **12**, 321-326.
- Prosser JM, Nelson LS. (2012) The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *Journal of medical toxicology* **8**, 33-42.
- Rojkiewicz M, Kús P, Kusz J, Książek M. (2018) Spectroscopic and crystallographic characterization of two cathinone derivatives: 1-(4-fluorophenyl)-2-(methylamino)pentan-1-one (4-FPD) hydrochloride and 1-(4-methylphenyl)-2-(ethylamino)pentan-1-one (4-MEAP) hydrochloride. *Forensic Toxicology* **36**, 141-150.
- Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu L-H, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME. (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *British Journal of Pharmacology* **168**, 458-470.
- Stepens A, Stagg CJ, Platkājis A, Boudrias M-H, Johansen-Berg H, Donaghy M. (2010) White matter abnormalities in Methcathinone abusers with an extrapyramidal syndrome. *Brain: a journal of neurology* **133**, 3676-3684.
- Suyama JA, Sakloth F, Kolanos R, Glennon RA, Lazenka MF, Negus SS. (2016) Abuse-Related Neurochemical Effects of *Para*-Substituted Methcathinone Analogs in Rats: Microdialysis Studies of Nucleus Accumbens Dopamine and Serotonin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **356**, 182-190.
- Watterson LR, Olive MF. (2014) Synthetic cathinones and their rewarding and reinforcing effects in rodents. *Advances in Neuroscience (Hindawi)* **9**.