

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**Vývoj metody stanovení vybraných syntetických
kanabinoidů kapilární elektroforézou s hmotnostní
spektrometrií**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Bražinová
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	květen 2014

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za vedení při vytváření mé diplomové práce, za jeho trpělivost, povzbuzující a uklidňující přístup a za jeho rady při sepisování práce.

Také bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mi studium umožnili a mému bratrovi, který mě naučil samostatnosti.

Lucie Bražinová

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lucie Bražinová
Název práce	Vývoj metody stanovení vybraných syntetických kanabinoidů kapilární elektroforézou s hmotnostní spektrometrií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Již od objevení delta-9-tetrahydrocannabinolu začaly být syntetizovány syntetické kanabinoidy pro vědecké účely. Posledních několik let se však objevují syntetické kanabinoidy pro účely rekreační, prodávané jako legální alternativa marihuany. Postupně jsou zahrnovány na Seznam omamných a psychotropních látek, a proto je potřeba najít rychlou a účinnou metodu pro jejich detekci v biologických vzorcích. Takovou metodou může být právě micelární elektrokinetická chromatografie, což je typ kapilární elektroforézy, ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Získáním fragmentačních spekter je možné získat knihovnu, využitelnou při analýze vzorků o neznámém obsahu.</p>
Klíčová slova	Kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, syntetické kanabinoidy, systematická toxikologická analýza
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's name	Lucie Bražinová
Title	Development of method for the determination of chosen synthetic cannabinoids by capillary electrophoresis with mass spectrometry
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Department of analytical chemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Since the discovery of delta-9-tetrahydrocannabinol synthetic cannabinoids start to be synthesized for scientific purposes. The last few years, however, there are synthetic cannabinoids for recreational purposes, sold as a legal alternative to marijuana. Gradually they are included on the list of narcotic drugs and psychotropic substances, and therefore there's the need to find a quick and effective method for their detection in biological samples. Such a method may be just micellar electrokinetic chromatography, which is a type of capillary electrophoresis in combination with mass spectrometry. Obtaining fragmentation spectra can be gotten a library usable in the analysis of samples of unknown content.</p>
Keywords	Capillary electrophoresis, mass spectrometry, synthetic cannabinoids, systematic toxicologic analysis
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 Teoretická část.....	10
1.1 Kapilární elektroforéza.....	10
1.1.1 Historie.....	10
1.1.2 Instrumentace	10
1.1.3 Teoretické aspekty	11
1.1.4 Elektroosmotický tok.....	13
1.1.5 Migrace	15
1.1.6 Rozšíření zóny, účinnost, difúze.....	16
1.1.7 Joulovo teplo.....	17
1.1.8 Injekce.....	18
1.1.9 Adsorpce	18
1.1.10 Elektrodisperze	18
1.1.11 Detekce	19
1.1.12 Rozlišení	20
1.2 Separční metody založené na elektroforéze	21
1.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	21
1.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	21
1.2.3 Kapilární elektrochromatografie (CEC)	21
1.2.4 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)	22
1.2.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)	22
1.2.6 Kapilární izotachoforéza (CITP).....	22
1.3. Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií	23
1.4 Syntetické kanabinoidy	26
2 Experimentální část	30
2.1 Instrumentace	30
2.2 Chemikálie.....	30
3 Výsledky a diskuze.....	32
3.1 Optimalizace metody.....	32
3.1.1 Složení pufru.....	32
3.1.2 Optimalizace MS detekce	33
3.2 Kalibrace	48

3.3 Kolizní energie a fragmentace analytů	48
4 Závěr.....	64
5 Použitá literatura.....	65
6 Zkratky	69

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo jednak prostudování teoretických i praktických aspektů kapilární elektroforézy a jejího spojení s hmotnostní spektrometrií, ale i fyzikálně-chemických vlastností vybraných syntetických kanabinoidů. Dále vypracování literární rešerše současného stavu analytiky syntetických kanabinoidů. Hlavním cílem práce byl pak vývoj metody analytické separace syntetických kanabinoidů metodou kapilární elektroforézy ve spojení s hmotnostní spektrometrií, částečná validace analytické metody (opakovatelnost, linearita, limity detekce a kvantifikace, apod.), a také aplikace vypracované metody separace syntetických kanabinoidů pro analýzu reálných vzorků. Cílem diplomové práce bylo provedení pilotní studie možnosti spojení CE-MS v toxikologické analýze vybraných metabolitů syntetických kanabinoidů.

Summary

The aim of this thesis was to study on the one hand, the theoretical and practical aspects of capillary electrophoresis and its connection with mass spectrometry as well as physico-chemical properties of some synthetic cannabinoids. Furthermore, the development of a literature review of the current state of analysis of synthetic cannabinoids. The main aim of this work was then developing methods of analysis of synthetic cannabinoids separation by capillary electrophoresis in combination with mass spectrometry, partial validation of analytical methods (repeatability, linearity, limits of detection and quantification, etc.), and also the application of the methods of separation of synthetic cannabinoids for the analysis of real samples. The aim of the thesis was to conduct a pilot study on the possibilities of connecting CE-MS in the toxicological analysis of selected metabolites of synthetic cannabinoids.

1 Teoretická část

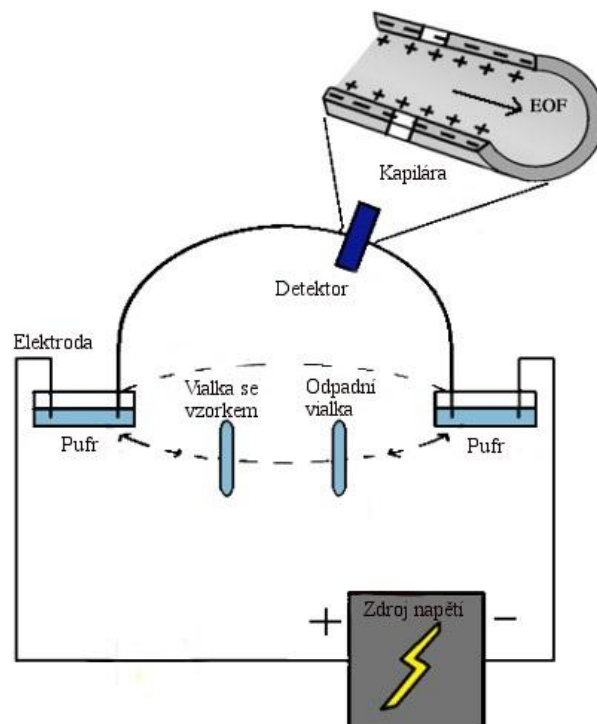
1.1 Kapilární elektroforéza

1.1.1 Historie

Elektroforéza jako separační technika byla poprvé představena Tiselielem v roce 1937. Zjistil, že jednotlivé proteiny směsi v trubičce vyplněné pufrem po vložení elektrického pole migrují ve směru elektrického pole v závislosti na jejich náboji a mobilitě. Za tento objev byl i oceněn Nobelovou cenou. Při elektroforéze představené Tiselielem byla separační účinnost limitována tepelnou difúzí a vodivostí. Z toho důvodu probíhá tradiční elektroforéza v nevodivých nosičích, jako jsou polyakrylamidové a agarosové gely v prostředí pufru. Nejčastěji jsou gely používány na desce nebo v kapiláře. Plošná elektroforéza je však pomalejší, méně efektivní, složitější na detekci a automatizaci a její hlavní nevýhodou je nemožnost separovat nízkomolekulární látky. Počáteční práce v kapilární elektroforéze popsal o 30 let později Hjerten, kdy byly k dispozici jen kapiláry s milimetrovým průměrem, a dokázal, že při provádění elektroforézy v trubičkách s malým průměrem dochází k redukci tepelných vlivů na separaci. Od 80. let 20. století se začaly používat kapiláry nejen ze skla, ale i teflonu s vnitřním průměrem menším než 100 μm .

1.1.2 Instrumentace

Pro kapilární elektroforézu (CE) je typická jednoduchá instrumentace. Schéma je zobrazeno na obr. 1, kde jsou konce křemenné kapiláry umístěny do nádobek s pufrem. Nádobky rovněž obsahují elektrody (platinové), používané k vytvoření elektrického kontaktu mezi zdrojem vysokého napětí a kapilárou.



Obr. 1: Schéma kapilární elektroforézy (převzato a upraveno) [1]

Vzorek je nadávkován do kapiláry výměnou jedné z nádobky za nádobku se vzorkem s využitím tlaku (tzv. hydrodynamické dávkování), nebo elektrokineticky (s využitím elektrického pole). Po výměně nádobky se vzorkem za nádobku s elektrolytem může začít separace analytu. Optická detekce (nejčastější způsob detekce v CE) může být provedena na opačném konci, přímo skrz stěnu kapiláry.

1.1.3 Teoretické aspekty

Separace v elektromigračních metodách je založena na rozdílné rychlosti pohybu látek ve stejnosměrném elektrickém poli [2 - 5]. Tato rychlost (v) je dána elektroforetickou mobilitou (μ_e) a intenzitou elektrického pole (E), jak uvádí následující vztah:

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

Elektroforetická mobilita je pro daný iont, médium a teplotu konstantní, tudíž je charakteristická. Elektroforetická mobilita je určena silou elektrického pole (F_E), působící na ionizované částice o náboji q , proti které působí odporová třecí síla (F_F).

$$F_E = qE \quad (2)$$

$$F_F = -6\pi\eta rv \text{ (Stokesův zákon)} \quad (3)$$

Kde η je viskozita média a r poloměr částice (včetně solvatačního obalu).

Během krátkého přechodného stavu, dochází k vyrovnání těchto dvou sil.

$$qE = 6\pi\eta rv \quad (4)$$

Po dosazení vzorce pro výpočet elektroforetické mobility (1), dostaneme:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta rv} \quad (5)$$

Z rovnice (5) vyplývá, že malé vysoce nabitě částice mají velkou mobilitu, zatímco méně nabitě, mají mobilitu malou. Elektroforetická mobilita uvedená v tabulkách byla určena z roztoků, kde všechny rozpuštěné látky byly nabity - stupeň ionizace (α_i) byl 1 a následně byla extrapolována na nekonečné zředění – tzv. limitní iontová mobilita (μ_{Lim}). Tato mobilita se liší od mobility určené experimentálně, nazývané efektivní mobilita (μ_{eff}).

$$\mu_{eff} = \alpha_i \mu_e \quad (6)$$

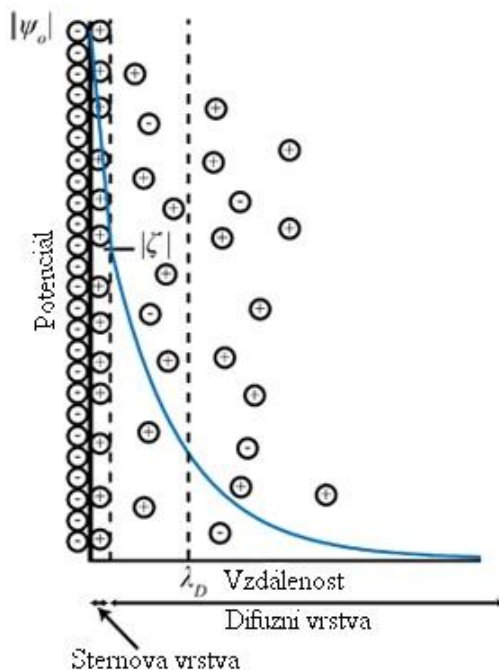
Efektivní mobilita je vysoce závislá na pH, teplotě, na hodnotě pK_a separované molekuly a na složení použitého pufru.

Z migračního času lze vypočítat tzv. zdánlivou mobilitu μ_{av} , která je vektorovým součtem efektivní mobility a mobility elektroosmotického toku.

$$\mu_{av} = \mu_{eff} + \mu_{EOF} \quad (7)$$

1.1.4 Elektroosmotický tok

Důležitým aspektem ovlivňujícím běh kapilární elektroforézy je elektroosmotický tok (EOF). EOF je vlastně tok nahromaděné kapaliny v kapiláře a je důsledkem povrchového napětí na vnitřní stěně kapiláry, kde se tvoří elektrická dvojvrstva (Obr. 2).



Obr. 2: Elektrická dvojvrstva (převzato a upraveno) [2]

Elektroosmotický tok ovlivňuje dobu iontu strávenou v kapiláře superpozicí EOF na mobilitě, což umožňuje zvolení požadované délky kapiláry, nemá však vliv na selektivitu.

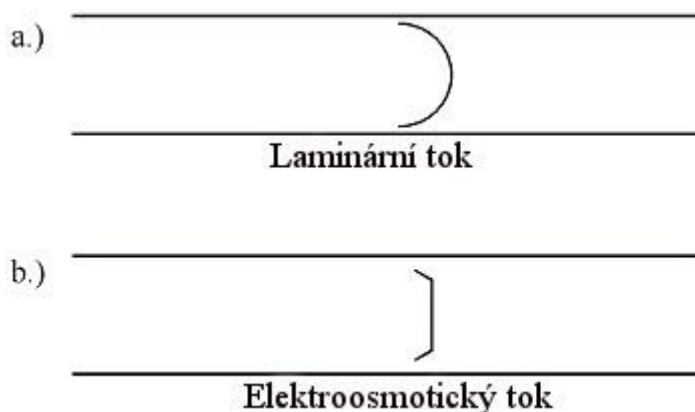
Ve vodném prostředí má většina pevných povrchů náboj, který může být vytvořen dvěma způsoby. Buď vlivem ionizace povrchu, nebo adsorpcí iontových částic na povrch. Může však dojít k oběma způsobům vzniku náboje na povrchu, což se stává v případě, že je použit např. tavený křemen. Velikost mobility elektroosmotického toku je silně závislá na disociaci silanolových skupin ($-\text{SiOH}$). Vzhledem k tomu, že je těžké určit pK_a silanolových skupin, vychází se z experimentální zkušenosti, kdy EOF vzniká již při pH větším než 2.

Protiionty (ve většině případů kationty) hromadí se u povrchu křemenné kapiláry udržují rovnováhu mezi náboji a vytváří tak nepohyblivou Sternovu elektrickou dvojvrstvu. K této dvojvrstvě jsou přitahovány ionty z pracovního elektrolytu, které však nejsou poutány

velkou elektrickou silou a tudíž mohou migrovat. Při vložení napětí na kapiláru, začnou být kationy přitahovány ke katodě a zároveň odpuzovány kationty tvořící nepohyblivou dvojvrstvu. Protože jsou solvatovány, strhávají kapalinu přímo ke katodě.

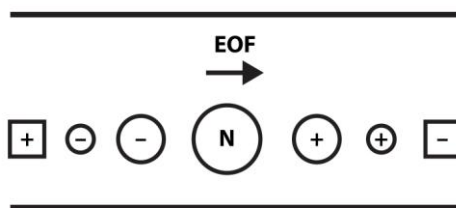
Jelikož je náboj silně ovlivňován velikostí pH, stejně tak je jím ovlivněna i velikost EOF. Při vysokém pH, kdy jsou silanolové skupiny převážně deprotonované, je EOF výrazně vyšší, než při nižších pH.

Díky elektroosmotickému toku se v kapiláře vytváří jedinečný rychlostní profil (Obr. 3). Vzhledem k tomu, že elektricky poháněná síla toku je rovnoměrně rozložena podél celé kapiláry, nedochází k poklesu tlakového spádu a rychlost je téměř stejná. Tento plochý rychlostní profil proudění je výhodný z toho důvodu, že nedochází k rozmývání zón na rozdíl od rychlostního profilu laminárního, vytvořeného tlakem.



Obr. 3: Profil proudění ovlivněný EOF a při jeho potlačení (převzato a upraveno) [2]

Tvar rychlostního profilu má vliv i na tvar píku. V případě laminárního profilu vzniká pík široký v důsledku rozmývání zóny, kdežto u profilu EOF je pík úzký. Další z výhod elektroosmotického toku je schopnost unášet téměř všechny částice bez ohledu na náboj. Za normálních podmínek (povrch kapiláry je nabit záporně) proud kapaliny v kapiláře směřuje od anody (+) ke katodě (-). Nejrychleji putují kapilárou kationty, které jsou přitahovány katodou, a navíc poháněny EOF ve stejném směru. Neutrální látky bez náboje se pohybují pouze díky EOF a nedochází k jejich rozseparování. Dokonce některé anionty mohou putovat ke katodě a být separovány, pokud je jejich elektroforetická mobilita nižší než EOF a unáší je i přes působení přitažlivých sil anody (Obr. 4).



Obr. 4: Migrace částic dle typu a velikosti náboje

Modifikací náboje stěny kapiláry, ať už pomocí pH nebo aditiv, můžeme EOF snížit, nebo dokonce otočit jeho směr, v tom případě může dojít i k opačné migraci látek.

Přestože je EOF obvykle výhodou, je potřeba ho kontrolovat a ovlivňovat. Například při vysokém pH může být elektroosmotický tok příliš rychlý a nedojde tak k separaci před elucí látek z kapiláry. Naopak při nižším pH je záporný náboj na stěně kapiláry natolik slabý, že dochází k adsorpci kationtů z roztoku díky Coulombickým interakcím. Snížení nebo úplné odstranění vlivu EOF je žádoucí při několika separačních metodách jako je izoelektrická fokusace, kapilární gelová elektroforéza nebo izotachoforéza. Ovládat EOF můžeme změnou náboje povrchu kapiláry, nebo změnou viskozity či pH pufru. Těmito změnami však můžeme ovlivnit i vlastnosti analytu

Nejsnazší způsob jak snížit rychlost EOF je snížením elektrického pole. Tento způsob má však několik nevýhod s ohledem na čas analýzy, účinnost a rozlišení. Další způsob je úpravou koncentrace nebo iontové síly pufru. Vyšší koncentrace pufru navíc snižují Coulombické interakce mezi rozpuštěnými látkami a stěnou kapiláry. Obvykle se používají pufrů o koncentraci v rozmezí od 10 do 100 mM, mohou být však i vyšší.

1.1.5 Migrace

Doba potřebná k tomu, aby nabitá částice prošla kapilárou až do bodu detekce, se nazývá migrační čas a je dán poměrem migrační vzdálenosti a rychlosti. Migrační čas je jeden z parametrů potřebných pro výpočet zdánlivé mobility rozpuštěné látky (μ_{av}).

$$\mu_{av} = \frac{l}{t_m E^*} = \frac{lL}{t_m U} \quad * E = \frac{U}{L} \quad (8)$$

Kde U je vložené napětí (pohybující se v rozpětí 0 – 30 kV), L celková délka kapiláry, t_m migrační čas, E intenzita elektrického pole a l je efektivní délka kapiláry, což je vzdálenost, kterou analyt urazí od místa injekce po detektor.

Separace v elektroforéze je založena na rozdílných mobilitách látek. Rozdílnost nezbytná k rozseparování dvou látek je dána šířkou zóny a odlišnými migračními časy. Šířka zóny je závislá na difúzních procesech.

1.1.6 Rozšíření zóny, účinnost, difúze

Rozšíření zóny rozpuštěné látky vzniká v důsledku rozdílné rychlosti jednotlivých částic v rámci zóny a může být definováno jako základní šířka píku (w_b)

$$w_b = 4\sigma \quad (9)$$

Kde σ je směrodatná odchylka píku (v čase, objemu).

Účinnost je vyjádřena počtem teoretických pater (N), vypočteným z efektivní délky kapiláry.

$$N = \left(\frac{l}{\sigma}\right)^2 \quad (10)$$

Za ideálních podmínek dochází k rozšíření zóny rozpuštěné látky jen vlivem podélné difúze. Radiální difúze se díky specifickému profilu proudění neprojeví, stejně tak konvekční rozšiřování zóny vzhledem k nevodivým vlastnostem kapiláry. Tudíž může být účinnost v souvislosti s molekulární difúzí v chromatografii vyjádřena:

$$N = \frac{\mu_a U l}{2DL} = \frac{\mu_a E l}{2D} \quad (11)$$

Kde D je difúzní koeficient rozpuštěné látky.

V praxi je naměřená účinnost obvykle menší než vypočtená. To je proto, že vypočtená účinnost zahrnuje jen vliv podélné difúze, přitom jsou často přítomny i další vlivy jako

teplotní gradient vyvolaný Joulovým teplem, injekce a interakce mezi rozpuštěnou látkou a povrchem kapiláry. Všechny tyto vlivy však lze usměrňovat. Výpočet celkového rozšíření zóny obsahující veškeré vlivy je následující:

$$\sigma^2_T = \sigma^2_{DIF} + \sigma^2_{INJ} + \sigma^2_{TEMP} + \sigma^2_{ADS} + \sigma^2_{DET} + \sigma^2_{ED} + \dots \quad (12)$$

Kde koeficienty vyjadřují difúzi, injekci, teplotní gradient, adsorpci, detekci a elektrodisperzi.

1.1.7 Joulovo teplo

Hlavní výhodou provedení elektroforézy v úzkých kapilárách je snížení účinků tepla, které zpravidla elektroforetické techniky omezují. Zahřívání je problematické, protože může způsobit nerovnoměrné teplotní gradienty, místní změnu viskozity a následné rozmývání zón. Pro dosažení nejlepší účinnosti a rozlišení je teoreticky potřeba použít co nejsilnější elektrické pole. V konečném důsledku však Joulovo teplo, vznikající při průchodu elektrického proudu vodičem, tento přístup omezuje nehledě na rozměry kapiláry. Rozměry společně s tepelnou vodivostí kapiláry a vloženým napětím však ovlivňují o kolik se zvýší teplota uvnitř kapiláry. Rovnoměrné zvýšení teploty v kapiláře není na škodu, problematické jsou teplotní gradienty, které způsobují viskozitní rozdíly v průřezu kapiláry, jenž mohou vnášet do zón deformace. Nejvyšší teplota je ve středu kapiláry, jelikož u stěn dochází k tepelným ztrátám. Regulace teploty je tedy velmi důležitá, již změna teploty o 1°C vede k 2-3 % změnám ve viskozitě, potažmo mobilitě rozpuštěných látek. Existuje celá řada ukazatelů, které poukazují na nadměrnou tvorbu tepla a případné teplotní gradienty. Takovýmto ukazatelem je například rostoucí napětí, snížení účinnosti nebo nelineární nárůst EOF, mobility či proudu. Snížit teplotní gradient pak můžeme snížením výkonu. Toho lze dosáhnout několika způsoby. Buď použitím nižšího napětí, nebo snížením iontové síly pufru, nebo jeho mobility. Poslední dvě zmíněné metody však mají určitá omezení, snížení koncentrace pufru totiž může vést i ke snížení jeho tlumivé síly a rovněž ke slabším interakcím s povrchem kapiláry. Alternativou tedy mohou být pufrы obsahující velké částice s malým nábojem jako je TRIS či borátový pufr. Důležitým prvkem jsou i chladicí systémy, které mají za úkol stabilizovat teplotní rozdíly mezi kapilárou a okolím pomocí proudící kapaliny nebo vzduchu.

1.1.8 Injekce

Při dávkování je důležité, aby délka zóny vzorku (w_i) byla co nejmenší. Je-li delší než rozmytí způsobené difúzí, klesá účinnost i rozlišení. Za předpokladu, že roztok vzorku vstupuje do kapiláry v obdélníkovém tvaru, je příspěvek dávkování k difúzi dán:

$$\sigma_{INJ}^2 = \frac{w_i^2}{12} \quad (13)$$

V ideálním případě by délka zóny vzorku neměla být větší než směrodatná odchylka. V praxi se používá pravidlo, že zóna aplikovaného vzorku by měla být kratší než 1-2 % délky kolony. Přestože jsme při dnešní instrumentaci schopni aplikovat takové množství, detekční limit však často vyžaduje dávkování většího množství.

1.1.9 Adsorpce

Interakce mezi rozpuštěnou látkou a povrchem kapiláry mohou mít negativní vliv na účinnost kapilární elektroforézy. V závislosti na rozsahu interakce může dojít ke chvostování píků či adsorpci. Hlavními příčinami adsorpce na křemenné stěně kapiláry jsou iontové interakce mezi kladně nabitými částicemi roztoku a záporně nabitými stěnami, společně s hydrofilními a hydrofobními interakcemi. Významné adsorpční účinky byly zaznamenány zejména u peptidů a proteinů, protože nesou velké množství nábojů a hydrofobních funkčních skupin.

1.1.10 Elektrodisperze

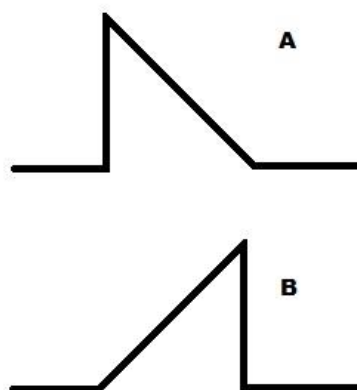
Kapilára obsahuje pufr nebo jiný pracovní elektrolyt, ve kterém dochází k separaci pod vlivem elektrického pole. Takový elektrolyt může poskytnout konstantní podmínky během analýzy, to znamená, že podmínky budou nezávislé na složení vzorku. Díky tomu může být vzorek identifikován na základě migračního času.

Rychlost zóny analytu vyplývá z jeho efektivní mobility a intenzity elektrického pole v dané oblasti. Role elektrolytu je udržovat tyto dvě veličiny konstantní. Efektivní mobilita je stabilní, pokud je stabilní i pH elektrolytu, z toho důvodu se používají právě pufrы.

Přítomnost analytu má vliv na elektrické pole, to vyplývá z pozorování elektrického proudu, který je přímo úměrný místní intenzitě elektrického pole a vodivosti. Proud bude konstantní po celé délce kapiláry tzn. že v místě, kde bude větší vodivost, než je v čistém elektrolytu, bude intenzita elektrického pole nižší a naopak.

Ionty analytu samozřejmě ovlivní elektrickou vodivost do určité míry a rozdíl bude tím větší, čím vyšší koncentraci analyt bude mít. Z toho vyplývá, že rychlost analytu je spojena s jeho koncentrací.

Závislost intenzity elektrického pole na lokální koncentraci analytu může vést k procesu zvanému elektrodisperze. Když elektrická vodivost stoupá s rostoucí koncentrací analytu, pak intenzita elektrického pole a potažmo i rychlost naopak klesá. V případě že ionty elektrolytu putují rychleji než analyt, pronikají do jeho zóny a dochází k takzvanému chvostování píku (tailing) obr. 5A. V opačném případě bude docházet ke vzniku frontujícího píku (fronting) obr. 5B. Pokud elektrická vodivost elektrolytu odpovídá elektrické vodivosti vzorku, vzniká symetrický pík blížící se tvaru Gaussovského píku.



Obr. 5: Deformace píku způsobená elektromigrační disperzí, kde (A) je chvostující pík a (B) je frontující pík

1.1.11 Detekce

Detekce u elektromigračních metod může probíhat buďto on-line nebo off-line. V případě on-line detekce je detektor umístěn před koncem kapiláry. Někdy je nutné odstranit vrstvu polyimidu, kterým bývá skleněná kapilára pokryta k usnadnění manipulace a odvodu tepla. Tím získáme detekční okénko, pro průchod UV-VIS paprsku či fluorescenčního záření.

V případě vodivostního detektoru polyimid není nutné odstraňovat. Výše zmíněné online metody jsou společně s hmotnostní spektrometrií (offline detekce) nejčastěji používané způsoby detekce v CE.

1.1.12 Rozlišení

Rozlišení jednotlivých komponent vzorku je hlavním cílem separačních metod. Za kvalitní rozlišení se považuje rozlišení 1,5 a větší. Nejjednodušší způsob jak ho definovat je následující:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (14)$$

Kde t je migrační čas, w šířka píku a σ časová směrodatná odchylka.

1.2 Separační metody založené na elektroforéze

Všechny uvedené metody se používají v praxi, každá z nich má však jinou silnou stránku.

1.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Tato metoda je tou nejjednodušší verzí kapilární elektroforézy. Kapilára je naplněna elektrolytem (pufrem), vzorek je zaveden ze vstupní nádoby a je aplikováno elektrické pole. K separaci dochází díky odlišné mobilitě látek, putujících tak v samostatných zónách. Rozpuštěné látky s nábojem putují k elektrodě opačného znaménka, kdy malé silně nabitě ionty mají větší rychlost než ionty velké a s malým nábojem. Uplatňuje se zde i vliv EOF, díky tomu je možné separovat látky ať už nabitě kladně či záporně v průběhu jediné analýzy.

1.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Často používaná metoda například ve farmacii, potravinářství a při analýzách životního prostředí. Jednoznačnou výhodou této metody je možnost separace jak nabitých látek, tak látek neutrálních. Separace neutrálních částic je dosaženo použitím povrchově aktivních látek (tenzidů), které jsou rozpuštěny v pufru. Při dosažení kritické micelární koncentrace tenzidu dochází k tvorbě micel. Micely jsou často kulovité, tvořené hydrofobní částí směřující do středu a hydrofilní nabitou částí orientovanou směrem ven. Takto nabitě micelární částice putují buď ve směru nebo proti směru EOF v závislosti na jejich náboji. Během elektroforetické migrace se separované látky rozdělí mezi micely a pufr stejným způsobem jako v chromatografii pomocí hydrofobních i elektrostatických interakcí. Micely hrají roli stacionární fáze, ale na rozdíl od chromatografie se pohybují. U neutrálních látek řídí separaci odlišné rozdělovací koeficienty, popisující míru interakce s micelami. V době kdy rozpuštěná látka není uvnitř micely, je unášena elektroosmotickým tokem.

1.2.3 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Chromatografická metoda s využitím minimálního množství kapaliny a elektroosmotického toku k jejímu načerpání skrz kolonu. K separaci se používá stacionární fáze jako v HPLC. Po

aplikaci elektrického pole dochází k transportu mobilní fáze a analytu. Separace nenabitých látek je zajištěna rozdělováním mezi mobilní a stacionární fázi. Látky nesoucí náboj se pak rozdělují podobně jako při kapilární zónové elektroforéze (CZE).

1.2.4 Kapilární gelová elektroforéze (CGE)

Metoda používaná hlavně k separaci makromolekul na základě velikosti jako jsou proteiny či nukleové kyseliny. Aby mohly být proteiny takto separovány musí být nejprve denaturovány, což se děje pomocí dodecylsírany sodného (SDS), kdy makromolekuly získají záporně nabitě skupiny. Samotná separace pak probíhá elektroforézou rozpuštěných látek skrz vhodný polymer, který funguje jako molekulové síto. Bez něj by k separaci nedošlo, jelikož rozdíl v nábojích mezi jednotlivými proteiny, je nepatrný.

1.2.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Elektroforetická technika používaná k rozdělení peptidů a proteinů na základě jejich izoelektrického bodu (pI). V CIEF se v kapiláře vytvoří pH gradient pomocí amfolytů, které pokryjí požadovaný rozsah pH, kde se bazické látky rozprostírají směrem ke katodě a kyselé k anodě. Po aplikaci elektrického pole začnou peptidy a proteiny migrovat až dosáhnou k pH, jež odpovídá jejich pI. Při pH odpovídající hodnotě pI peptid či protein nenesou žádný náboj, tudíž se zastaví. Tento proces se nazývá fokusace.

1.2.6 Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza je vhodná k separaci kationtů i anionů. Za stálého proudu se kombinací elektrolytů získá systém, kde všechny rozpuštěné látky putují v oddělených zónách a stejnou rychlostí. Používají se tzv. vedoucí a koncové ionty, mezi nimiž putují látky určené k rozdělení. Pravidlem této techniky je, aby vedoucí ionty byly stejného znaménka jako analyt a s větší efektivní mobilitou a koncové naopak s nižší. K ustálení rychlosti dochází proto, že se v každé zóně mění intenzita elektrického pole. V důsledku toho pak vznikají ohraničené oblasti, protože v případě že iont difunduje do sousední zóny, jeho rychlost se změní, a tím se okamžitě vrátí zpět.

1.3. Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

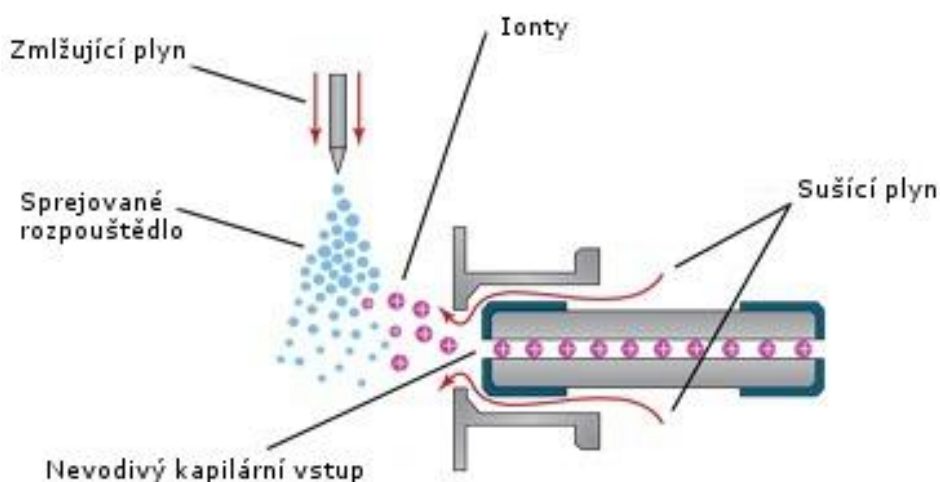
Hmotnostní spektrometrie (MS) je oblíbenou detekční technikou pro spojení s kapilární elektroforézou, protože navzájem kompenzují svá omezení [6, 7]. Například látky, které mají stejný průběh hmotnostního spektra, nemohou být rozlišeny pomocí MS, nicméně separační technika jako je kapilární elektroforéza tyto látky rozliší, což umožní následně i jejich detekci hmotnostní spektrometrií. Naopak látky, které CE nedokáže rozseparovat, může hmotnostní spektrometrie snadno rozlišit díky různým molekulovým hmotnostem nebo odlišné fragmentaci.

Stejně jako u kapalinové chromatografie i zde u CE je potřeba, při propojení s MS, vyřešit spojení kapalně fáze s detekční technikou probíhající ve vakuu. V případě kapilární elektroforézy je tento problém menší díky menším průtokům rozpouštědla. Ideální ionizační technikou se pro toto spojení stává elektrosprej (ESI), zejména proto, že vykazuje vysokou výtěžnost a citlivost. Další výhodou elektrospreje je fakt, že je výhodný pro ionizaci polárních a nabitých látek, kterými se většinou kapilární elektroforéza zabývá. Objevuje se však i nevýhoda tohoto spojení. Kapilární elektroforéza i elektrosprej jsou řízeny elektrickým polem, ale protékající proudy se mohou lišit i o několik řádů.

K tomu, aby se analyt přesunul z kapalně fáze do hmotnostního spektrometru, musí být převeden na plynné ionty. Následně se tyto ionty mohou stát ionty radikálovými kolizí s elektrony, fotony.

Analyt, opouštějící kapiláru průtokem několik nl za minutu, tvoří v elektrickém poli (napětí v rozmezí 2-5 kV) velice malé kapičky. Z těchto malých kapek se velmi snadno uvolňují neutrální molekuly rozpouštědla, čímž se snižuje jejich velikost a rapidně tak roste povrchový náboj. Poté kapky explodují a vytvoří tak ještě menší kapky, u nichž probíhá stejný proces. Nakonec zůstanou plynné ionty, některé nesou vícenásobný náboj, které vstupují do analyzátoru.

Průtok v rámci nanolitru za minutu je však pro elektrosprej nedostatečný. Potřebný průtok by měl být 1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$, toho lze docílit využitím pomocné kapaliny přiváděné do elektrospreje. Kromě toho tato kapalina může podporovat ionizaci a tvorbu kationtů či anionů nezávisle na pH elektrolytu. Většinou se jedná o vodný roztok methanolu, acetonitrilu nebo isopropanolu s přísadkou buď kyseliny octové nebo mravenčí a pro anionty amoniak. Mírnou nevýhodou je částečné ředění analytu.



Obr. 6: Schéma spojení CE s MS pomocí elektrospreje (převzato a upraveno) [8]

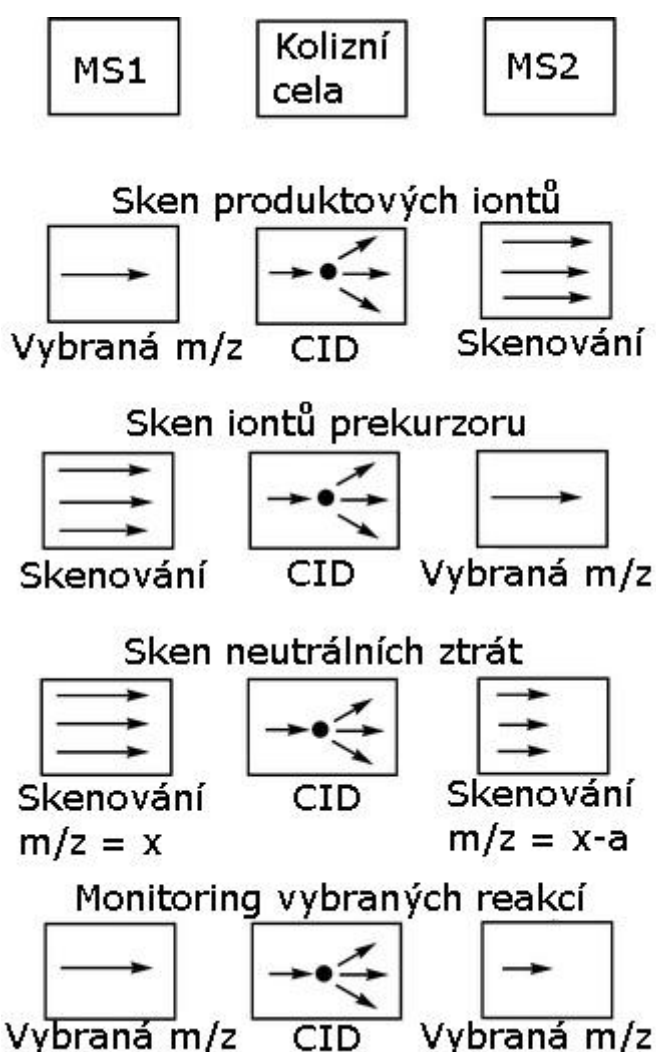
Pomocná kapalina teče vně kapiláry a na jejím konci se míchá s pufrem tekoucím v kapiláře a samozřejmě i analytem. Třetí trubicí proudí zmlžující plyn, což bývá nejčastěji dusík.

Elektrosprej je vhodnou ionizační metodou pro látky s velkou molekulovou hmotností, protože přecházejí v plynné ionty přímo z kapaliny a navíc mohou být vícenásobně nabité, čímž se sníží poměr hmoty k náboji (m/z), což umožňuje jejich analýzu, která je omezena právě hmotnostním rozsahem hmotnostního analyzátoru.

Ionty dále putují do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení podle poměru jejich hmotnosti k náboji. Jedním z několika typů je kvadrupól, který je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi kruhového průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí na druhé dvě naopak záporné a na všechny dohromady pak vysokofrekvenční střídavé napětí. Iont mezi těmito tyčemi prolétá a během toho začne oscilovat. Při určitém poměru napětí a amplitudy (U/V), je oscilace stabilní pro iont s daným poměrem m/z , který tak projde skrz kvadrupól až do detektoru. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Změnou hodnot poměru U/V lze postupně filtrovat všechny ionty ve zvoleném rozsahu poměru m/z .

Je možné zapojit i více kvadrupólů za sebou. Často používaný je trojitý kvadrupól (QqQ), kde první kvadrupól funguje jako klasický hmotnostní analyzátor, druhý jako kolizní cela, ve které dochází ke kolizí indukované disociaci v důsledku srážek s kolizním plynem (argon, helium). Vznikají tak dceřiné ionty analyzované ve třetím kvadrupólu. Lze pracovat v několika skenovacích módech. Jedním z nich je sken produktových iontů, kdy je v prvním kvadrupólu (Q1) selektován iont známé molární hmotnosti, který je dále fragmentován v Q2

a jeho fragmenty jsou pak skenovány v celém rozsahu m/z v Q3. V druhém módu probíhá sken iontů prekursoru. V Q3 je selektován iont, jehož prekurzory byly skenovány v Q1. Tento mód je selektivní pro ionty nesoucí určitou funkční skupinu, jež se odštěpí během fragmentace v Q2. Třetí mód skenování neutrálních ztrát sleduje ztrátu neutrální molekuly jako je např. H_2O , NH_3 apod. Poslední mód se týká skenování iontových reakcí, a to buď Selected reaction monitoring (SRM) nebo Multiple reaction monitoring (MRM). V Q1 je vybrán iont o určité hmotnosti, ten je dále fragmentován a produkt(y) reakce prekursoru je selektován v Q3, který je na jeho hodnotu nastaven (Obr. 7).



Obr. 7: Schéma skenovacích módů (převzato a upraveno) [9]

1.4 Syntetické kanabinoidy

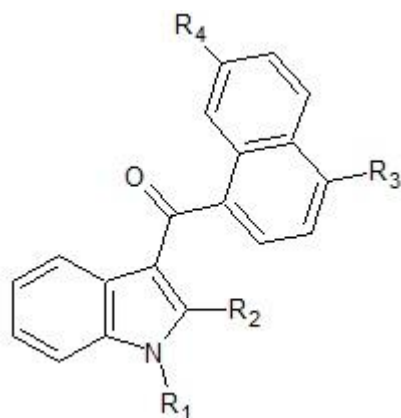
Marihuana je po mnoho let bohatě využívána v medicíně a k řekněme rekreačním účelům [10]. V dnešní době patří mezi nejčastěji produkovanou a spotřebovávanou ilegální drogou po celém světě. Její psychoaktivní účinky jsou způsobeny především přítomností delta-9-tetrahydrocannabinolu (Δ^9 -THC), který vykazuje částečnou agonistickou aktivitu na CB1 receptorech pro kanabinoidy, nacházejících se primárně v centrálním nervovém systému, a CB2 receptorech v periferním nervstvu. Akutní účinky jsou různorodé od příjemných až euforických k úzkosti a změně kognitivních schopností. Z fyzických je to pak nevolnost, pocení, bušení srdce, pálení očí. U dlouhodobého užívání nejsou prokázány vedlejší účinky, avšak existují spekulace o možnosti zvýšeného rizika vzniku psychózy stejně jako u marihuany. Od té doby, kdy byl objeven Δ^9 -THC, začaly být kanabinoidy syntetizovány pro výzkumné účely, jelikož tyto syntetické kanabinoidy byly schopny selektivně aktivovat kanabinoidové receptory, což slibovalo nové léčebné látky. Ještě do nedávné doby se vyskytovaly jen syntetické kanabinoidy vyrobené za tímto účelem, nyní se však již několik let objevují obdobné látky ve výrobcích, jako jsou „K2“ nebo „Spice“ (Obr. 8), kde jsou de facto jako legální alternativa marihuany. Přestože štítky výrobků jasně uvádějí „není pro lidskou spotřebu“, „pouze pro použití aromaterapie“, „kadidlo“ apod., jsou tyto výrobky užívány k získání Δ^9 -THC a jeho psychoaktivních účinků. Výroba, distribuce, či užívání těchto výrobků bylo donedávné doby zcela legální a nepostihnutelné. Spice i K2 byly volně k dispozici na e-shopech a pro svou snadnou dostupnost, intenzivní účinky a v neposlední řadě i obtížnou detekovatelnost standardizovanými testy na drogy, se staly populární a zájem o ně rapidně rostl.



Obr. 8: Balení výrobků Spice a K2 [11, 12]

Složení těchto bylinných směsí často obsahují bílý a modrý leknín, bílý a růžový lotos, méně často pak rostliny, které přirozené obsahují potenciální psychoaktivní látky jako jsou aporfiny. Další uvedené látky jsou mastné kyseliny a jejich estery (kyselina linolová, kyselina palmitová), amidy mastných kyselin (oleamid, palmitoylethanolamid), látky rostlinného původu (eugenol, thymol a příchutě, jako je acetyl vanilin), konzervační látky (benzyl benzoát) a aditiva (alfa-tokoferol). Spice výrobky mohou také mít vysoký obsah vitamínu E a často jsou kontaminovány β 2-adrenergním agonistou clenbuterolem, který může vést k sympatomimetickým účinkům (třes, tachykardie, úzkost). Vzhledem k nedostatku regulace, prodejci nejsou povinováni poskytovat informace o bezpečnosti či aktivních farmakologických činidlech. Testováním výrobků bylo zjištěno nespočet forem Spice výrobků, od prášků, přes kapaliny, po kouřící směsi. Rovněž se ukázalo, že se liší obsahy kanabinoidních složek a dávkami.

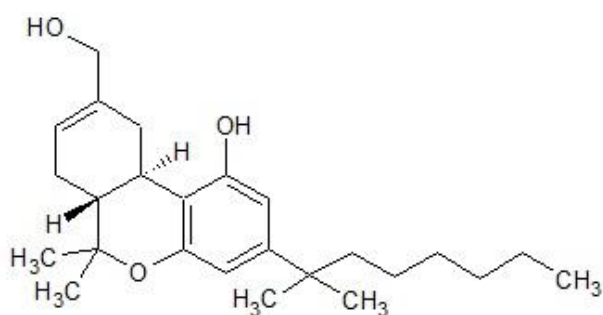
První syntetizované kanabinoidy patří do série JWH, pojmenované po jejich tvůrci John W. Hoffmanovi [13 - 41]. Vznikly spojením aminoalkylindolů s Δ 9-THC a jsou jedny z nejčastěji se vyskytujících syntetických kanabinoidů ve směsích Spice. JWH-018 (Obr. 9) byl mezi prvními zneužitými SK pravděpodobně proto, že je snadno syntetizován a má vysokou farmakologickou aktivitu. Mimo JWH se ve směsích vyskytují i jiné série syntetických kanabinoidů jako jsou například HU, vyvinuté na Hebrejské Univerzitě, CP vytvoření Pfizerem, jenž jsou odvozené od cyklohexylfenolu, nebo další založené na idolových derivátech – AM, syntetizované Alexandrem Makriyannisem. Konkrétně HU-210 (Obr. 10) je strukturně velmi podobný Δ 9-THC, jeho účinky jsou mnohem silnější, ovšem syntéza je náročnější. Naopak CP-47,497 (Obr. 11) je velice snadné syntetizovat a je považován za populární, jelikož si zachovává plnou agonistickou aktivitu na CB1 receptorech stejně jako jeho typický derivát CP-55,940 (Obr. 12). Testy in vitro naznačují, že syntetické kanabinoidy jako jsou výše zmíněné JWH-018, CP-47,497-C8 ale i JWH-015 a JWH-250, vykazují vyšší afinitu ať už k jednomu nebo oběma CB receptorům, než Δ 9-THC.



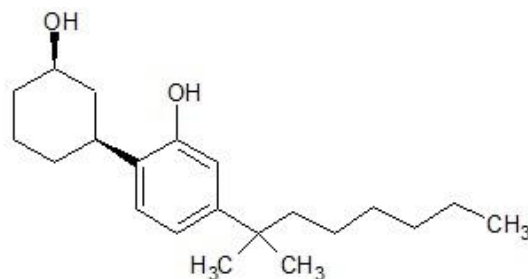
Deriváty Nafthylindolu

JWH-018	R1 = pentyl
JWH-073	R1 = butyl
JWH-398	R1 = pentyl, R3 = Cl
JWH-081	R1 = pentyl, R3 = OCH ₃
JWH-007	R1 = pentyl, R2 = CH ₃
JWH-019	R1 = hexyl
JWH-047	R1 = butyl, R2 = CH ₃ , R4 = CH ₃
JWH-122	R1 = pentyl, R3 = CH ₃
JWH-180	R1 = propyl, R3 = propyl
JWH-049	R1 = hexyl, R2 = CH ₃ , R4 = CH ₃
JWH-182	R1 = pentyl, R3 = propyl
JWH-213	R1 = pentyl, R2 = CH ₃ , R3 = ethyl

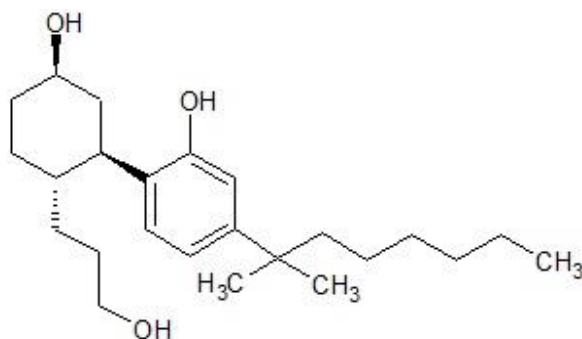
Obr. 9: Chemické struktury syntetických derivátů série JWH



Obr. 10: Chemická struktura HU-210



Obr. 11: Chemická struktura CP-47,497



Obr. 12: Chemická struktura CP-55,940

Komplexnější klasifikaci zveřejnil v roce 2009 Advisory Council on the Misuse of Drugs, kde dělí syntetické kanabinoidy do 6 základních skupin [10]:

1. Klasické kanabinoidy (strukturně podobné látce THC např. HU-210, AM-906, AM-411).
2. Neklasické kanabinoidy (cyklohexylfenoly nebo 3-arylcyklohexanoly např.: CP-47,497-C8, CP-55,940, CP-55,244).
3. Hybridní kanabinoidy (kombinace struktur ze skupiny 1 a 2 př. AM-4030).
4. Aminoalkylindoly dále dělitelné na: naftoylindoly (JWH-018), fenylacetylindoly (JWH-250), naftylmethylindoly a benzoylindoly (AM-694).
5. Eikosanoidy (endokanabinoidy a jejich analogy např. methanandamid).
6. Jiné (diarylpyrazoly, naftoylpyrroly (JWH - 307), naftylmethylindeny nebo derivátynaftalen-1-yl-(4-pentyloxynaftalen-1-yl)methanolu (CRA - 13)).

Největší problematikou okolo distribuce a prodeje výrobků Spice je, že se jeho složení rychle obměňuje. Dochází ke vzniku dalších a dalších derivátů (např. JWH-081, JWH-122, JWH-210 a AM-2201) ve snaze pokračovat v prodeji ve chvíli, kdy původní látka bude zakázána. Některé substance zmizí z trhu po několika měsících, jednoduše dřív než jsou k dispozici referenční standardy potřebné k analýze.

Přes drobné úpravy chemické struktury jsou všechny syntetické kanabinoidy lipofilní, nepolární a vysoce těkavé látky. Poslední zmíněná vlastnost nabízí možnost stanovení těchto látek pomocí plynové chromatografie, vedle této metody se pro stanovení komponent ve směsi hojně užívá kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, nebo maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace s analyzátozem doby letu. Je však nutné zdůraznit, že se jednalo o analýzy směsí nikoli biologických vzorků, u nichž je analýza komplikovanější v důsledku nepatrných strukturních rozdílů mezi jednotlivými látkami ve směsích Spice. Druhým zásadním problémem je nedostatek referenčního materiálu. Nicméně detekce původních forem a metabolitů v tělních tekutinách je nezbytná pro forenzní, vědecké a léčebné účely. Doposud se v séru nejčastěji měřil JWH-018 a jemu podobné syntetické kanabinoidy pomocí kapalinové chromatografie (LC-MS). Stále ale roste poptávka po rychlejší, účinnější a méně nákladné analytické metodě, kterou může být právě třeba micelární elektrokinetická chromatografie.

2 Experimentální část

2.1 Instrumentace

Veškeré analýzy byly prováděny na přístroji Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS s ionizací elektrosprejem. Pomocná kapalina byla dávkována pomocí isokratické pumpy Agilent 1260. Využívaným softwarem pro sběr dat a jejich vyhodnocení byl Agilent MassHunter B.06.00.

Separace probíhaly v nepokrytých křemenných kapilárách o délkách 71, 59 a 60 cm o vnitřním průměru 50 μm . Každá nově použitá kapilára byla promyta 0,1 M roztokem hydroxidu sodného po dobu 10 minut, poté byla promývána dalších 10 minut deionizovanou vodou a nakonec aktuálně používaným pufrům rovněž 10 minut. Teplota kapiláry byla temperována na 25 °C. Každá analýza byla opakována třikrát, není-li uvedeno jinak.

2.2 Chemikálie

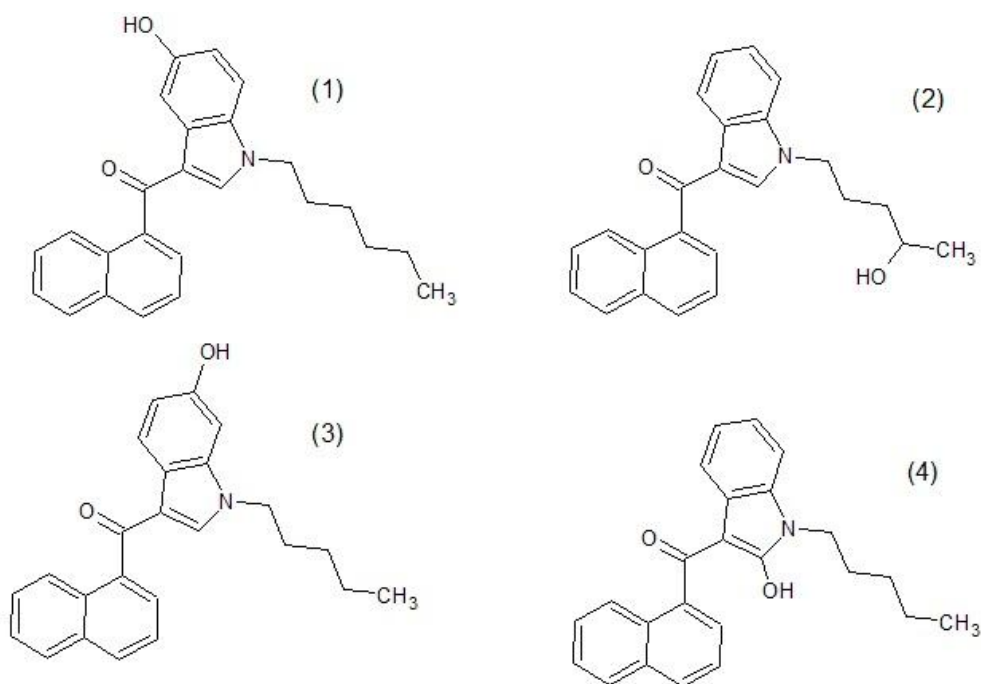
K dispozici byly standardy čtyř metabolitů syntetických kanabinoidů (Obr. 13):

JWH-019-5-hydroxyindol metabolit (1)

JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolit (2)

JWH-018-6-hydroxyindol metabolit (3)

JWH-018-2-hydroxyindol metabolit (4)



Obr. 13: Chemické struktury vybraných standardů

Všechny standardy obsahují v chemické struktuře dusíkový atom, schopný tvořit kladný náboj. V důsledku tohoto faktu bylo možno pracovat ve stejném módu ionizace.

Příprava pufru

Při přípravě pufru s obsahem perfluorované kyseliny, ať už oktanové či heptanové bylo nutno dodržovat přesný postup úkonů. Pro názornost bude uvedena příprava 5 ml pufru 100 mM PFOA/200 mM NH_4OH : Bylo naváženo 0,18203 g kyseliny perfluoroktanové, ke které bylo připipetováno 150 μl hydroxidu amonného. Směs byla promíchávána na vortexu, dokud se nezačala tvořit pěna. Poté bylo přidáno 4850 μl deionizované vody a hotový pufr byl ponechán 10 minut v ultrazvuku k odstranění vzniklých bublinek, jelikož PFOA je tenzid a silně pění.

3 Výsledky a diskuze

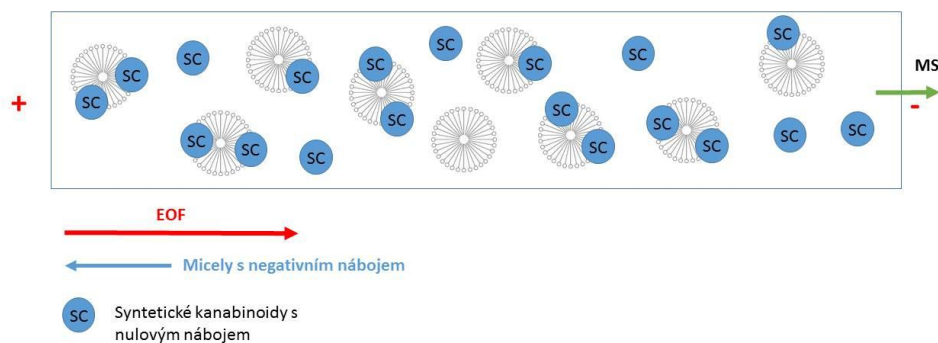
3.1 Optimalizace metody

3.1.1 Složení pufru

První experimenty byly prováděny klasickou kapilární zónovou elektroforézou s využitím těkavého pracovního elektrolytu 50 mM acetátu amonného o pH 5. Během analýzy však docházelo ke kolísání elektrického proudu během separace. Další studovaný elektrolyt byl 50 mM roztok kyseliny octové ve vodě o pH 3. Nicméně elektrický proud byl stále nestabilní a během analýzy i nadále kolísal, což bylo zřejmě způsobeno velmi nízkou rozpustností analytů ve vodě. Na základě uvedených skutečností byla zvolena micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s využitím elektrolytu obsahující tenzid. Jedním z velice často používaných tenzidů je dodecylsírán sodný (SDS). V tomto případě jej však není možné použít, protože není těkavý a docházelo by ke kontaminaci iontového zdroje a snižování účinnosti ionizace a citlivosti detekce. Z toho důvodu je nutné použít tenzid s dostatečnou těkavostí, což jsou například perfluorované kyseliny. Perfluorované karboxylové kyseliny splňují podmínku dostatečné těkavosti a dále tvoří micely, které ovlivňují selektivitu separace. Studována byla kyselina perfluoroktanová a perfluoroheptanová. Při využití mechanismu MEKC je nutné, aby pH pracovního elektrolytu bylo bazické, tak aby byl EOF dostatečně rychlý a unášel micely tenzidu směrem k detektoru. V tomto případě probíhá separace při pozitivní polaritě.

Studována byla tedy kyselina perfluoroktanová (PFOA) jako micelární složka s hydroxidem amonným pro dosažení bazického pH. Základní koncentrace tohoto pufru byla zvolena 100 mM kyselina perfluoroktanová a 200 mM hydroxid amonný. Dále byly studovány i koncentrace 80 mM PFOA/200 mM NH₄OH a 120 mM PFOA/200 mM NH₄OH, ale i přes četné úpravy parametrů jako bylo dávkování, pozitivní tlak během analýzy nebo napětí, elektrický proud i nadále v průběhu separace kolísal. Nakonec byl použit pufr z kyseliny perfluoroheptanové (PFHA), kde jako nejvhodnější koncentrace byla zvolena 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH.

Využití perfluorheptanové kyseliny poskytovalo mnohem lepší selektivitu separace studovaných syntetických kanabinoidů a dále mnohem stabilnější sprejování a vyšší poměr signálu k šumu než v případě PFOA. PFHA v koncentraci 100 mM tvoří micely a separace probíhá mechanismem MEKC (Obr. 14).



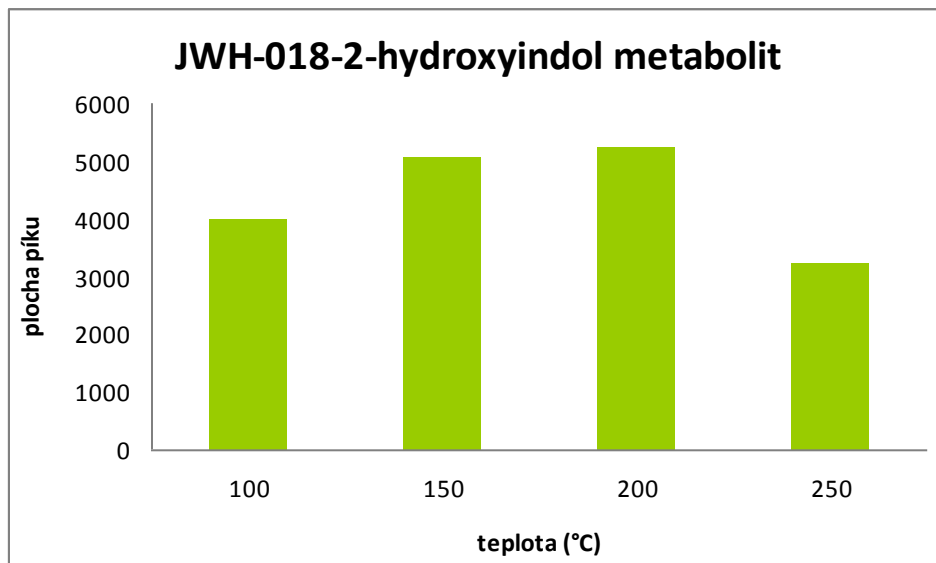
Obr. 14: Mechanismus separace micelární elektrokinetické chromatografie

3.1.2 Optimalizace MS detekce

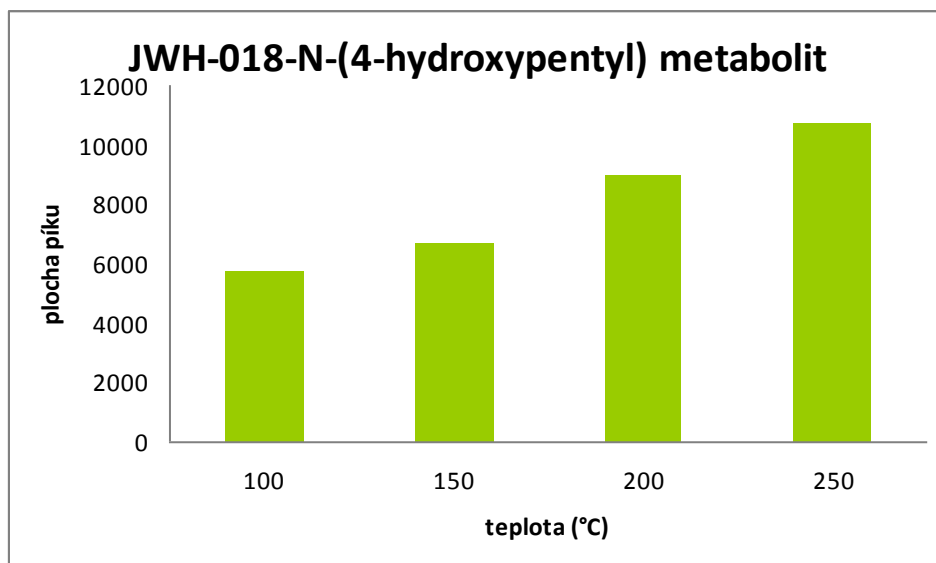
Parametry ionizace a detekce v hmotnostním spektrometru ovlivňují účinnost ionizace a citlivost detekce analytů po jejich separaci. Studován byl vliv teploty zmlžujícího plynu, vliv sprejovacího napětí, vliv průtoku zmlžujícího plynu, vliv průtoku a složení pomocné sprejovací kapaliny.

Optimalizace teploty zmlžujícího plynu

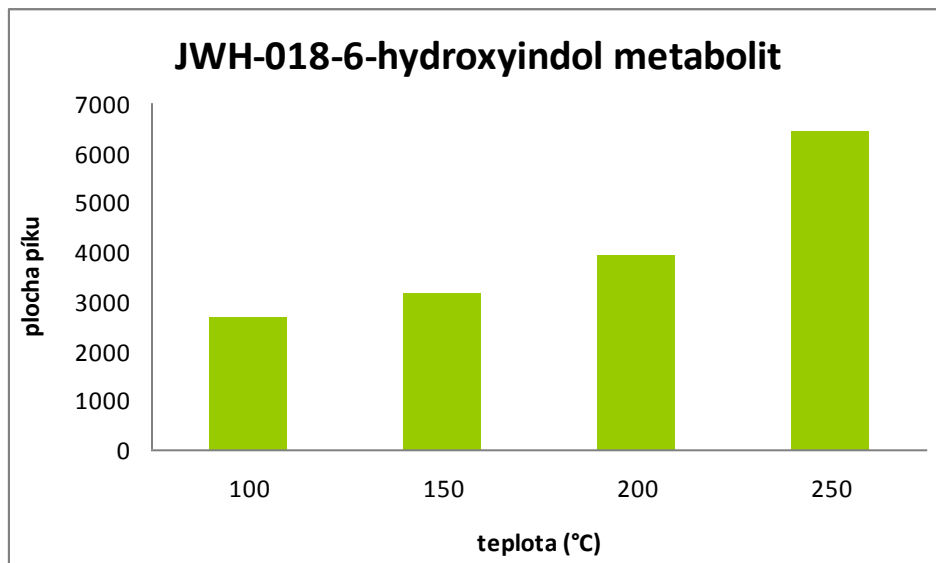
Po nalezení vhodného složení pufru byla studována optimální teplota při sprejování. Směs čtyř syntetických kanabinoidů byla podrobena separaci při několika odlišných teplotách zmlžujícího plynu. Nejvhodnější pak byla ta, při které docházelo k dostatečné separaci všech 4 látek s největší odezvou. Testované teploty byly: 100, 150, 200 a 250 °C (Obr. 15 – 17).



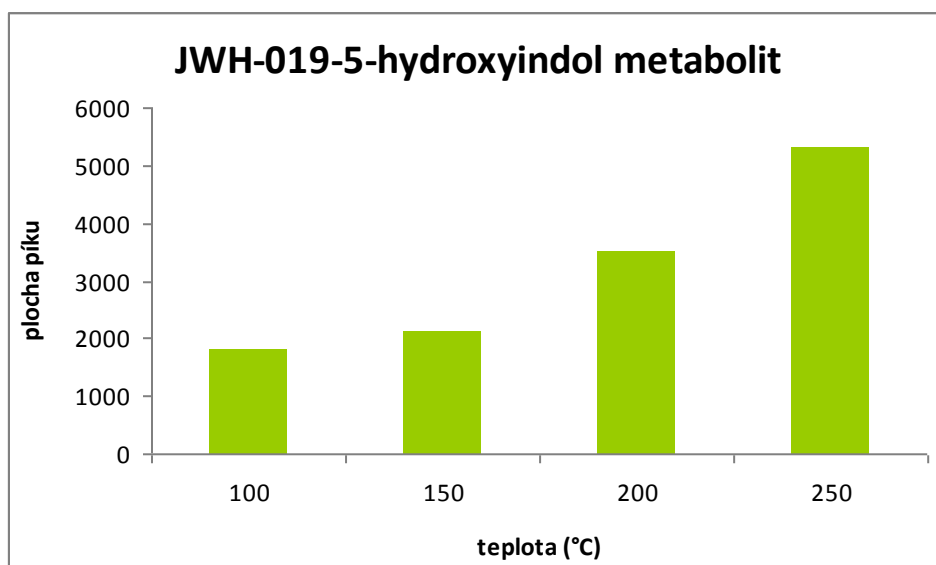
Obr. 15: Vliv teploty na plochu píku JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 3000 V, průtok pomocné kapaliny 0,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH



Obr. 16: Vliv teploty na plochu píku JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 3000 V, průtok pomocné kapaliny 0,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH



Obr. 17: Vliv teploty na plochu píku JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 3000 V, průtok pomocné kapaliny 0,6 μ l/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH

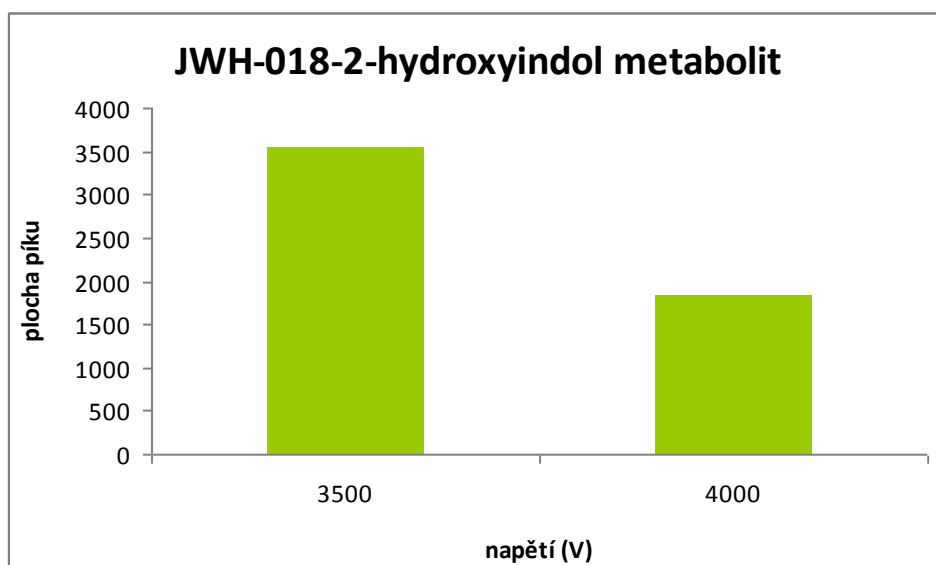


Obr. 18: Vliv teploty na plochu píku JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 3000 V, průtok pomocné kapaliny 0,6 μ l/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH

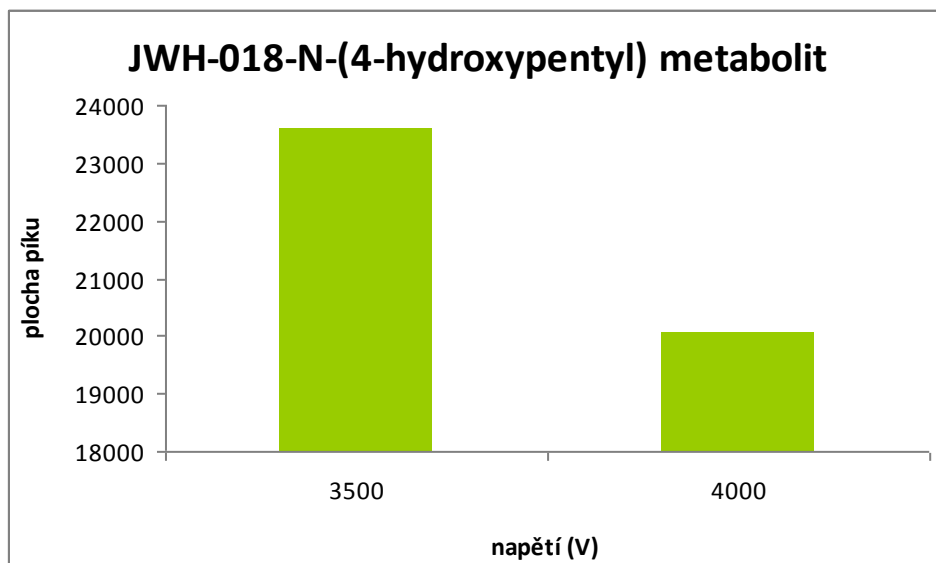
Přestože plocha píku byla u tří ze čtyř syntetických kanabinoidů největší při teplotě 250 °C, pro následující analýzy byla jako nejideálnější teplota zvolena 200 °C, jelikož při teplotě 250 °C byla výrazně horší opakovatelnost odezvy.

Optimalizace sprejovacího napětí na kapiláře

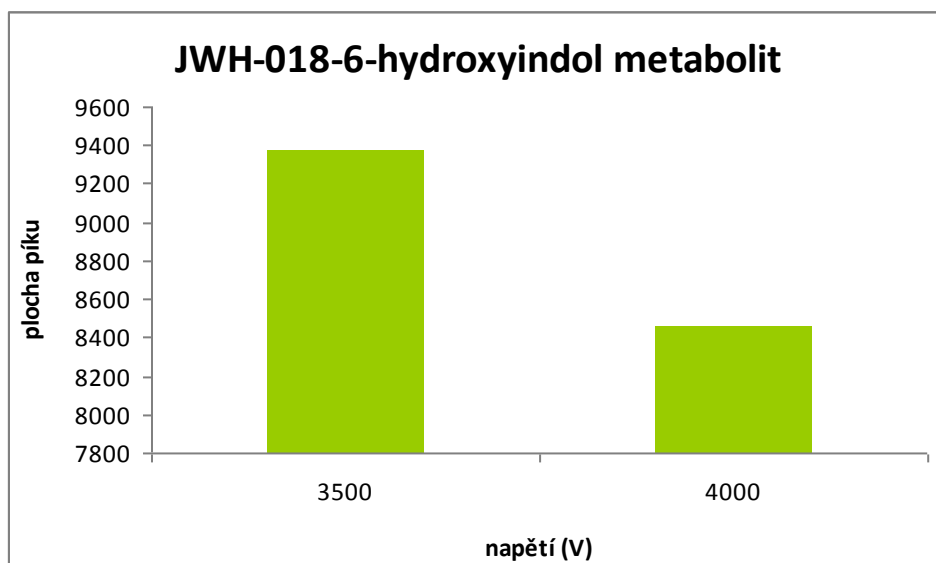
Dalším optimalizovaným parametrem bylo napětí na kapiláře. Zvoleno bylo rozmezí od 2000 V po 4000 V. Napětí bylo postupně zvyšováno po 500 V. Analýzy probíhající při 2000 a 2500 V byly neúspěšné v důsledku kolísajícího elektrického proudu. Vliv napětí na plochu píku separovaných analytů je patrný z obrázků 19 – 22.



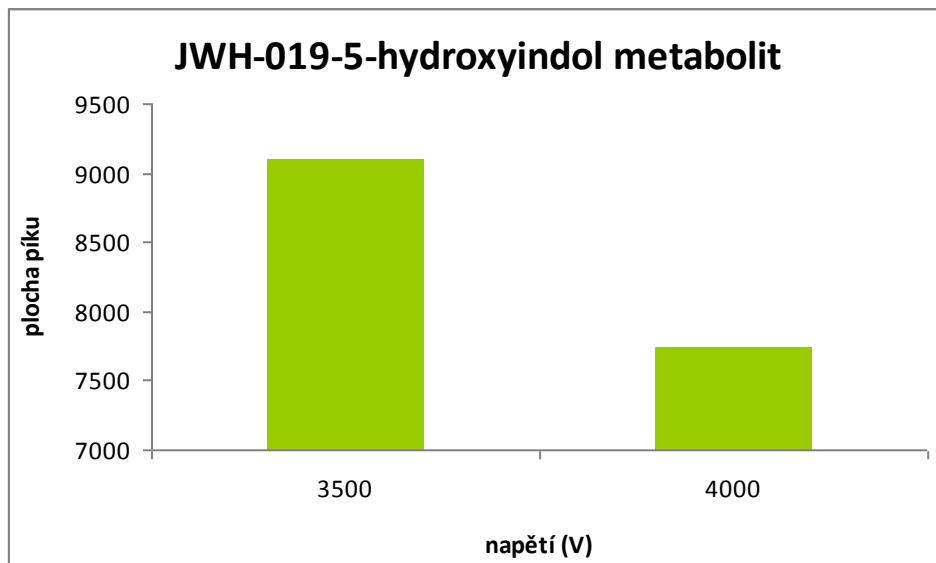
Obr. 19: Vliv napětí na kapiláře na plochu píku JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 200 °C, průtok pomocné kapaliny 0,6 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 20: Vliv napětí na kapiláře na plochu píku JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 200 °C, průtok pomocné kapaliny 0,6 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 21: Vliv napětí na kapiláře na plochu píku JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 200 °C, průtok pomocné kapaliny 0,6 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH

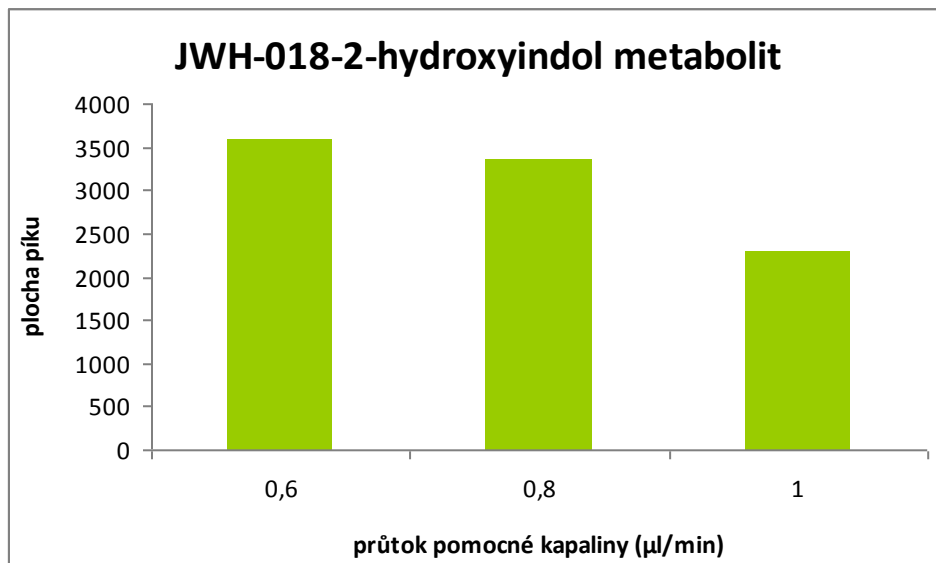


Obr. 22: Vliv napětí na kapiláře na plochu píku JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 59 cm, 200 °C, průtok pomocné kapaliny 0,6 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH

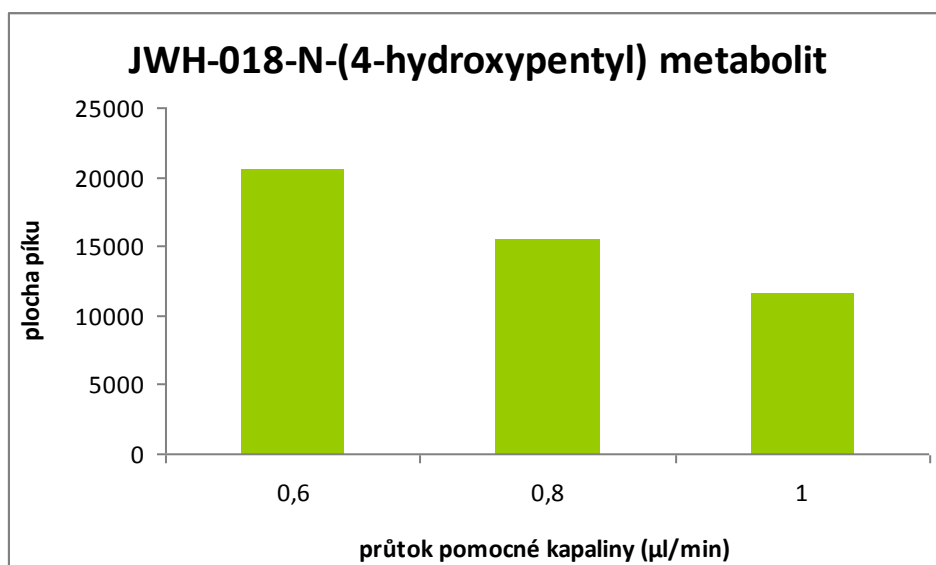
Jak již bylo zmíněno výše, separace při napětí 2000 a 2500 V byly neúspěšné, proto nebyly do vyhodnocení zahrnuty. Všechny naměřené analyty poskytovaly nejlepší odezvu při hodnotě 3500 V. Při 4000 V byla odezva rovněž přijatelná, nicméně byla podstatně nižší, a proto byla zvolena pro následující analýzy hodnota 3500 V.

Optimalizace průtoku pomocné kapaliny

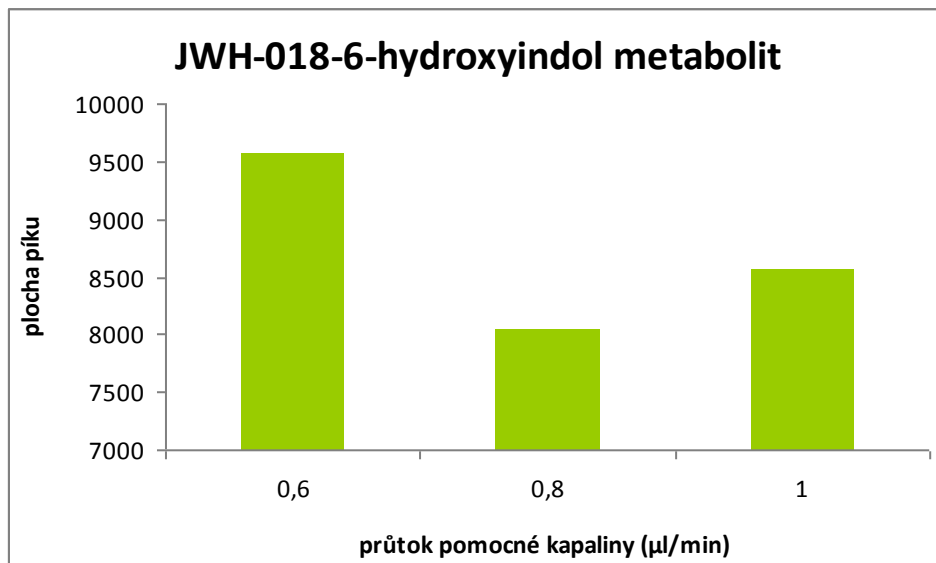
Jako pomocná kapalina (PK) se v tomto případě používala směs methanolu, denionizované vody a kyseliny mravenčí v poměru 50:49,5:0,5 (v/v/v). Během prvních analýz byl navolen průtok pomocné kapaliny na 0,6 µl/min, nicméně v průběhu optimalizace jiných parametrů byl průtok upravován na vyšší hodnoty, které napomáhaly dosažení stabilního elektrického proudu. Testován byl tedy hlavně průtok 0,8 µl/min a 1 µl/min (Obr. 23 - 26).



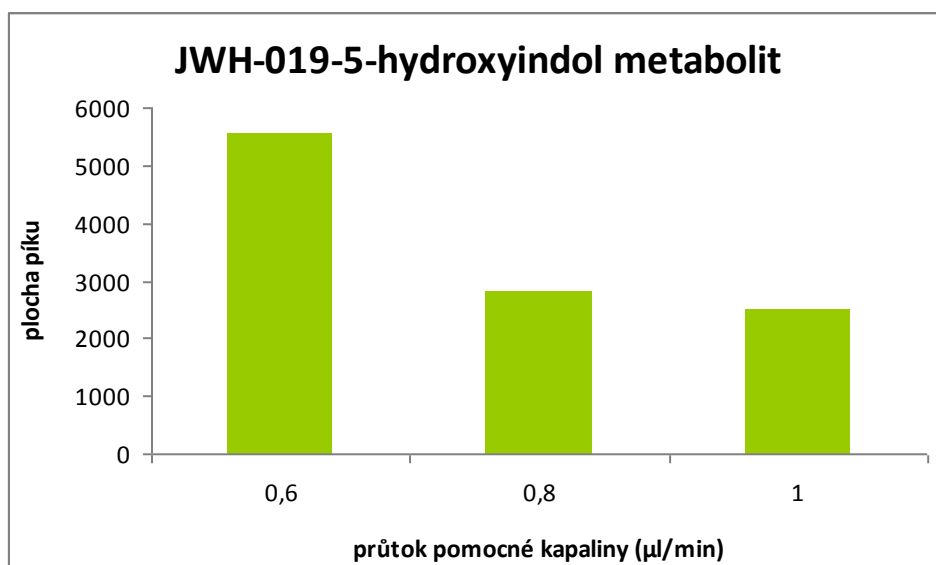
Obr. 23: Vliv průtoku PK na plochu píku JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 24: Vliv průtoku PK na plochu píku JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 25: Vliv průtoku PK na plochu píku JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH

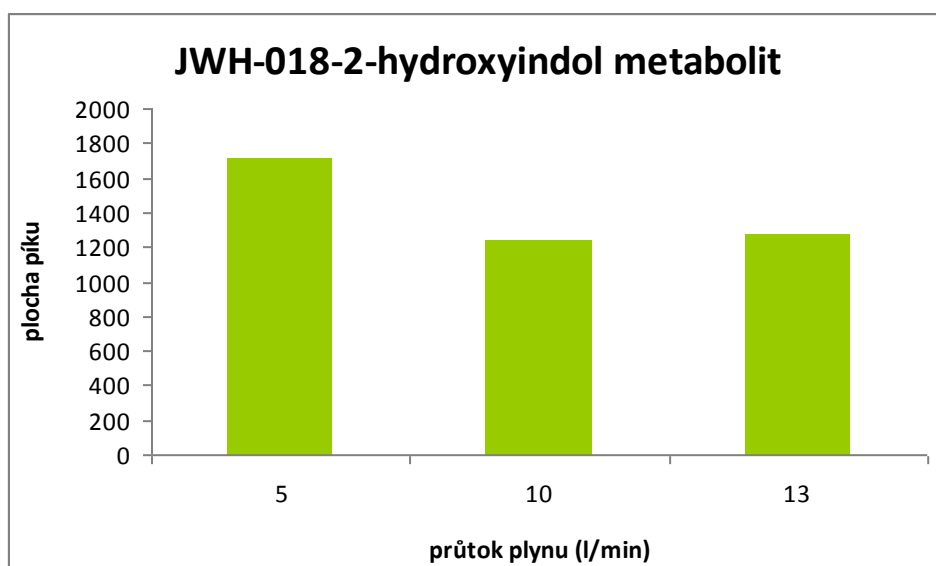


Obr. 26: Vliv průtoku PK na plochu píku JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH

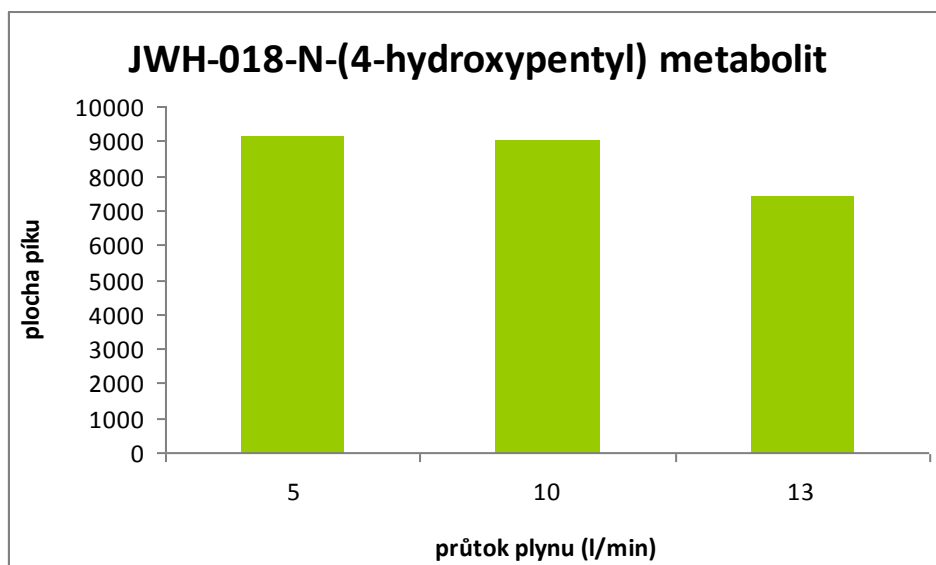
Přestože dle obrázků 23 - 26 vypadá průtok 0,6 µl/min jako nejlepší, není tomu tak, jelikož protékající proud během analýzy nebyl stabilní. Proto bylo voleno mezi zbývajících dvěma průtoky, z nichž lepší odezvu ve většině případů poskytoval průtok 0,8 µl/min.

Optimalizace průtoku zmlžujícího plynu

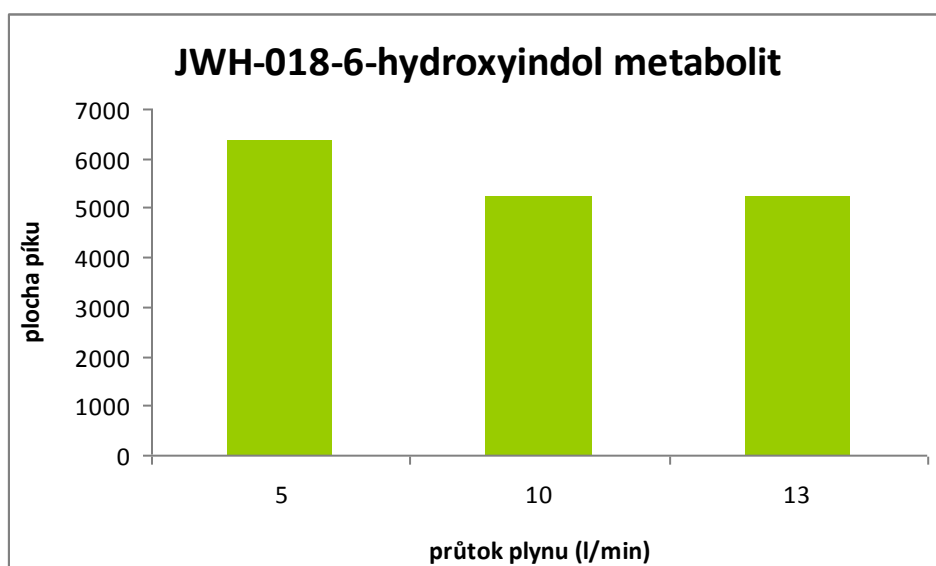
Poslední z optimalizovaných parametrů byl průtok zmlžujícího plynu (ZP), kterým zde byl dusík. Standardně používaný průtok plynu je 10 l/min, analýzy však byly vyzkoušeny i při průtocích 5 a 13 l/min (Obr. 27 – 30).



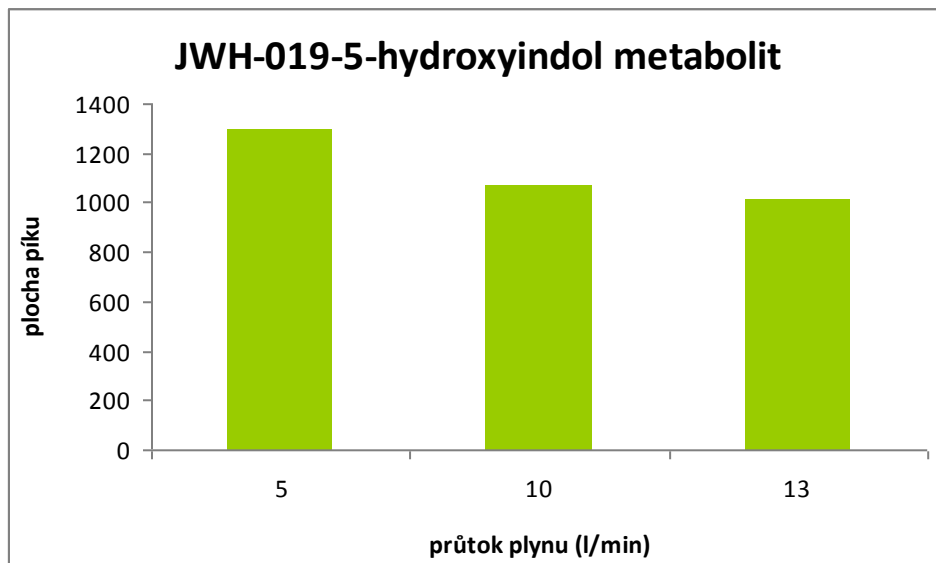
Obr. 27: Vliv průtoku ZP na plochu píku JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 µl/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 28: Vliv průtoku ZP na plochu píku JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 μ l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH



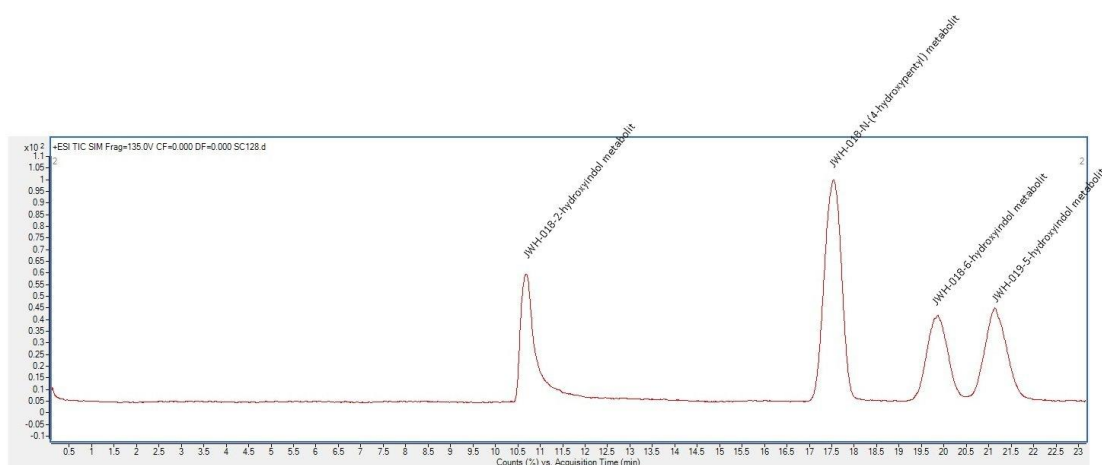
Obr. 29: Vliv průtoku ZP na plochu píku JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 μ l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH



Obr. 30: Vliv průtoku ZP na plochu píku JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 μ l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH

Standardní průtok se nakonec skutečně ukázal jako nejvhodnější i přesto, že největší plochy píku byly dosaženy při hodnotě 5 l/min. Avšak stejně jako u předchozích parametrů bylo důležité sledovat kvalitu separace, jež při průtoku 5 l/min nebyla dostačující. Optimální průtok plynu tedy byl 10 l/min.

Po optimalizaci všech parametrů bylo separováno několik roztoků směsi syntetických kanabinoidů o různých koncentracích při optimálních podmínkách, což byly: 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min. Ostatní parametry: délka kapiláry byla 60 cm, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, separační napětí 12 kV, elektrolyt 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH (Obr. 31).



Obr. 31: Separace směsi SK, $c = 0,002$ mg/ml, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 µl/min, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH

Opakovatelnost

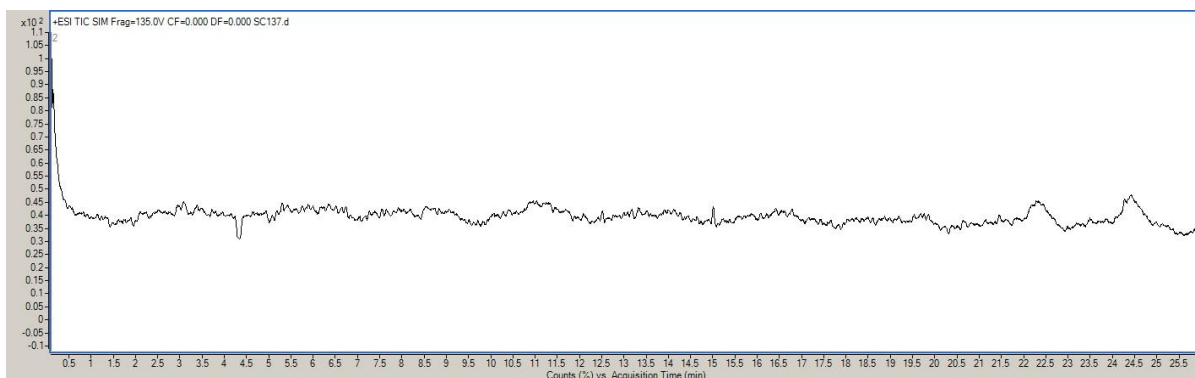
Po nalezení všech optimalizovaných parametrů byla vypočítána opakovatelnost migračních časů (Tab. 1).

Tab. 1: Opakovatelnost migračního času

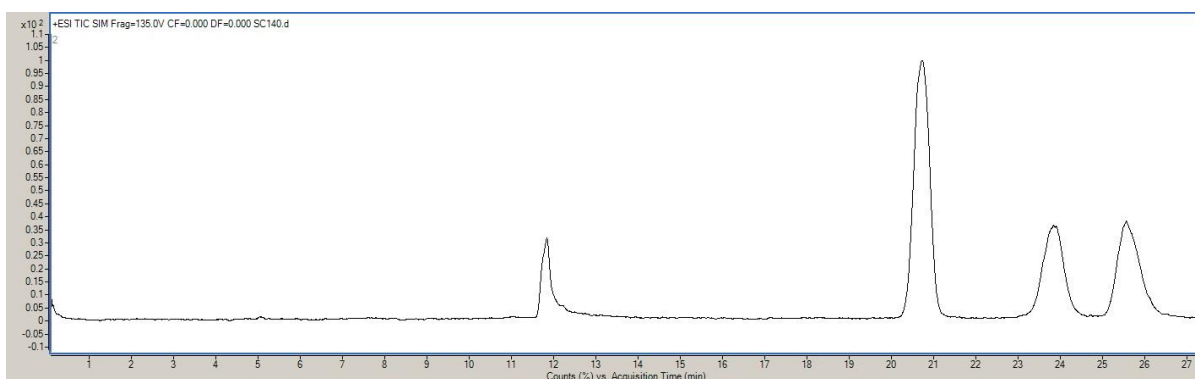
Syntetický kanabinoid	teplota		napětí		průtok PK		průtok ZP	
	\bar{t}_m (min)	RSD (%)	\bar{t}_m (min)	RSD (%)	\bar{t}_m (min)	RSD (%)	\bar{t}_m (min)	RSD (%)
JWH-018-2-hydroxyindol metabolit	10,49	3,95	10,16	1,47	10,68	1,4	10,84	2,4
JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolit	13,16	5,26	14,24	2,42	14,51	2,6	14,96	5,2
JWH-018-6-hydroxyindol metabolit	18,91	7,56	19,16	3,49	18,11	0,83	18,35	4,33
JWH-019-5-hydroxyindol metabolit	20,04	8,21	21,53	3,96	19,34	1,72	19,53	5,22

Analýza reálného vzorku

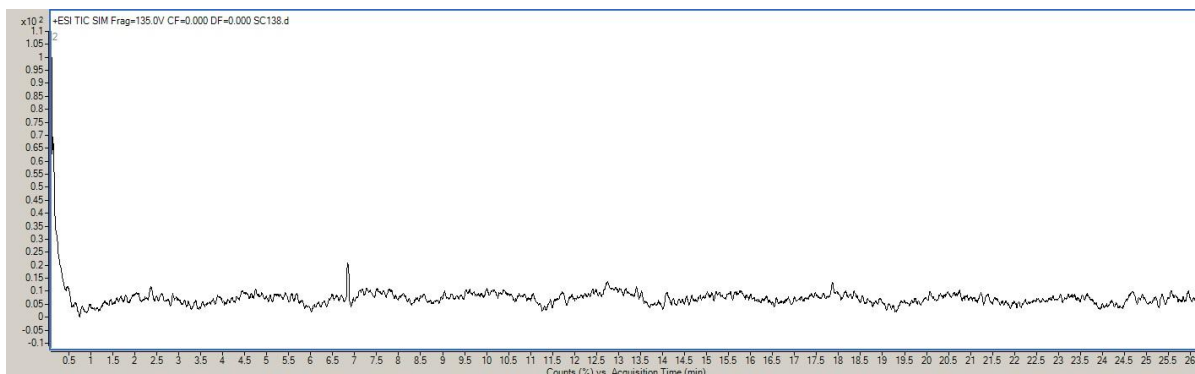
Vzorek moči byl přefiltrován přes injekční filtr (0,22 μ l/25 mm). Posléze byl 10x a 100x naředěn 100 mM PFHA/200 mM NH_4OH puforem. Tato naředěná moč byla proměřena jakožto blank. Jelikož nebyl k dispozici vzorek reálného uživatele syntetických kanabinoidů, do získaného naředěného vzorku moči byla přidána směs kanabinoidů a jejich koncentrace v daných vzorcích byla 0,002 mg/ml a vznikly tzv. spiky. Tyto spiky byly proměřeny a porovnány s blankem (Obr. 32 – 35).



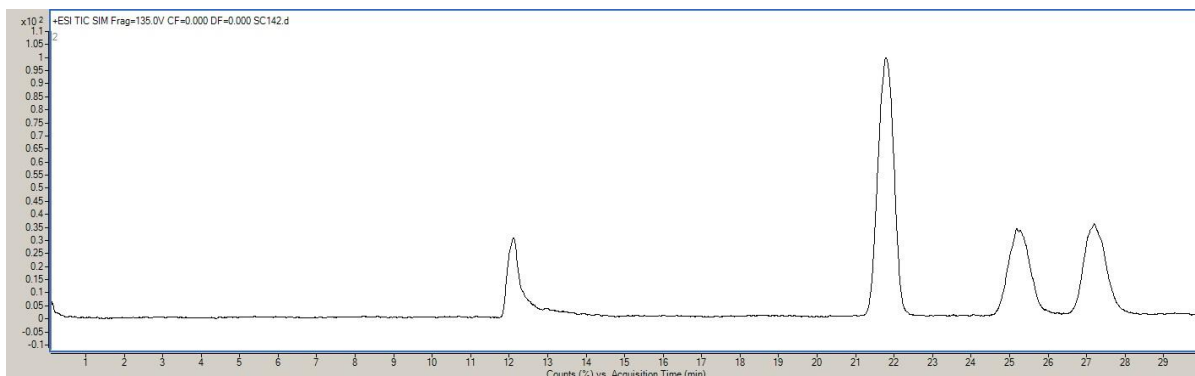
Obr. 32: Analýza blanku (10x ředěná moč), podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 μ l/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 33: Analýza ospikované moči (10x ředěná) o $c = 0,002$ mg/ml, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 μ l/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 34: Analýza blanku (100x ředěná moč), podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH



Obr. 35: Analýza ospikované moči (100x ředěná) o $c = 0,002$ mg/ml, podmínky měření: délka kapiláry 60 cm, 200 °C, 3500 V, průtok pomocné kapaliny 0,8 µl/min a průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, separační napětí 12 kV, dávkování 100 mbar/10 s, pozitivní tlak během analýzy 10 mbar, elektrolyt: 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH

Po analýze blanku a vzorků ospikované moči byl sledován vliv matrice (moči) na vliv separace a detekce syntetických kanabinoidů v reálném vzorku. Z výše uvedených obrázků je patrné, že vliv matrice je minimální a kvalita separace i detekce byla zachována.

3.2 Kalibrace

Pro kalibraci metody byly vybrány koncentrace standardů 0,0001; 0,0002; 0,005 a 0,01 mg/ml. Každá koncentrace byla proměřena při optimálních podmínkách (Tab. 2).

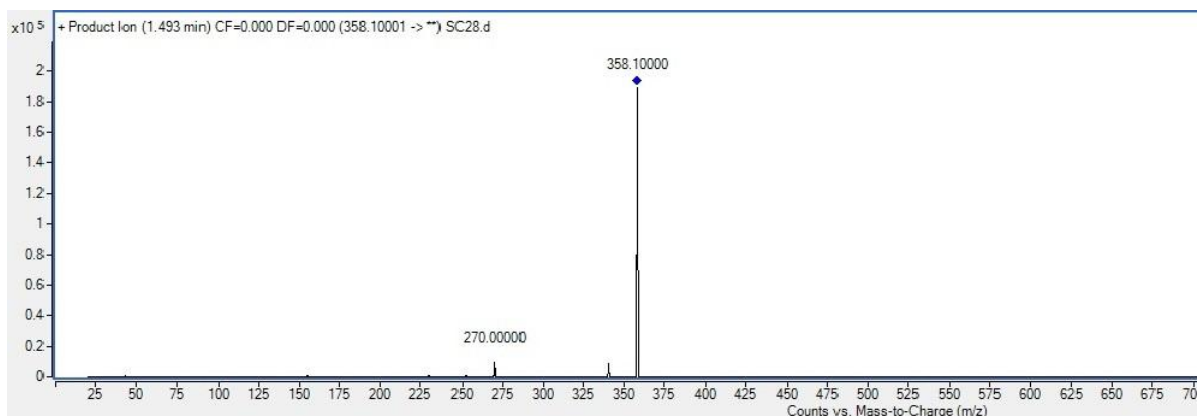
Tab. 2: Kalibrační parametry

	Rovnice regrese	R ²	LOD	LOQ
JWH-018-2-hydroxyindol metabolit	$y = 1680,4x - 1823,2$	0,9976	29 ng/mL	96 ng/mL
JWH-018-N-(4- hydroxypentyl) metabolit	$y = 14124x - 9302$	0,9963	30 ng/mL	98 ng/mL
JWH-018-6-hydroxyindol metabolit	$y = -6341,5x - 6247,2$	0,9733	26 ng/mL	88 ng/mL
JWH-019-5-hydroxyindol metabolit	$y = 4037,8x - 1384,9$	0,9998	26 ng/mL	88 ng/mL

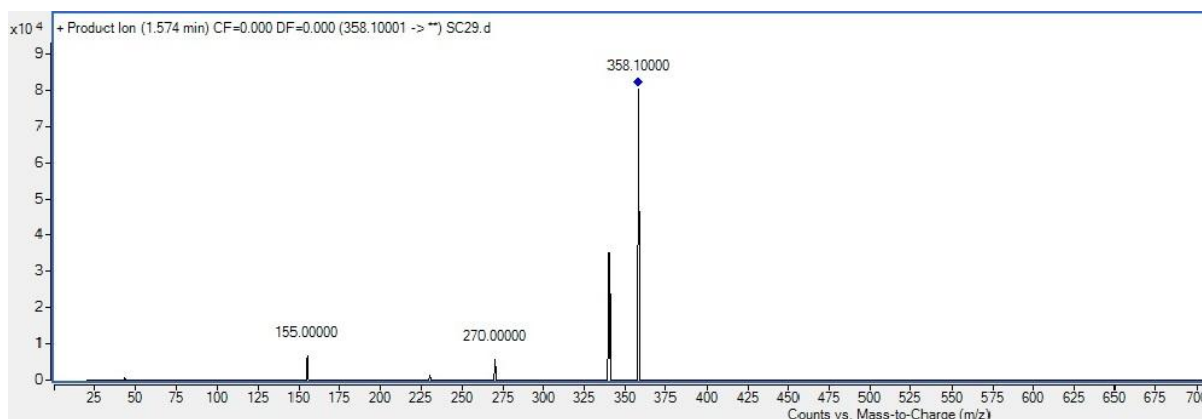
LOD odpovídá poměru S/N = 3 a LOQ odpovídá poměru S/N = 10.

3.3 Kolizní energie a fragmentace analytů

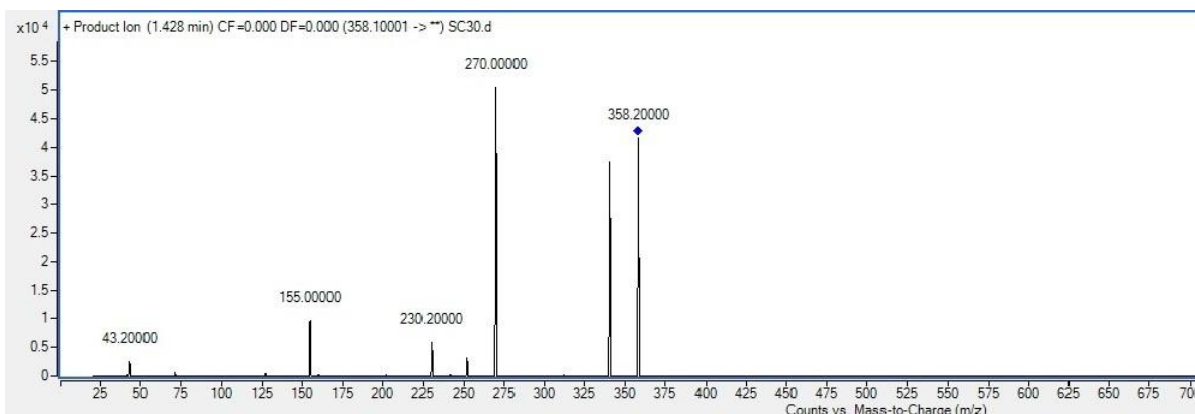
Byl studován vliv velikosti kolizní energie na vznik fragmentů a jejich intenzitu ve fragmentačním spektru. Velikost kolizní energie se pro každý měřený metabolit syntetického kanabinoidu pohybovala od 5 eV po 25 nebo 30 eV v závislosti na tom, kdy došlo k úplnému rozbití původní molekuly. Pro každý z metabolitů byl vytvořen návrh struktur fragmentů založený na fragmentačním spektru nejvyšší nebo druhé nejvyšší kolizní energie (Obr. 36-65). Získaná spektra mohou být dále použita pro vytvoření knihovny spekter k identifikaci daných syntetických kanabinoidů.



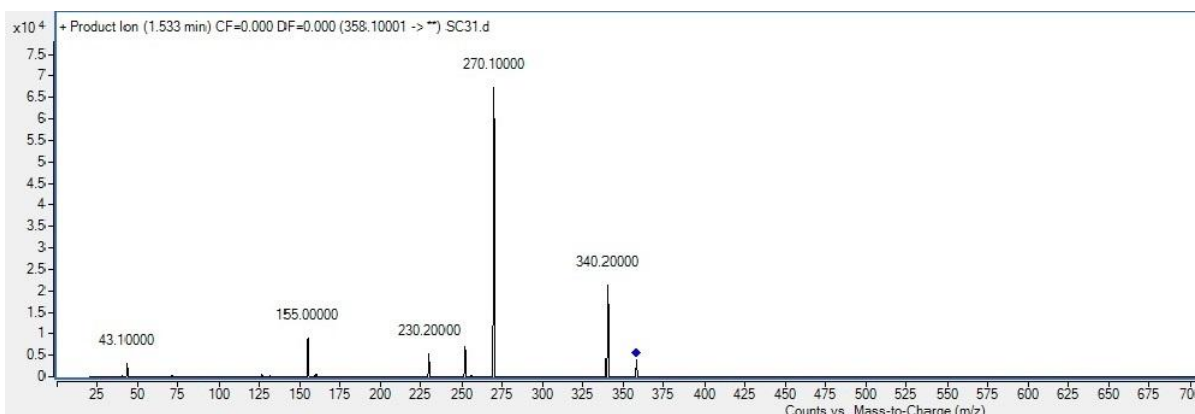
Obr. 36: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 5 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



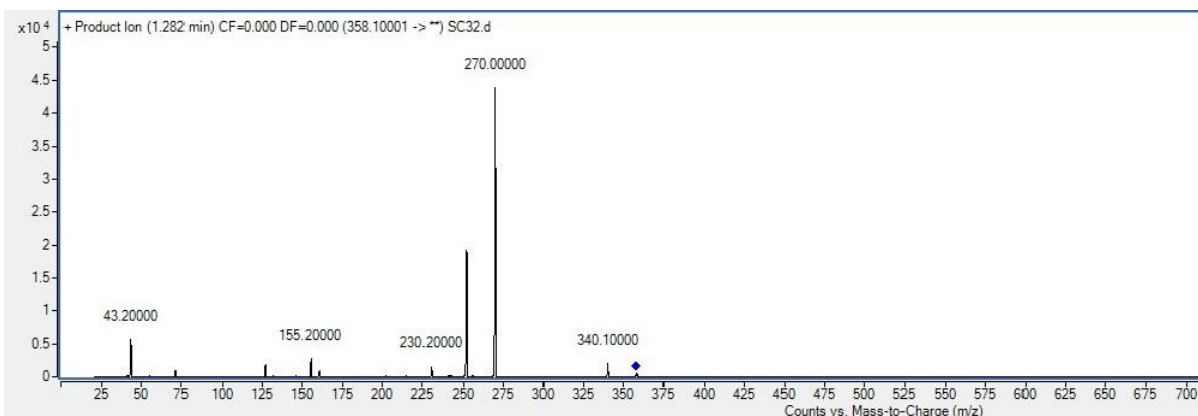
Obr. 37: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 10 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



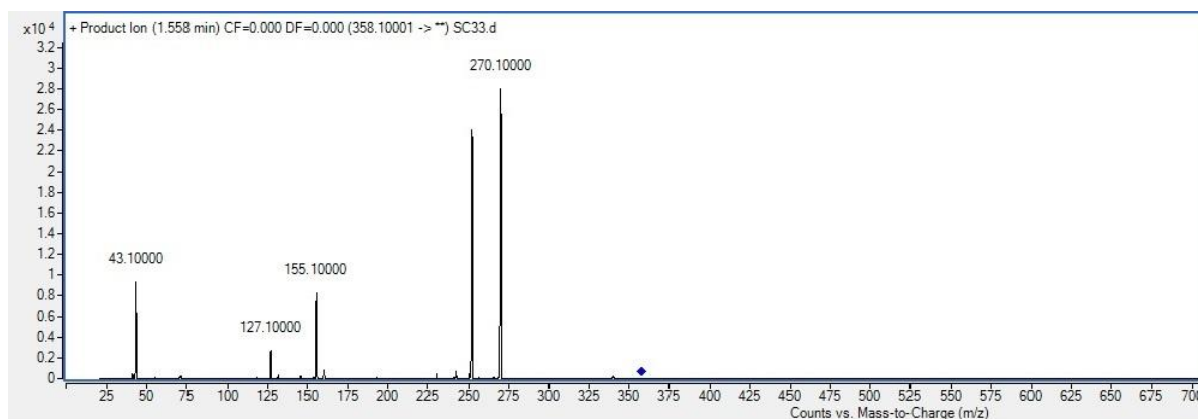
Obr. 38: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 15 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



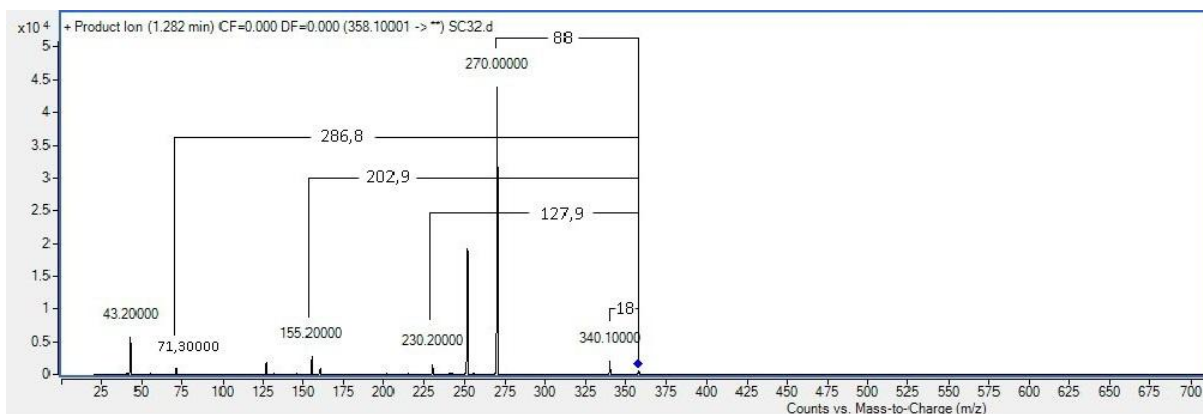
Obr. 39: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 20 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



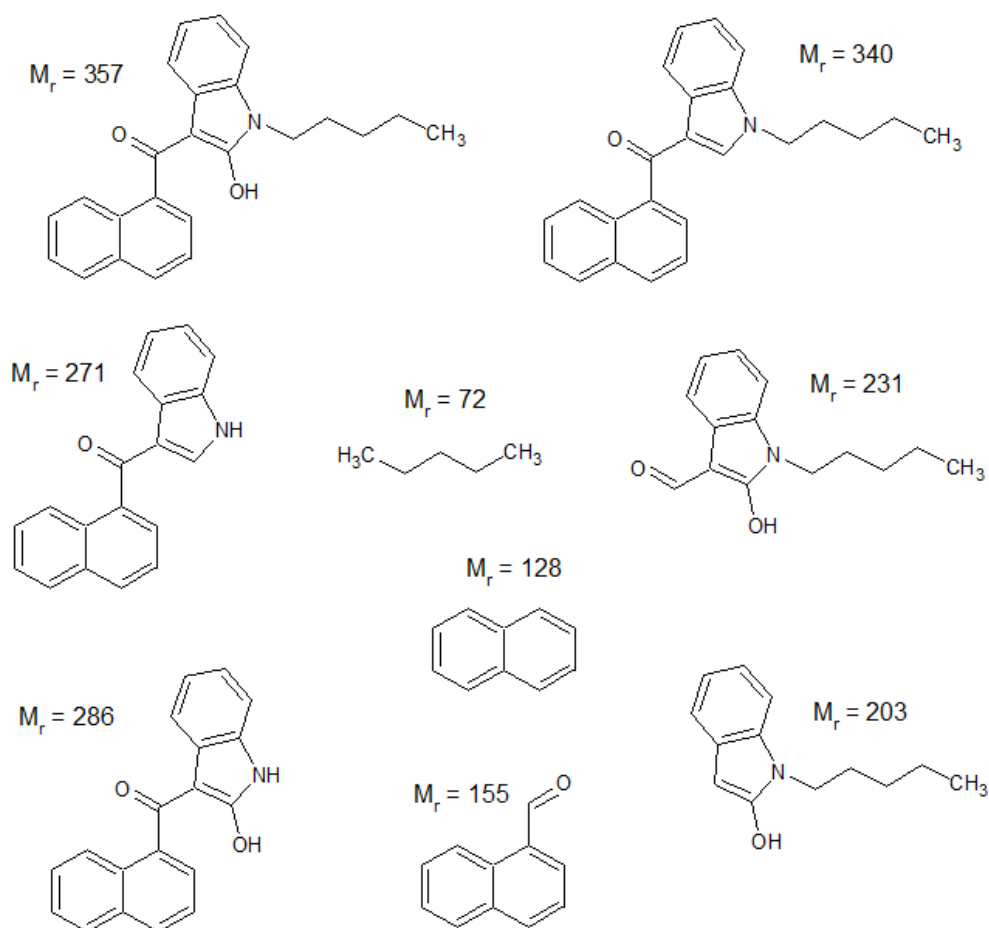
Obr. 40: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 25 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



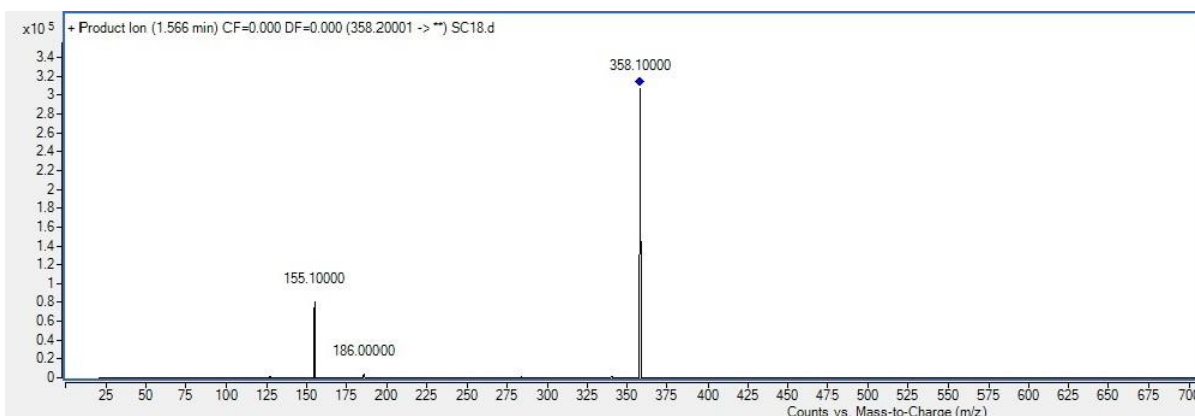
Obr. 41: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 30 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



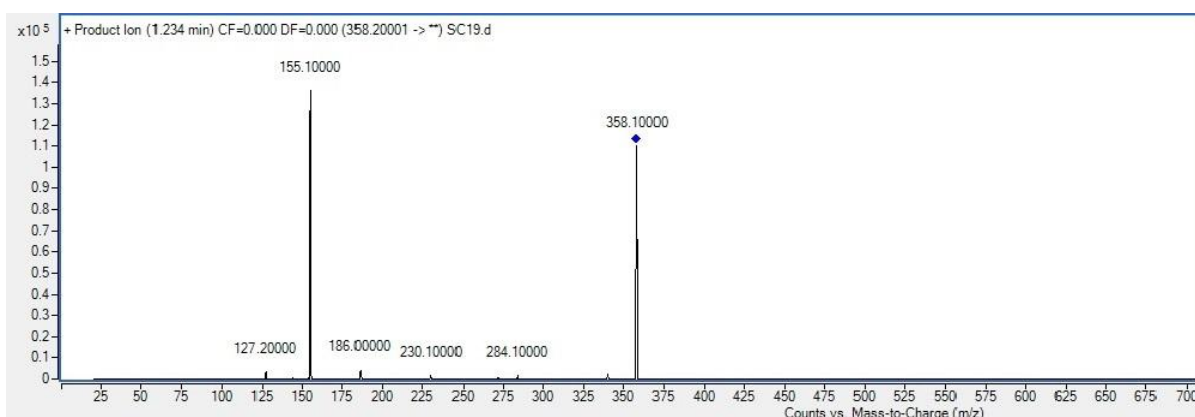
Obr. 42: Fragmentační MS spektrum JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 25 eV s hmotami fragmentů



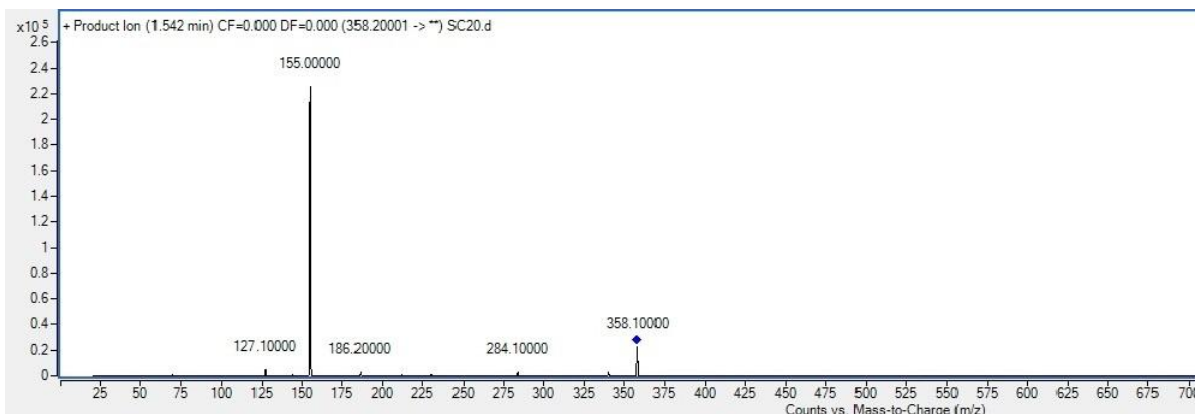
Obr. 43: Chemické struktury možných fragmentů JWH-018-2-hydroxyindol metabolitu



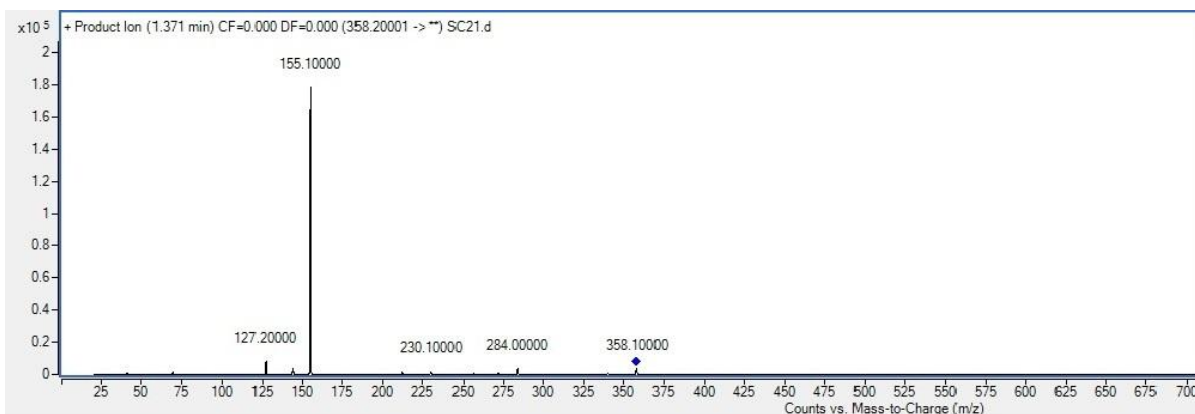
Obr. 44: Fragmentační MS spektrum JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu při kolizní energii 5 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



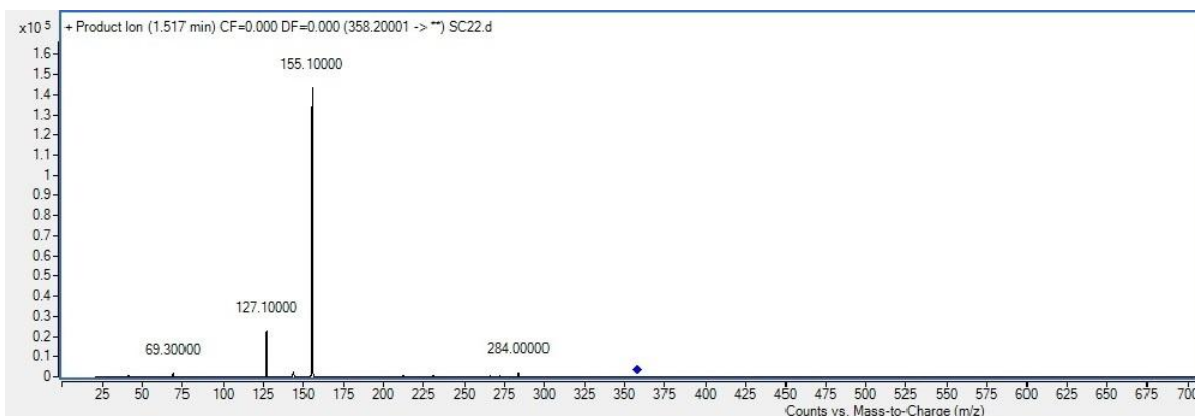
Obr. 45: Fragmentační MS spektrum JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu při kolizní energii 10 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



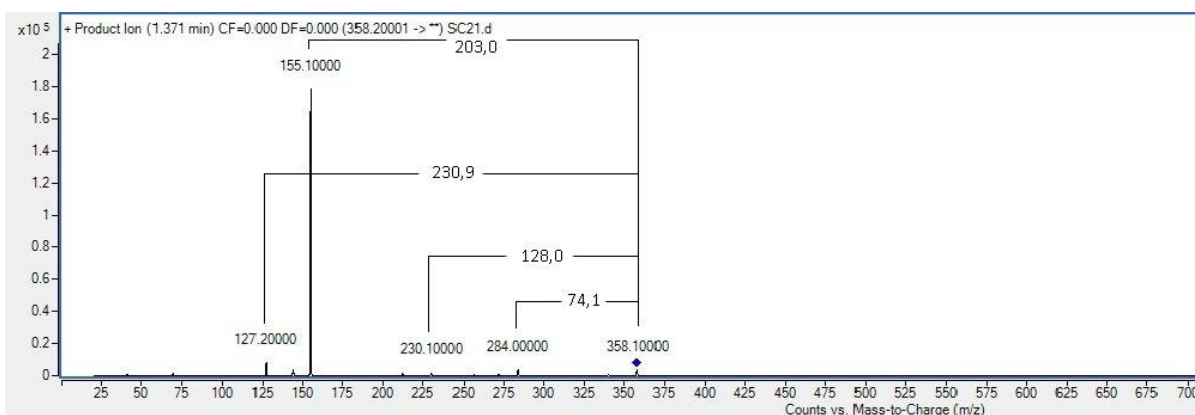
Obr. 46: Fragmentační MS spektrum JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu při kolizní energii 15 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



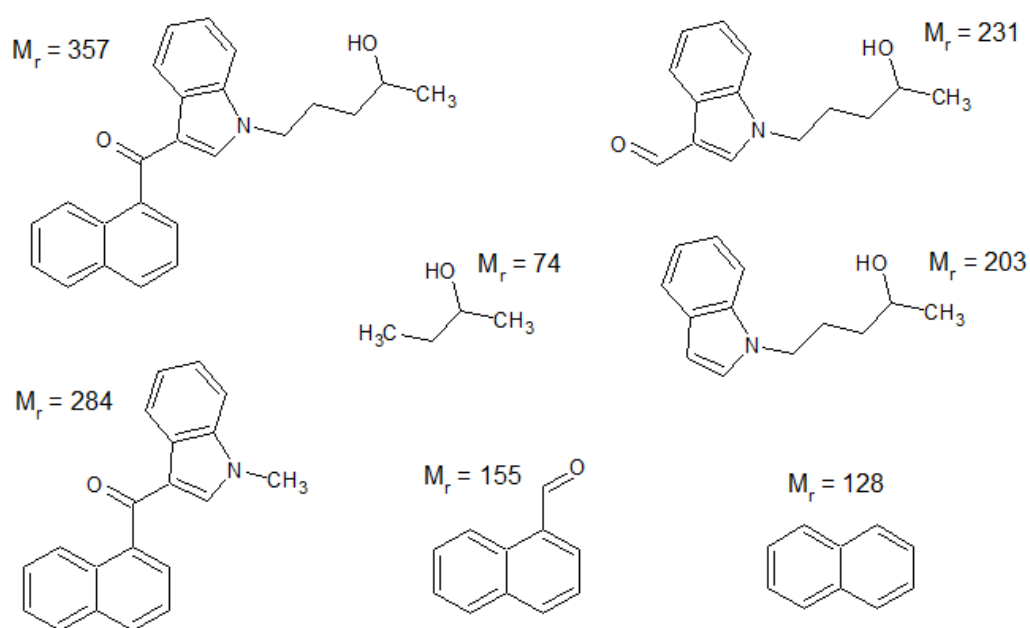
Obr. 47: Fragmentační MS spektrum JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu při kolizní energii 20 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



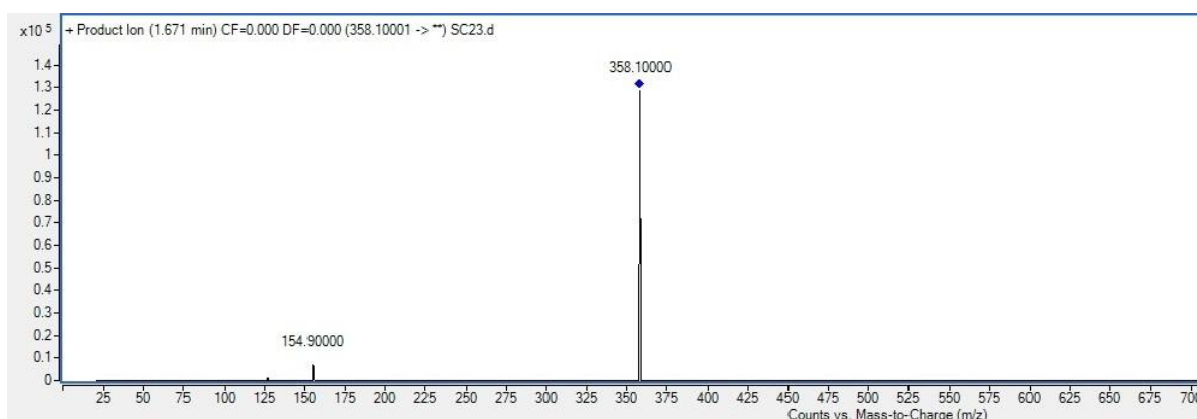
Obr. 48: Fragmentační MS spektrum JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu při kolizní energii 25 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



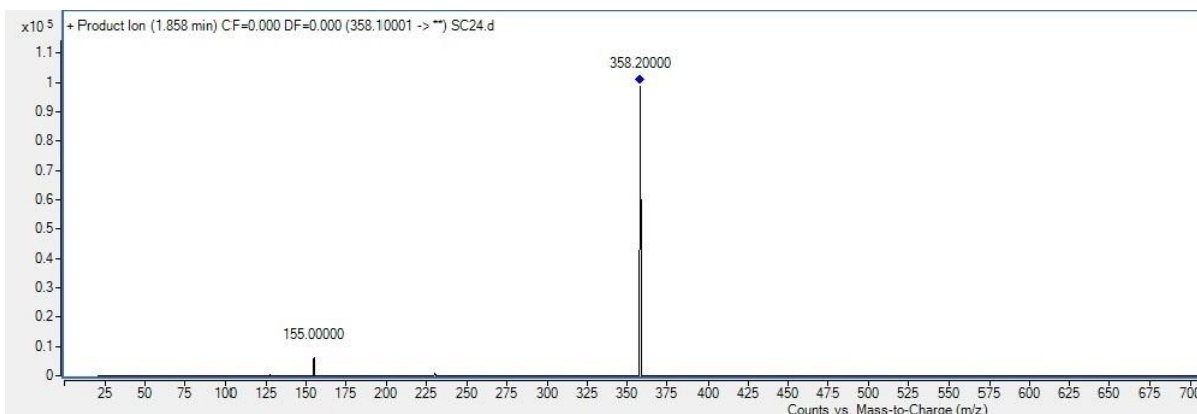
Obr. 49: Fragmentační MS spektrum JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu při kolizní energii 20 eV s hmotami fragmentů



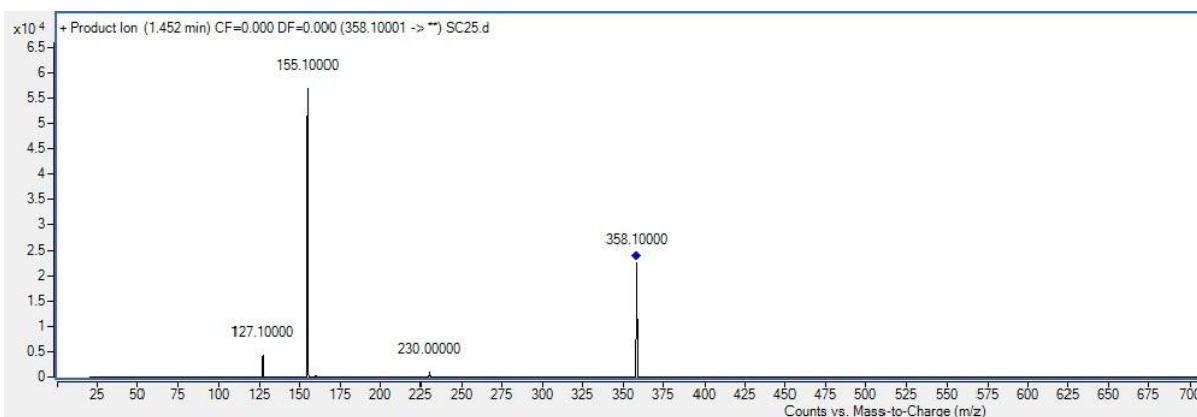
Obr. 50: Chemické struktury možných fragmentů JWH-018-N-(4-hydroxypentyl) metabolitu



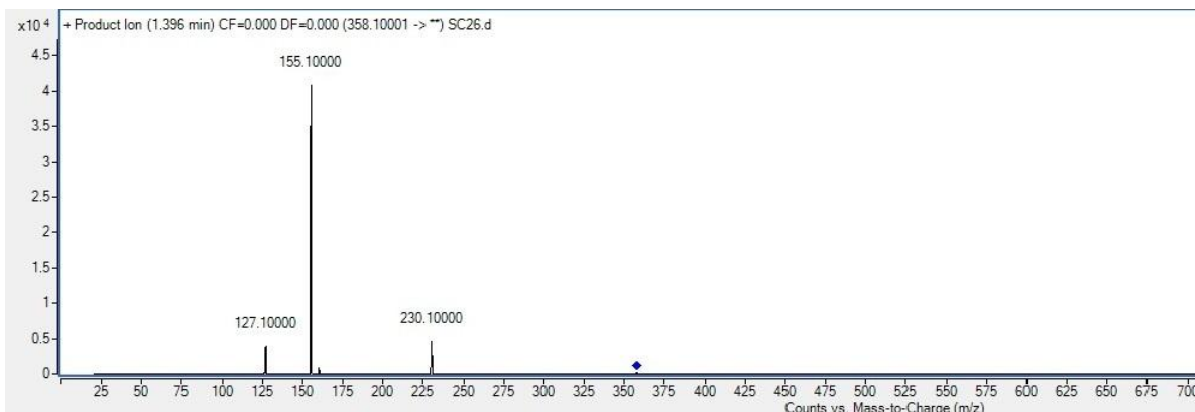
Obr. 51: Fragmentační MS spektrum JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 5 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



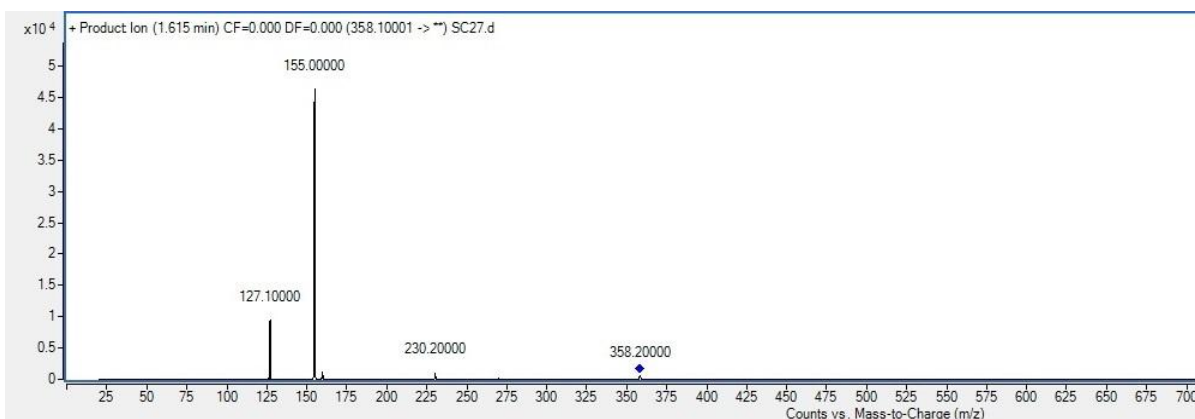
Obr. 52: Fragmentační MS spektrum JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 10 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



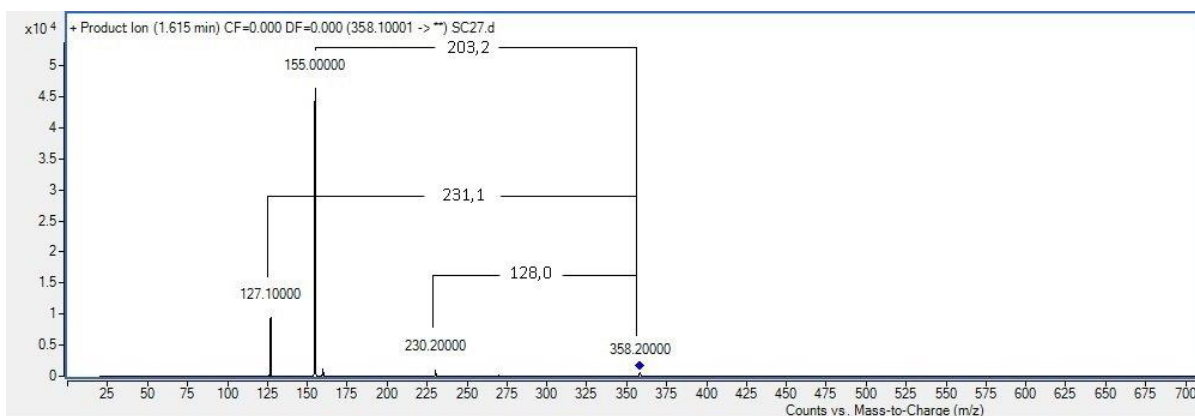
Obr. 53: Fragmentační MS spektrum JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 15 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



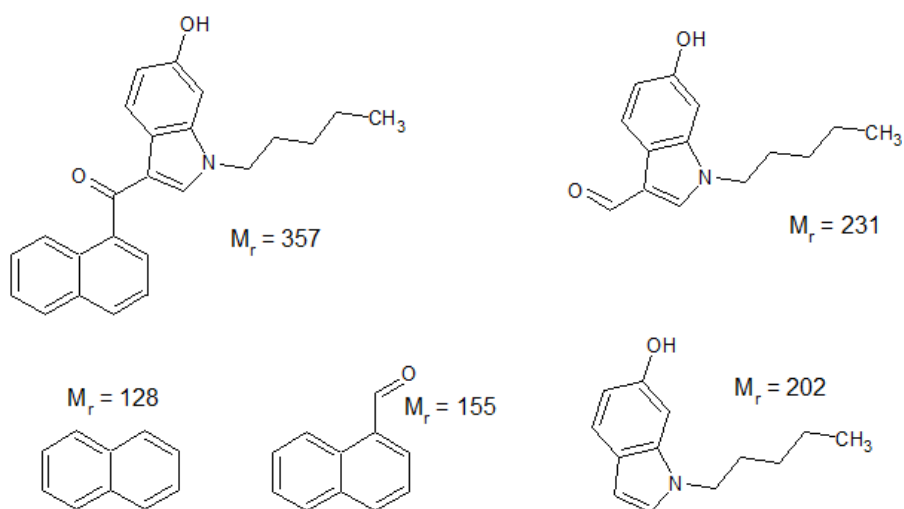
Obr. 54: Fragmentační MS spektrum JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 20 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



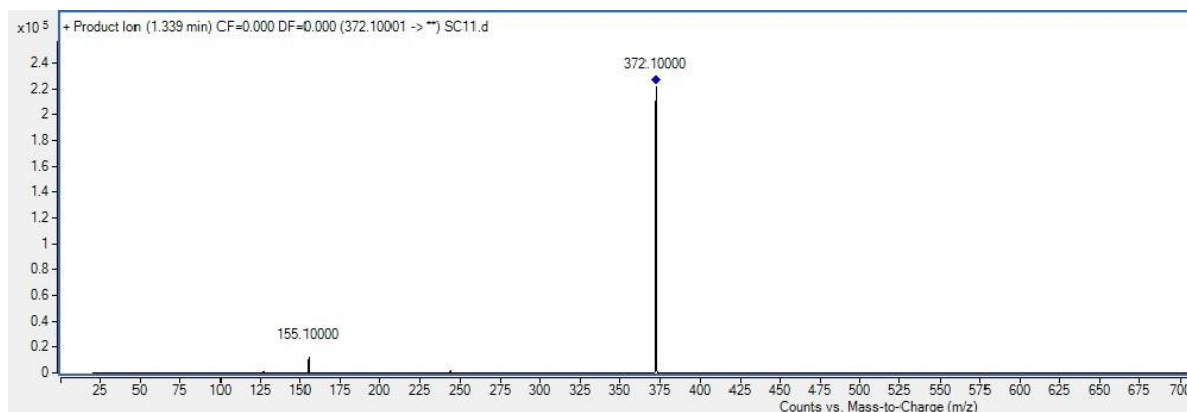
Obr. 55: Fragmentační MS spektrum JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 25 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



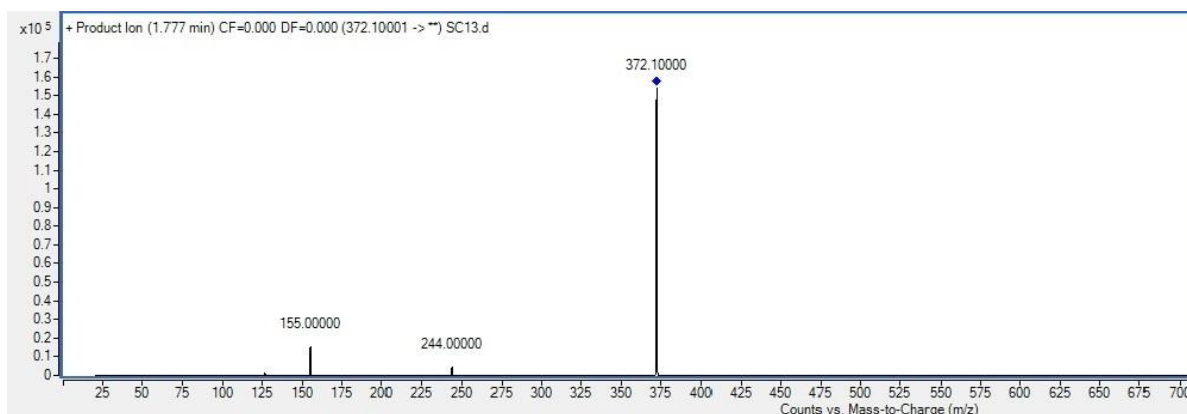
Obr. 56: Fragmentační MS spektrum JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 25 eV s hmotami fragmentů



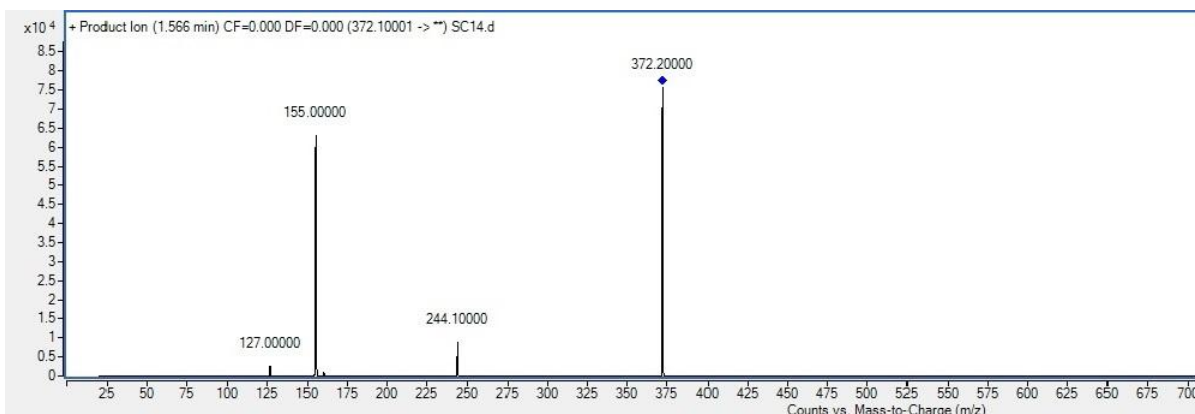
Obr. 57: Chemické struktury možných fragmentů JWH-018-6-hydroxyindol metabolitu



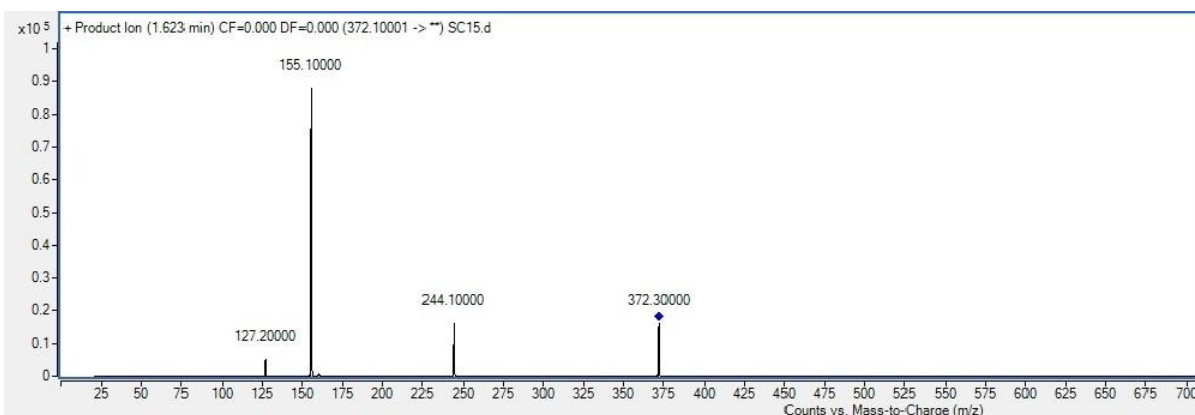
Obr. 58: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 5 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



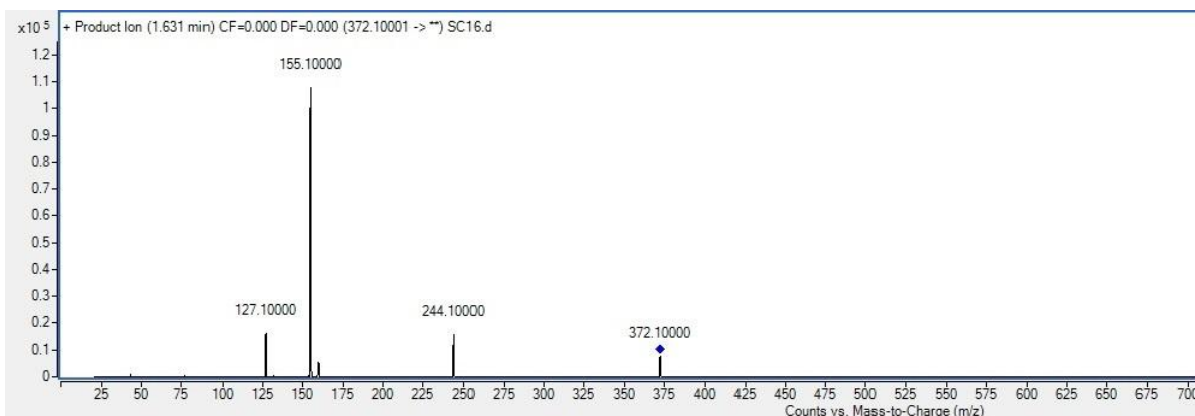
Obr. 59: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 10 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



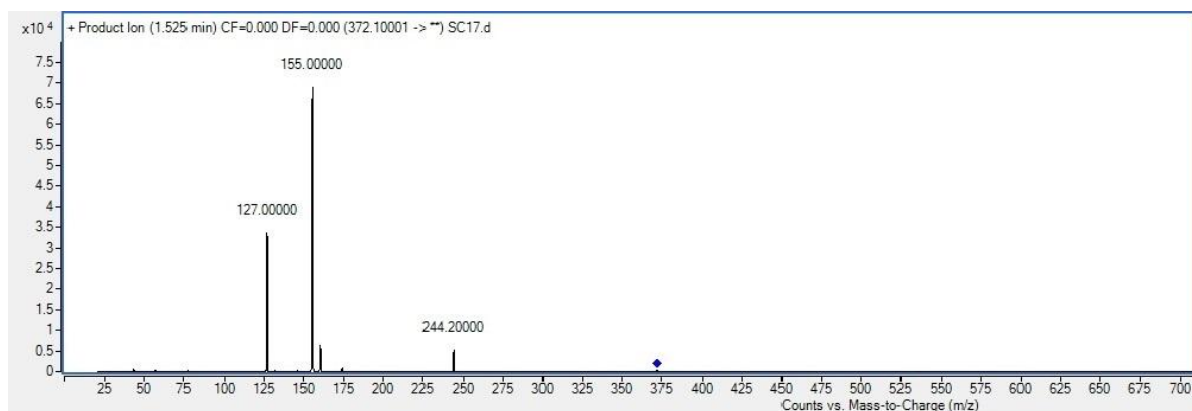
Obr. 60: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 15 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



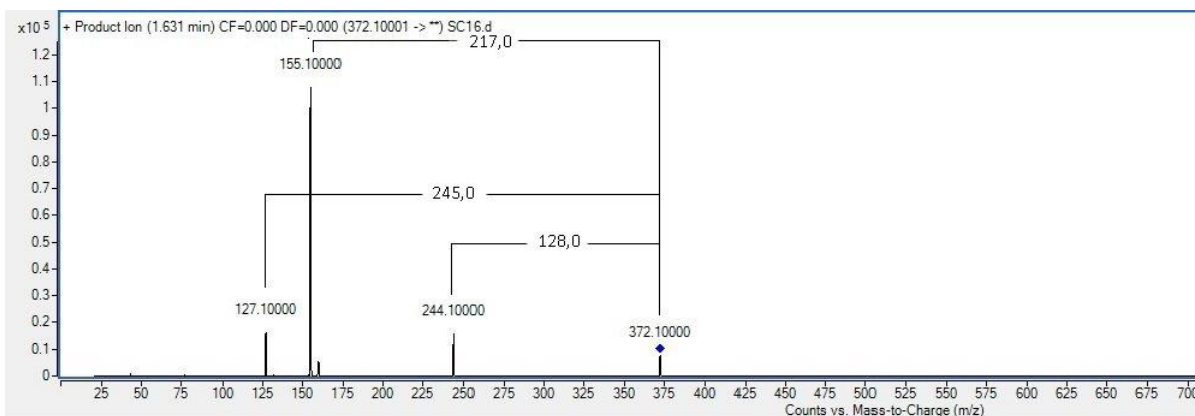
Obr. 61: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 20 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



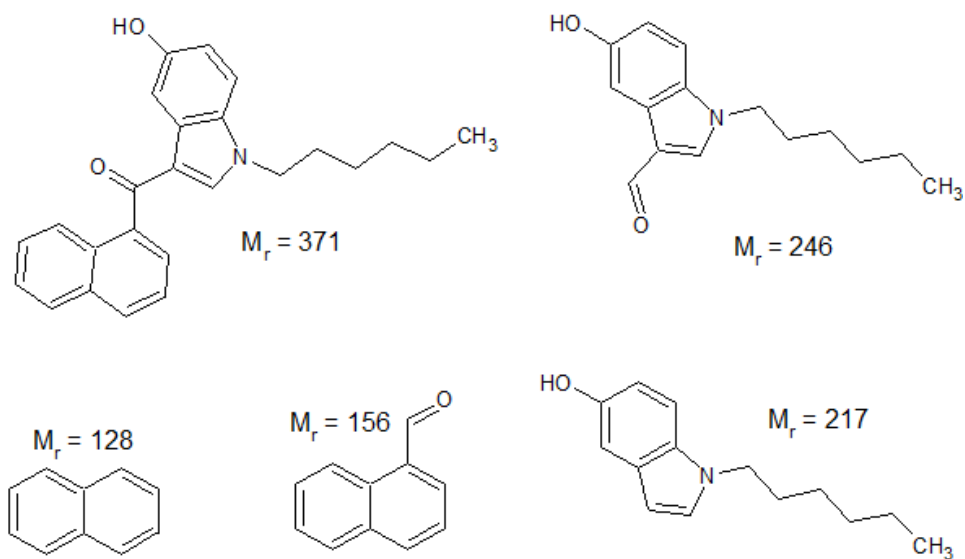
Obr. 62: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 25 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



Obr. 63: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 30 eV, podmínky měření: měřeno přímým nástřikem, napětí na elektrospreji 3,5 kV, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, průtok zmlžujícího plynu 10 l/min, tlak 10 psi, PK: 50:49,5:0,5 (MeOH:H₂O:HCOOH), průtok 4 ul/min



Obr. 64: Fragmentační MS spektrum JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu při kolizní energii 25 eV s hmotami fragmentů



Obr. 65: Chemické struktury možných fragmentů JWH-019-5-hydroxyindol metabolitu

4 Závěr

Byly studovány experimentální podmínky a jejich vliv na separaci a detekci čtyř vybraných syntetických kanbinoidů. V poli zájmu optimalizovaných podmínek bylo složení a pH elektrolytu, teplota zmlžujícího plynu, sprejovací napětí na kapiláře, průtok zmlžujícího plynu a následně průtok pomocné kapaliny.

Nalezené hodnoty jednotlivých parametrů jsou následující: zvolený elektrolyt byl 100 mM PFHA/200 mM NH₄OH, teplota zmlžujícího plynu 200 °C, sprejovací napětí 3500 V, průtok plynu 10 l/min a průtok pomocné kapaliny 0,8 µl/min.

Optimalizací všech těchto parametrů byla získána metoda pro separaci a detekci vybraných syntetických kanabinoidů, uplatněná při analýze reálného vzorku.

Z uvedených výsledků je patrné, že vyvinutá metoda bude vhodná k použití v klinické praxi. Jedinou překážkou je nedostatečný limit detekce a kvantifikace, který se pohybuje v rozmezí 26 – 30 ng/mL a 88 – 98 ng/mL. Tento problém je však řešitelný zkoncentrováním vzorku.

5 Použitá literatura

- [1] O’Flaherty B., Nunnally B.K. (2009) 3 Equipment considerations for capillary electrophoresis. *Sep. Sci. Technol.* **9**, 43–62.
- [2] David N. Heiger, High performance capillary electrophoresis Agilent Technologies, 2000.
- [3] Jandik P., Bonn G., Capillary electrophoresis of small molecules and ions, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1993.
- [4] R. Weinberger, Practical capillary electrophoresis, Academic Press, Boston, 2nd edition, 2000.
- [5] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Analysis and detection by capillary electrophoresis, vol. XLV, Elsevier, 2005.
- [6] R. Ramautar, A.A.M. Heemskerk, P.J. Hensbergen, A.M. Deelder, Jean-Marc Busnel, O.A. Mayboroda (2012) CE–MS for proteomics: Advances in interface development and application. *J. Proteomics*, **75**, 3814–3828.
- [7] Thibault P., Dovichi N.J., Capillary Electrophoresis: Theory and Practice edited by Patrick Camilleri, CRC Press LLC, 2nd edition, 1997.
- [8] [http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Mass-Spectrometry/Electrospray-\(ESI\)-Source/Pages/ion-source.aspx](http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Mass-Spectrometry/Electrospray-(ESI)-Source/Pages/ion-source.aspx).
- [9] Griffiths W.J., Wang Y. (2009) Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1882–1896.
- [10] Seely K.A., Lapoint J., Moran J.H., Faktore L. (2012) Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **39**, 234–243.
- [11] <http://www.neurosoup.com/wp-content/uploads/2013/05/k2.jpg>.
- [12] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Spice_drug.jpg.
- [13] Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD), Consideration of the Major Cannabinoid Agonists. Home Office, London, 2009.
- [14] D.G. Barceloux, Medical toxicology of drug abuse, Wiley, New Jersey, USA, 2012.
- [15] Moosmann B., Kneisel S., Wohlfarth A., Brecht V., Auwärter V. (2013) A fast and inexpensive procedure for the isolation of synthetic cannabinoids from ‘Spice’ products using a flash chromatography system, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 3929–3935.

- [16] Harris C. R., Brown A. (2013) Synthetic Cannabinoid intoxication: A case series and review, *J. Emerg. Med.*, **44**, 360–366.
- [17] Koller V.J., Zlabinger G.J., Auwärter V., Fuchs S., Knasmueller S. (2013) Toxicological profiles of selected synthetic cannabinoids showing high binding affinities to the cannabinoid receptor subtype CB1, *Arch. Toxicol.*, **87**, 1287–1297.
- [18] Merola G., Aturki Z., D’Orazio G., Gottardo R., Macchia T., Tagliaro F., Fanali S. (2012) Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **71**, 45– 53.
- [19] Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Goda Y. (2009) Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product, *Forensic Toxicol.*, **27**, 61–66.
- [20] Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., Mechoulam R., Pertwee R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors, *Pharmacol. Rev.*, **54**, 161-202.
- [21] Huffman J.W., Cannabimimetic indoles, pyrroles and indenes: structure-activity relationships and receptor interactions in the cannabinoids receptors, New York, Humana Press, 2009.
- [22] Huestis M.A., Gorelick D.A., Heishman S.J., Preston K.L., Nelson R.A., Moolchan E.T., Frank R.A. (2001) Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716, *Arch. Gen. Psychiatry*, **58**, 322-328.
- [23] Van Gaal L.F., Rissanen A.M., Scheen A.J., Ziegler O., Rossner S. (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study, *Lancet*, **365**, 1389-1397.
- [24] Schneir A.B., Cullen J., Ly B.T. (2011) "Spice" Girls: Synthetic Cannabinoid Intoxication, *J. Emerg. Med.*, **40**, 296-299.
- [25] Onaivi E.S., Sugiura T., Di Marzo V., Endocannabinoids: The Brain and Body’s Marijuana and Beyond, CRC Press, Napoli, Italy, 2005.
- [26] Wells D.L., Ott C.A. (2011) The "New" Marijuana, *Ann. Pharmacother.*, **45**, 414-417.
- [27] Vardakou I., Pistos C., Spiliopoulou C. (2010) Spice drugs as a new trend: Mode of action, identification and legislation, *Toxicol. Lett.*, **197**, 157-162.

- [28] Thakur G.A., Nikas S.P., Makriyannis A. (2005) CB1 cannabinoid receptor ligands, *Mini Rev. Med. Chem.*, **5**, 631-640.
- [29] Ledent C., Valverde O., Cossu C., Petitet F., Aubert L.F., Beslot F., Bohme G.A., Imperato A., Pedrazzini T., Roques B.P., Vassart G., Fratta W., Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice, *Science*, **283**, 401-404.
- [30] Gomez-Ruiz M., Hernandez M., de Miguel R., Ramos J.A. (2007) An overview on the biochemistry of the cannabinoid system, *Mol. Neurobiol.*, **36**, 3-14.
- [31] Grigoryev A., Saychuk S., Melnik A., Moskaleva N., Dzhurko J., Ershov M., Nosyrev A., Vedenin A., Izotov B., Zabiroya I., Rozhanets V. (2011) Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures, *J. Chromatogr. B.*, **879**, 1126-1136.
- [32] Kavanagh P., Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Simonov A., Rozhanets V. (2013) Detection and tentative identification of urinary phase I metabolites of phenylacetylindole cannabimimetics JWH-203 and JWH-251, by GC-MS and LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.*, **934**, 102-108.
- [33] Emerson B., Durham B., Gidden J., Lay Jr J.O. (2013) Gas chromatography-mass spectrometry of JWH-018 metabolites in urine samples with direct comparison to analytical standards, *Forensic. Sci. Int.*, **229**, 1-6.
- [34] Wintermeyer A., Moller I., Thevis M., Jubner M., Beike J., Rothschild M.A., Bender K. (2010) In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018, *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 2141-2153.
- [35] Moller I., Wintermeyer A., Bender K., Jubner M., Thomas A., Krug O., Schanzer W., Thevis M. (2011) Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls, *Drug Test. Anal.*, **3**, 609-620.
- [36] Moran C.L., Le V.H., Chimalakonda K.C., Smedley A.L., Lackey F.D., Owen S.N., Kennedy P.D., Endres G.W., Ciske F.L., Kramer J.B., Kornilov A.M., Bratton L.D., Dobrowolski P.J., Wessinger W.D., Fantegrossi W.E., Prather P.L., James L.P., Radominska-Pandya A., Moran J.H. (2011) Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine, *Anal. Chem.*, **83**, 4228-4236.

- [37] Uchiyama N., Kikura-Hanajiri R., Kawahara N., Haishima Y., Goda Y. (2009) Identification of a Cannabinoid Analog as a New Type of Designer Drug in a Herbal Product, *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 439-441.
- [38] Spaderna M., Addy P.H., D'Souza D.C. (2013) Spicing things up: synthetic cannabinoids, *Psychopharmacology*, **228**, 525–540.
- [39] Dresen S., Ferreiros N., Westphal F., Zimmermann R., Auwarter V. (2010) Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds, *J. Mass. Spectrom.*, **45**, 1186-1194.
- [40] Pertwee R.G. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands, *Curr. Med. Chem.* **6**, 635–664.
- [41] Ashton J.C., Wright J.L., McPartland J.M., Tyndall J.D.A. (2008) Cannabinoid CB1 and CB2 receptor ligand specificity and the development of CB2-selective agonists, *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1428–1443.

6 Zkratky

CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CE-MS	Kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CID	Kolizí indukovaná disociace
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CITP	Kapilární izotachoforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
PFHA	Perfluoroheptanová kyselina
PFOA	Perfluorooktanová kyselina
pI	Izoelektrický bod
PK	Pomocná kapalina
QqQ	Trojité kvadrupól
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsírán sodný
S/N	Poměr signálu k šumu
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZP	Zmlžující plyn
Δ9-THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol