

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ CHROMATOGRRAFIE
A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE
V ANALÝZE NOVÝCH SYNTETICKÝCH DROG**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Veronika Žihlová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. Volodymyr Pauk

Olomouc 2015

SOUHRN

V posledních letech se na drogovém trhu objevuje značné množství nových syntetických drog, které ve chvíli svého uvedení na trh nejsou zahrnuty v legislativě a nejsou proto právně postihnutelné. Kromě rychlých legislativních změn reagujících na tuto skutečnost je nezbytné hledat nové analytické postupy, které dovolí rychlou a spolehlivou identifikaci těchto látek. V oblasti chromatografických metod zajímavou možností představuje superkritická fluidní chromatografie. Využitím této techniky a následné hmotnostněspektrometrické detekce v analýze nových syntetických drog se zabývá předkládaná diplomová práce.

Teoretická část v souvislostech popisuje nové syntetické drogy, v rámci možností vysvětluje jejich dopad na společnost a zabývá se jejich nejčastějšími typy. Dále popisuje významné rysy superkritické fluidní chromatografie, seznamuje se současnou instrumentací, která má podíl na oživení zájmu o tuto metodu, a vypočítává dosud publikované práce v oblasti drog. Popisuje hmotnostní spektrometrii, shrnuje její instrumentaci v analýze drog a zaměřuje se na její použití pro nové syntetické drogy. Nakonec popisuje spojení zmíněné separační a detekční metody.

Praktická část přibližuje analýzu 15 sloučenin, řazených ke dvěma početným skupinám nových syntetických drog, katinonům a fenylethylaminům. Chromatografické dělení pomocí superkritické fluidní chromatografie probíhalo na ultraúčinných kolonách s částicemi náplně menšími než 2 μm . Hmotnostní spektrometr dovoľoval selektivní a citlivou detekci a skládal se z elektrospreje a trojitého kvadrupólového analyzátoru. Kvalita separace byla posuzována pro různé experimentální podmínky, konkrétně pro stacionární fázi, složení mobilní fáze a teplotu. Podle výsledků měření jsou nejlepší volbou silikagelová stacionární fáze (BEH silica), mobilní fáze s hydroxidem amonným jako aditivem k mobilní fázi (tvořená směsí oxidu uhličitého a methanolu) a teplota 40 °C. Doba trvání této separace je velmi příznivá a nepřesahuje tři minuty.

Superkritická fluidní chromatografie se ve spojení s hmotnostní spektrometrií osvědčila pro úspěšnou velice rychlou analýzu nových syntetických drog. Ve srovnání s kapalinovou chromatografií obstála pro dané analyty stejně dobře a má podobné nároky na instrumentaci, ale nižší nároky na čas. Použitá metoda by v budoucnu mohla být upravena pro vzorky tělních tekutin, neboť pracuje s dostatečně nízkou koncentrací zkoumané směsi.

Účinné a rychlé rozdělení strukturně podobných sloučenin by mohlo být výhodou pro screening desítek izomerních kationů a fenylethylaminů. Celkově tak superkritická fluidní chromatografie má dobré předpoklady stát se jedním z nových efektivnějších přístupů k analýze nových syntetických drog.

SUMMARY

In recent years, there have been an unexpected number of new synthetic drugs appearing on the drug market. When first seen on the market, these substances are generally not involved in the collection of drug laws yet, and that fact makes them legally intangible. Apart from quick changes in legislation related to that situation, new analytical approaches are needed as well – because these can provide fast and reliable identification of any given compound of these drugs. As for separation methods, a supercritical fluid chromatography is an interesting solution here. This technique and a consequential mass-spectrometric detection were chosen for an analysis of new synthetic drugs which is the main field of the presented diploma thesis.

The theoretical part of the thesis describes new synthetic drugs, explains their impact on society and deals with the main types of these drugs. It also describes the important features of supercritical fluid chromatography, introduces its contemporary instrumentation and lists the papers that have been published so far. At the same time, it describes mass spectrometry, summarizes its instrumentation in the drug analysis and focuses on its usage for new synthetic drugs. Finally, it describes the merge of the above-mentioned separation and detection methods.

The experimental section focuses on the detailed analysis of 15 compounds that belong to the two important groups of new synthetic drugs – cathinones and phenethylamines. The supercritical fluid chromatography was carried out using ultra-high performance columns packed with particles of sub-2 μm . The mass spectrometer enabled the selective and sensitive detections and included an electrospray and a triple quadrupole analyzer. The quality of that separation was assessed considering a few experimental conditions, namely the stationary phase, the mobile phase and the temperature. Based on the results, the best choices are the silica stationary phase (BEH silica), the mobile phase with the ammonium hydroxide, as an additive to carbon dioxide/methanol, and the temperature of 40 °C. The duration of the separation is very favorable and should not take longer than 3 minutes.

A supercritical fluid chromatography in connection with mass spectrometry did successfully manage to quickly analyze a mixture of 15 new synthetic drugs in less than 3 minutes. For these compounds, it is as suitable as a high performance liquid chromatography, and it has a similar instrumentation, but still enables a faster separation. This method could be adjusted and optimized for the bodily fluids' samples – it works with

a sufficiently low concentration of the examined mixture. As quick and established technique for the separation of structurally related compounds, it could be used for the identification of dozens of isomeric cathinones and phenethylamines, too. The analysis of these new drugs definitely requires new modern and reliable approaches, and the supercritical fluid chromatography could surely become one of the new and highly effective improvements in this field.

PROHLÁŠENÍ

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

Souhlasím s tím, aby práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Moje poděkování patří prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D., za možnost zpracovat velice aktuální téma s využitím nejnovějších přístrojů, za připomínky k práci a za vstřícnost, Mgr. Volodymyru Paukovi za předané zkušenosti a rodině a přátelům za to, že mě podporují.

OBSAH

1 ÚVOD	- 1 -
2 TEORETICKÁ ČÁST	- 2 -
2.1 Nové psychoaktivní látky	- 2 -
2.1.1 Dopad nových psychoaktivních látek na společnost	- 4 -
2.1.2 Výskyt nových psychoaktivních látek v Evropě	- 6 -
2.1.3 Hlavní skupiny nových psychoaktivních látek.....	- 10 -
2.2 Superkritická fluidní chromatografie.....	- 13 -
2.2.1 Instrumentace	- 16 -
2.2.2 Superkritická fluidní chromatografie v analýze drog.....	- 22 -
2.3 Hmotnostní spektrometrie.....	- 24 -
2.3.1 Instrumentace hmotnostní spektrometrie v analýze drog	- 25 -
2.3.2 Hmotnostní spektrometrie v analýze nových psychoaktivních látek	- 27 -
2.4 Spojení superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	- 31 -
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 34 -
3.1 Přístroje	- 34 -
3.2 Chemikálie	- 34 -
3.3 Pracovní postup	- 35 -
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	- 37 -
4.1 Hmotnostněspektrometrická detekce drog.....	- 39 -
4.2 Pomocná kapalina.....	- 40 -
4.3 Gradient složení mobilní fáze	- 40 -
4.4 Aditivum	- 42 -
4.5 Stacionární fáze	- 43 -
4.6 Teplota	- 44 -
4.7 Nejvhodnější kombinace stacionární fáze, aditiva a teploty.....	- 44 -
4.8 Srovnání s HPLC-MS	- 48 -
5 ZÁVĚR.....	- 50 -
6 LITERATURA	- 51 -
8 DOPORUČENÁ LITERATURA	- 56 -
9 SEZNAM ZKRATEK.....	- 57 -

1 ÚVOD

Nový fenomén v nabídce drog se rozšířením vyrovná klasickým drogám, právně je těžko postihnutelný a je obtížné jej prokázat. Nové syntetické drogy zkusilo stejné množství Čechů jako kokain a heroin¹ a zcela legálně je mohli zakoupit ve specializovaných obchodech i v Olomouci². Tyto sloučeniny jsou často odvozeny od zakázaných drog, ale malá změna v chemické struktuře je staví mimo dosah zákona. Zákony jich následně podchycují větší množství, nebo je naopak povolují, jako je to na Novém Zélandě³. Ať je regulace tohoto problému jakákoliv, nemít o něm informace je dnes nepředstavitelné. Detekovat nové drogy však není snadné, neboť nejsou zahrnuty v klasických testech a jsou výjimečně početné a rozmanité. V případech akutních otrav tak nemusí být dostatečně rychle odhaleny, pokud pacient nekomunikuje, a přibývají také úmrtí v souvislosti s těmito drogami. K analýze těchto moderních látek jsou proto nezbytné moderní metody.

Zavedenými metodami v klinických a forenzních laboratořích jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV detektorem (a dnes již často i s hmotnostně spektrometrickou detekcí) a plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem. V budoucnu by mohla do tohoto seznamu patřit i superkritická fluidní chromatografie, která nedávno překonala technické nedostatky a nabízí mnoho výhod. Za prvé, kratší čas analýzy umožňují vyšší difúzní koeficienty v superkritickém stavu ve srovnání s kapalinou. Dále na rozdíl od plynové chromatografie dovoluje analýzu tepelně nestabilních látek díky nižší používané teplotě. Jednou z výhod je také použití netoxického a poměrně levného CO₂ jako mobilní fáze. Tato metoda dosáhla úspěchu v mnoha oblastech, především ve farmacii, a byla využita také v analýze drog. Analýzou nových syntetických drog se však v této souvislosti zabývá dosud jen jedna odborná publikace.

Podobná analýza se zaměřením na separaci vybraných nových syntetických drog byla řešena v předkládané diplomové práci. V teoretické části jsou popsány nové syntetické drogy, superkritická fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Obsahem praktické části je provedení a zhodnocení analýzy 15 kationů a fenylethylaminů za použití kolon s částicemi náplně menšími než 2 μm, ionizace elektrosprejem a kvadrupólového hmotnostního analyzátoru. Posuzován byl vliv stacionární fáze, složení mobilní fáze a teploty.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nové psychoaktivní látky

V obchodu s drogami není nutné porušovat zákon a je možné najít si legální cestu. Tato myšlenka je společná pro nové psychoaktivní látky, které jsou v účincích srovnatelné s kontrolovanými drogami, ale na rozdíl od nich při nástupu na trh nespádají pod úmluvy OSN⁴. V posledních letech počet těchto látek prudce roste a jen v Evropě v současné době přibývají v průměru dvě za týden⁵. Jejich srovnání se zavedenými drogami přináší podobnosti i drobné rozdíly a typickým rysem je pro ně rozmanitost.

Co obě skupiny drog do jisté míry spojuje, je chemická struktura, prolínání trhů a míra zastoupení na trhu. Obojí se vyskytují v přírodě, nebo jsou syntetizovány – ve druhém případě nové psychoaktivní látky často vycházejí z kontrolovaných drog. Podobné působení pak je důsledkem stejné chemické struktury, doplněné kvůli obejití zákona o malou změnu, nebo je dáno strukturou úplně novou, aktivující v organismu stejný receptor jako původní sloučenina. Zaměnitelných účinků využívají prodejci a vydávají přípravky s nelegální účinnou látkou za legální a naopak. Také je zřejmé zastoupení na běžném i na černém trhu. Souhrnným počtem uživatelů se u nás nové psychoaktivní látky jako skupina vyrovnávají kokainu, heroinu nebo LSD^{6,7}, k čemuž přispívají tři okolnosti v této oblasti nezvyklé.

Legalita, zdánlivá bezpečnost a snadná dostupnost umožňují novým psychoaktivním látkám oslovit velmi různorodou skupinu obyvatel. Legální jsou z pohledu právních předpisů o drogách, stále se na ně však vztahují další zákony, například o ochraně spotřebitele, o bezpečnosti potravin nebo léčiv. Prodejci se proto snaží zamezit postihu a zboží opatřují varováním, že není určeno ke konzumaci. Dále používají označení „sběratelské“ nebo „dárkové předměty“, „sůl do koupele“, „vonné tyčinky“, „vůně do vysavače“, „výživa pro rostliny“ nebo „chemikálie pro výzkumné účely“. Zdání bezpečnosti je vyvoláno legalitou, snadnou dostupností a případnými kladnými zkušenostmi přátel uživatele. Dojem důvěryhodnosti budí také umístění odkazu v internetových vyhledávacích mezi prvními, které ale může být zmanipulováno. Internet se totiž velkou měrou podílí na dostupnosti nových psychoaktivních látek, zvláště ve státech, kde se nevyskytují specializované kamenné prodejny. (Takzvané smart shops, head shops neboli amsterdam shops v podstatě zanikly po úpravě zákona i v České republice⁸.) Dostupnost je podmíněna globalizací – výroba probíhá v Číně a v Indii, v Evropě až další zpracování a balení do konečné podoby. Tři

zmíněné výhody – dodržení zákona, zdánlivá bezpečnost a jednoduchost obstarání – podněcují ke koupi zákaznicky, kteří patří k uživatelům kontrolovaných drog, i ty, kteří tuto zkušenost nemají. Někteří kupující takto hledají způsob samoléčby, snaží se změnit životní styl (zhubnout a podobně) nebo obcházejí testy na klasické drogy (řidiči, vojáci, klienti protidrogových léčeben)^{4,6}.

Nové psychoaktivní látky jsou rozmanité v různých směrech. Podle chemické struktury většinou spadají do pěti skupin, zhruba čtvrtinu látek ale není možné zařadit ani do jedné z nich. Mohou být nově připravené (nafyron), znovuobjevené (mefedron) nebo dokonce známé od starověku (šalvěj divotvorná). Používá se pro ně několik oficiálních i hovorových pojmů, které nejsou vždy přesně určeny.

Vymezení pojmů

České Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti (NMS) v množině „nových psychoaktivních látek“ odlišuje označením „nová syntetická droga“ uměle připravené sloučeniny od rostlinného zboží⁷. Termín „nová“ se nevztahuje pouze k nově objeveným nebo nově vyrobeným látkám, ale měl by být chápán spíše jako označení pro látky „nově dostupné“ nebo „nově zneužívané“⁴. Mnoho dnes nabízených nových psychoaktivních látek bylo připraveno před desítkami let⁹.

Pod právně závaznou definicí „nová psychoaktivní látka“ se rozumí nová omamná nebo psychotropní látka, která není zahrnutá v úmluvách OSN o kontrole drog. Těmito úmluvami jsou Jednotná úmluva OSN o omamných látkách z roku 1961 (seznam I, II nebo IV) a Úmluva OSN o psychotropních látkách z roku 1971 (seznam I, II, III nebo IV). Předpokladem pro zařazení je možná hrozba pro veřejné zdraví, srovnatelná s hrozbou, kterou představují látky v těchto úmluvách zahrnuté. Definice zahrnuje čistou látku i směs a je určena Rozhodnutím Rady Evropské unie 2005/387/JVV o výměně informací, hodnocení rizika a kontrole nových psychoaktivních látek¹⁰.

„Nová syntetická droga“ je pojem uvedený ve Společné akci 97/396/SVV, právním předpisu, který byl později nahrazen výše zmíněným Rozhodnutím Rady. Nová syntetická droga není zahrnuta v žádném ze seznamů Úmluvy OSN z roku 1971 o psychotropních látkách, představuje stejně vážnou hrozbu pro veřejné zdraví jako látky v úmluvě zahrnuté a má omezenou léčebnou hodnotu. Společná akce se tedy na rozdíl od pozdějšího rozhodnutí Rady nezmiňuje o Jednotné úmluvě OSN o omamných látkách z roku 1961 (cit.¹¹).

Následující dva pojmy jsou obecné, nejsou právně závazné a v uvedených významech je používá Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA). Do široké skupiny „legálních opojení“ (v angličtině „legal highs“) patří kromě syntetických sloučenin i látky rostlinného původu a výrobky, ve kterých jsou „legal highs“ obsaženy. Pojmenování „designer drug“ odkazuje na psychoaktivní látku, která využívá malou změnu v chemické struktuře původní regulované drogy⁴.

2.1.1 Dopad nových psychoaktivních látek na společnost

Jedna z nových psychoaktivních látek, mefedron, se ve Velké Británii stala čtvrtou nejrozšířenější drogou po konopí, kokainu a extázi¹². Jestli se některá droga takto rozšíří, která to bude a jaká rizika s ní budou spojená, nebylo možné předvídat. Podobně dnes nelze vyloučit nástup jiné látky a s jistotou určit, zda se závažnost problému nových psychoaktivních látek nezvětší. V současnosti jsou s nimi spojena jak vážná nebezpečí, tak rozporuplné otázky a teoretická možnost obrátit alespoň některé okolnosti v drobný přínos. Těmto třem okolnostem je věnována pozornost v následujícím textu.

Užívání nových psychoaktivních látek má podíl na řadě úmrtí. Opakuje se schéma, kdy se určitá látka objevuje v několika desítkách posmrtných vzorků hlášených během poměrně krátké doby z jedné či dvou zemí. Nejvíce případů za poslední tři roky se v Evropě vztahuje k methylenoxypropyvaleronu (MDPV, 41 mrtvých, cit.¹³). Tento počet by však mohl být v budoucnu překonán látkami 4,4'-DMAR, 5-IT a MT-45, které byly hlášeny vždy během půl roku (27 mrtvých, 24 mrtvých, 21 mrtvých, cit.¹⁴). Riziko zvyšují některé skutečnosti, například mezi účinnou a smrtelnou dávkou *para*-methoxymethamfetaminu je podle výzkumu na krysách malý rozdíl¹⁵. Také pozdní nástup účinku PMMA a slabší stimulační schopnost 4-MA ve srovnání s amfetaminem mohou vyvolat dojem slabého působení a přimět uživatele k dávce navíc^{16,17}. Na úmrtích se tak podílí neinformovanost, záměna látky nebo jiné než deklarované složení.

Účinky nových psychoaktivních látek na zdraví jsou podle provedených studií nepříznivé, ale pro většinu nejsou prozkoumány. Zjištěny byly například serotoninový syndrom, hepatotoxicita, neurotoxicita a vyvolání duševní poruchy¹⁸. Zvláštní problémy se týkají nemocných, a to včetně protichůdného působení k inzulinu u diabetiků¹⁹. Riziko vedlejších účinků, které nejsou pro nové drogy před vstupem na trh ověřovány¹⁵, je zvýrazněno kontrastem s podmínkami kladenými na nový lék. Tyto podmínky zahrnují testy

na několika zvířecích druzích, tři fáze klinického hodnocení na člověku a povinnost výrobce sledovat nežádoucí efekty přípravku i v době jeho prodeje. Přesto se vyskytly případy, kdy lék s přispěním dalších vlivů způsobil smrt pacientů a musel být stažen z oběhu²⁰. Zdravotním následkům užívání nových látek, akutním i chronickým, je podle EMCDDA nutné lépe porozumět²¹.

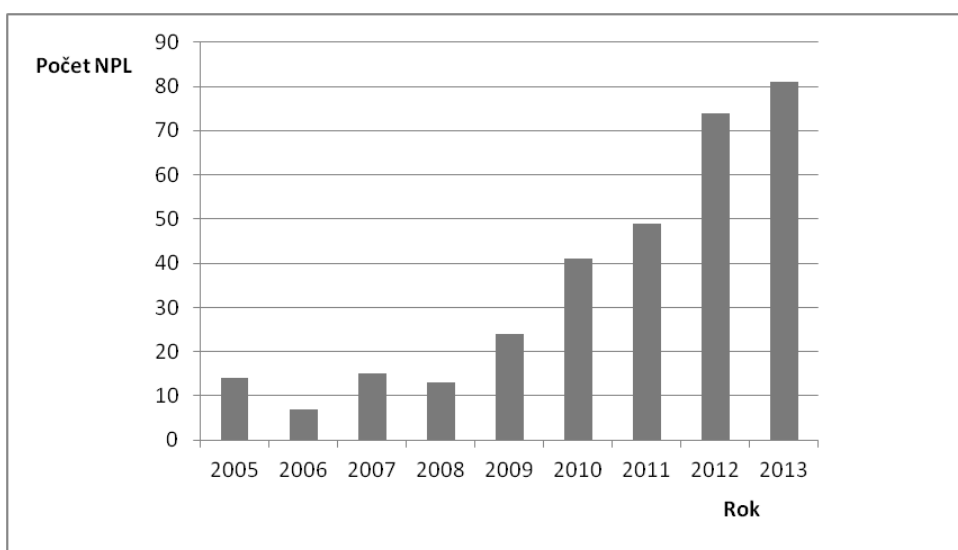
Do obchodu s novými psychoaktivními látkami je zapojen organizovaný zločin, jak dokládá prolínání nelegálního a legálního trhu. Obchodníci dosahují během doby, která je potřebná pro stanovení rizik nové látky a její podrobení kontrole, značných zisků²². Rozsah zapojení organizovaného zločinu není jasný²¹, prozatím se zdá být relativně nízký, ale je pravděpodobné, že poroste⁶. V roce 2011 britské testovací nákupy ukázaly, že zakázanou drogu obsahovalo 19 % internetových vzorků údajně odpovídajících zákonu²¹. Naopak volně prodejné piperaziny byly podle českých údajů z roku 2009 nejčastější náhražkou v 80 % tablet vydávaných za extázi².

Důsledky nových psychoaktivních látek nejsou vždy nežádoucí jednoznačně. Rozporupně hodnocenými skutečnostmi jsou poměrně nízké počty úmrtí, v některých případech nižší nebezpečnost a přínos by mohlo znamenat využití pro léčbu a výzkum. Slovy Evropské komise, relativně nízká mortalita se může zdát projevem nižší hrozby pro veřejné zdraví, ale neodstraňuje nutnost se tímto problémem zabývat²³. Daný poměr je několik desítek předávkování novými drogami v Evropě za rok¹⁴ vzhledem k 6100 předávkování nelegálními drogami²⁴, v České republice několik mrtvých vzhledem k desítkám mrtvých. Konkrétně byl podle nejnovějších českých údajů příčinou smrti v jednom případě ketamin a celkem ve 28 případech pervitin, opiáty, těkavé látky a kokain v roce 2011 (cit.¹). Výrazně nižší neurotoxicitu a riziko serotoninového syndromu mají ve srovnání s napodobovanou extází některé piperaziny¹⁶. Ve výzkumu přinesl nové poznatky o serotoninových receptorech v mozku 4-jodo-2,5-dimethoxyfenylethylamin²⁵ a o farmakologickém mechanismu duševních poruch *meta*-chlorfenylpiperazin¹⁵, oba ještě před svým zneužíváním. Mnoho nových psychoaktivních látek bylo původně připraveno pro lékařské účely, včetně piperazinů nebo syntetických kanabinoidů²⁶, a obdobně se mohou nově připravené sloučeniny ukázat jako vhodné pro farmaceutické účely.

2.1.2 Výskyt nových psychoaktivních látek v Evropě

Globalizace a technický pokrok mění trh s drogami, a to jak v možnostech dopravy, tak přinášením nových trendů. Propojují se a mění se světové cesty heroinu a kokainu a na významu nabývá v obchodu s omamnými a psychotropními látkami internet. Mezinárodní provázanost a společný vývoj se týkají i evropského drogového trhu. Jedním z rysů společných pro státy Starého kontinentu je právě podobné šíření nových psychoaktivních látek (NPL), které se zde rozmáhá zhruba od začátku tisíciletí.⁶

Zvláště se počet nově zaznamenaných drog zvyšuje od roku 2009, kdy je každým dalším rokem překonán (Obr. 1). Nárůst příkře stoupá až k současným 81 nově objeveným drogám za rok 2013 a celkovému počtu 340. Ze všech NPL poprvé zaznamenaných v Evropě v období 2005-2013 tři čtvrtiny spadají do pěti skupin. Převládají syntetické kanabinoidy, fenylethylaminy a katinony, následované tryptaminy a piperaziny. Zbývající látky nejsou zařaditelné ani do jedné z těchto kategorií (Obr. 2 a Obr. 3)^{6,9,14,17}.



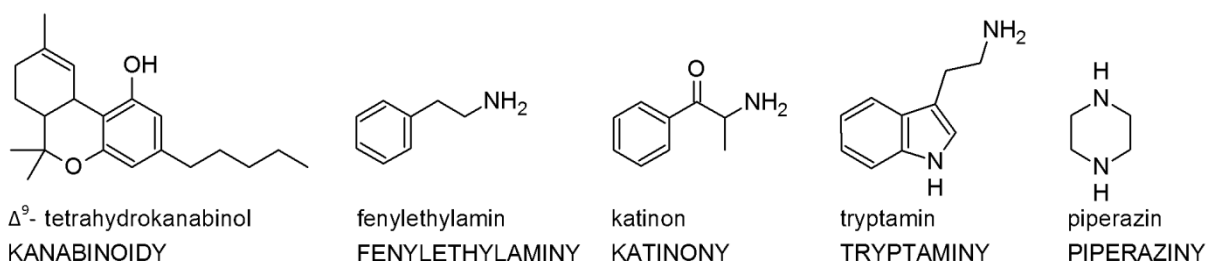
Obrázek 1: Počet nových psychoaktivních látek poprvé zachycených v Evropě v letech 2005 až 2013 (podle údajů z cit.^{6,9,14})

2.1.2.1 Nejrozšířenější látky v Evropě

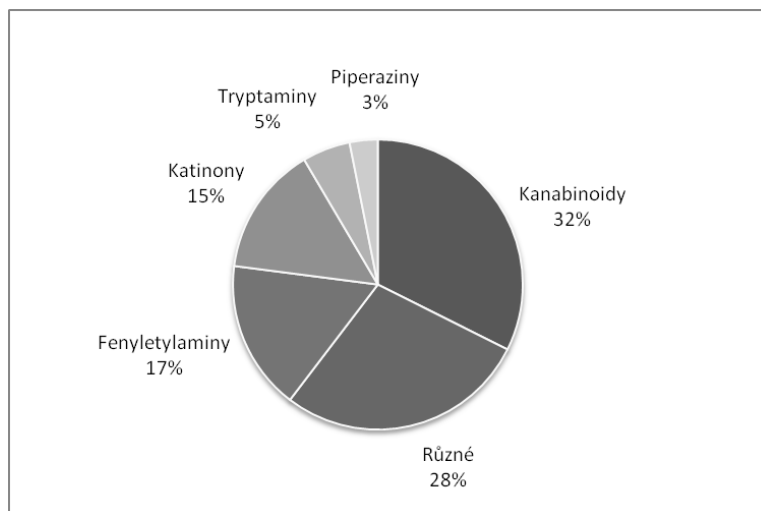
Získat ucelené informace o výskytu NPL není snadné. V následujícím textu jsou zpracovány výsledky získané třemi způsoby - prvním krokem je většinou odhalení při forenzní analýze zachycených drog, aktivně je sledována nabídka na internetu a provádějí se průzkumy mezi občany. Využívají se také testovací nákupy, hlášení z nemocničních oddělení urgentního příjmu a z pitev a jiné. Údaje o NPL od roku 2005 shromažďuje

především Systém včasného varování před novými psychoaktivními látkami, a to v Evropské databázi nových drog⁴.

Představu o současné situaci v Evropě vykresluje mozaika údajů, složená z dat o zaznamenaných NPL, ze studie internetové nabídky a průzkumu postojů mladých lidí k drogám. Za rok 2013 přibylo do databáze 29 kanabinoidů, 13 fenylethylaminů, 7 katinonů, 1 tryptamin, 1 piperazin a 30 jiných látek¹⁴. Nejrozšířenějším zbožím na internetu byly v lednu 2012 přírodní produkty – thajská rostlina kratom, šalvěj divotvorná a halucinogenní houby²¹. Zkušenost s užitím těchto a dalších NPL má 5 % Evropanů ve věkovém rozsahu 15-24 let, jak vyplynulo z průzkumu z roku 2011 (cit.²⁷). Další průzkumy nejsou jednotné pro celou Evropu a v jednotlivých státech se liší provedením i frekvencí²⁸.



Obrázek 2: Vzorce mateřských sloučenin nejčastějších skupin nových psychoaktivních látek



Obrázek 3: Zastoupení skupin nových psychoaktivních látek zaznamenaných Systémem včasného varování mezi lety 2005 a 2013 (podle údajů z cit.^{14,17})

2.1.2.2 Nejrozšířenější látky v České republice

Podobně jako v celé Evropě se v České republice objevují NPL spadající do zmíněných skupin. Jejich výskyt se u nás výrazně zvýšil v roce 2010 (cit.²) a následně byla vydána novela zákona o návykových látkách²⁹. Do jeho příloh bylo přidáno 33 sloučenin. Od té doby přibyly do oficiálních seznamů návykových látek pouze dvě další látky, přestože od začátku roku 2014 tyto seznamy patří pod nařízení vlády³⁰ a je tak možné je rychle aktualizovat. Současnou českou situaci, velmi proměnlivou a zastoupením drog velmi pestrá, popisují údaje o zachycených NPL, o nabídce na internetu a reprezentativní průzkumy.

Za poslední tři roky byly v záchytech vždy zastoupeny kanabinoidy a katinony, ale celková skladba drog se různila^{1,7,31} (Tab. I). Dvakrát po sobě byly ve větším množství zachyceny pouze 4-methylethkatinon a rostlina kata jedlá. Údaje o celkovém počtu zaznamenaných látek za rok 2013 nejsou k dispozici, nejnovější čísla pocházejí z roku 2012, kdy bylo zaznamenáno 18 látek.

Na stránkách českých internetových obchodů se nabídka během dvou let velice změnila (Tab. II). V únoru 2013 byly k dostání nejčastěji katinony a celkově 42 NPL⁷. O rok dříve byla situace úplně jiná a spektrum nejvíce nabízeného zboží bylo širší¹.

Respondenti dotazníků² (Tab. III) měli v roce 2011 nejvíce zkušeností s katinony (třetina těch, kteří uvedli zkušenost s NPL) a syntetickými kanabinoidy (10-15 %). Uváděli také tryptaminy, fenylethylaminy, halucinogeny obecně a látky „podobné tradičním drogám“, které nebylo možné přesně určit. O rok dříve upřednostňovali bylinné drogy. Dále je zajímal mefedron, Spice, piperaziny a dextromethorfan.

Nové psychoaktivní látky pronikly v ČR přibližně k 1% obyvatel, nejčastěji mladým lidem. Čtyři průzkumy ukazují, že někdy v životě zkusilo NPL 1,1 % až 1,4% dotázaných a za poslední rok 0,3 až 0,6 % (cit.^{1,7,32}). Češi ve věku 15-24 let si někdy vzali NPL ze 4 %, což je o procento méně, než uvedli mladí Evropané². V roce 2011 u nás byly NPL rozšířenější než kokain, heroin a těkavé látky¹.

Tabulka I: Shrnutí dostupných údajů o nových psychoaktivních látkách nejvíce rozšířených v ČR – zachycené látky (podle údajů z cit. ^{1,2,7,31})

Rok	Droga	Kategorie
2013	ketamin	jiné
	UR-144	kanabinoid
	4-MEC	katinon
	NM-2-A	jiné
2012	4-MEC	katinon
	kata jedlá	jiné
	AM-2201	kanabinoid
	5-MeO-AMT	tryptamin
2011	mefedron	katinon
	kata jedlá	jiné
	JWH-122	kanabinoid
	methylon	katinon

Tabulka II: Shrnutí dostupných údajů o nových psychoaktivních látkách nejvíce rozšířených v ČR – nabídka na internetu (podle údajů z cit. ^{1,2,7,31})

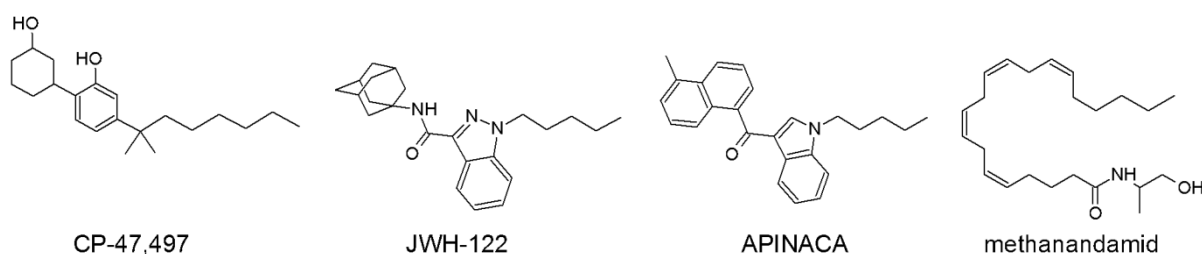
Rok	Droga	Kategorie
2012	3,4-DMMC	katinon
	3-MMC	katinon
	pentedron	katinon
2011	kratom	jiné
	6-APB	jiné
	4-FA	fenylethylamin

Tabulka III: Shrnutí dostupných údajů o nových psychoaktivních látkách nejvíce rozšířených v ČR – výsledky průzkumů (podle údajů z cit. ^{1,2,7,31})

Rok	Droga
2011	katinony
	kanabinoidy
2010	šalvěj divotvorná
	"bylinná extáze"
	efedra

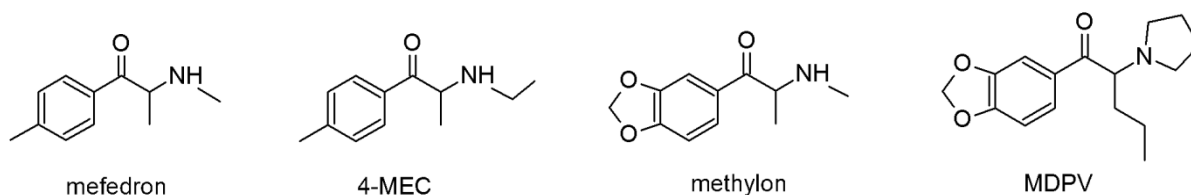
2.1.3 Hlavní skupiny nových psychoaktivních látek

Syntetické kanabinoidy jsou halucinogeny a sedativa až 40× silnější než tetrahydrokanabinol, původně vyvinuté jako léky proti bolesti, které se rozšířily po roce 2008. Účinnou látku z konopí, kanabinoidy přirozeně přítomné v těle a syntetické kanabinoidy nespojuje chemická struktura (Obr. 4), ale působení na stejný receptor. K němu stačí dávka 15 mg, nanesená na rostlinný základ například z meduňky, máty nebo mateřídoušky v produktech prodávaných pod názvem Spice. Síle účinku jsou úměrné také negativní důsledky, které na rozdíl od projevů konopných drog nejsou vyrovnávány přítomností opačně působících rostlinných látek. Některé syntetické kanabinoidy pravděpodobně mají souvislost s psychózou a selháním ledvin.^{16,26,33}



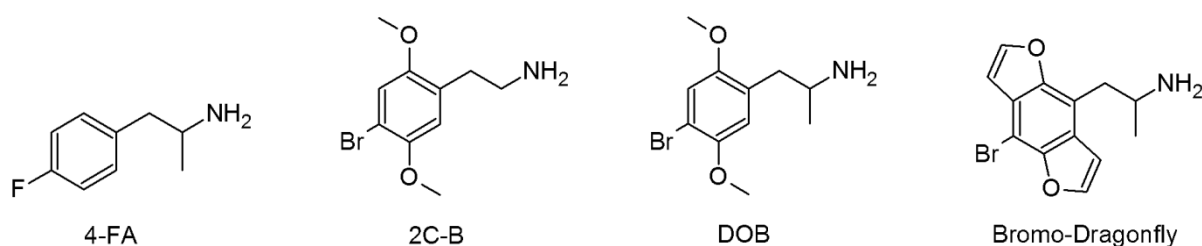
Obrázek 4: Rozmanitost struktur syntetických kanabinoidů

Listy východoafrické rostliny katy jedlé Afričané tradičně žvýkají kvůli stimulačním účinkům **katinonu**, jehož syntetické deriváty se objevily souběžně s kanabinoidy a zapříčinily řadu úmrtí. Po zhodnocení rizik jsou dva z nich, mefedron a methylenedioxypropylamfon (MDPV), zakázány v celé Evropské unii. Mefedron (Obr. 5) je z katinonů nejrozšířenější, navozuje pocity velkého množství energie, euforii, zrychlené myšlení, zvýšenou hovornost a intenzivní vnímání hudby. Negativní klinické příznaky zahrnují tachykardii, bolest na hrudi, zvracení, neklid, úzkost a zmatenost. Bývá přirovnáván k amfetaminům, od nichž se liší ketoskupinou.^{16,26,34}



Obrázek 5: Syntetické katinony zachycené v ČR (mefedron, 4-MEC, methylon) nebo zakázané v EU (mefedron, MDPV)

Rozmach **fenylethylaminů**, odvozených od stejnojmenného neurotransmiteru, nastal po podrobném popisu jejich syntézy v knize profesora Shulgina a přinesl nebezpečné rozdíly v síle účinku. Inspirace trhu dílem „PIHKAL: A Chemical Love Story“ z roku 1991 a dalšími trvá ještě dnes a teprve nedávno přibylo najednou více fenylethylaminů jiného původu. Šest z devíti nových drog kontrolovaných v EU spadá do této skupiny stimulantů, halucinogenů a entaktogenů, konkrétně TMA-2, 4-MTA, 2C-I, 2C-T-2, 2C-T-7 a PMMA¹⁷. Nepříznivě se mohou fenylethylaminy projevit zvracením, tachykardií, zúžením cév, metabolickou acidózou a selháním jater a ledvin. Účinná dávka má většinou několik desítek mg a působí několik hodin. Těmto hodnotám se ovšem vymykají DOB (Obr. 6) a DOI s dávkou 1-3 mg a až třicetihodinovým působením. Dalším stupněm je Bromo-Dragonfly s dávkou 0,2-1 mg a dobou účinku jeden až tři dny. Jeho záměna za slabší sloučeninu s podobným obchodním názvem (například 2C-Bromo-Fly) je smrtelná a je jen jednou z příčin úmrtí, za kterými fenylethylaminy stojí.^{16,26,34}

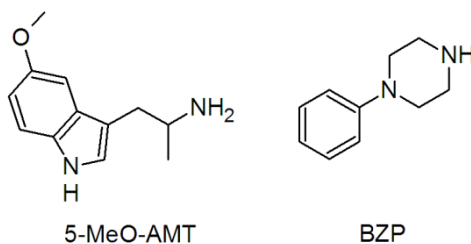


Obrázek 6: Derivát fenylethylaminu zachycený v ČR a bromované fenylethylaminy podle rostoucí síly účinku

Halucinogenní deriváty **tryptaminu** jsou podrobně popsány v Shulginových volně dostupných publikacích stejně jako fenylethylaminy a objevily se zhruba ve stejnou dobu, ale nerozšířily se stejnou měrou. Na rozdíl od nich pravděpodobně neohrožují životní funkce;

mohou být neurotoxické a způsobit serotoninový syndrom, negativní projevy po požití zahrnují tachykardii, zvýšený tlak a jiné. Strukturně se tryptaminy podobají psilocinu z lysohlávek a serotoninu (Obr. 7) (cit.^{26,34}).

Piperaziny, zneužívané po roce 2004, pocházejí z okruhu zamítnutých léčiv a na rozdíl od předchozích skupin se nevztahují k psychoaktivní přírodní látce. Působí jako stimulanty a BZP, mCPP a TFMPP se proto záměrně zaměňují s extází. BZP (Obr. 7) je ve srovnání s extází bezpečnější ohledně serotoninového syndromu, zato je účinkem tak blízký amfetaminu, že je uživatelé od sebe nerozeznají. Výhoda nižšího rizika neplatí pro mCPP. Tento piperazin je hlavním metabolitem několika antidepresiv, těch se však podává méně než rekreačních 50-200 mg. Nezpůsobují tak ani entaktogenní, případně halucinogenní stavy, ani možné záchvaty úzkosti, migrénu a serotoninový syndrom^{16,26,34}.



Obrázek 7: Derivát tryptaminu zachycený v ČR a derivát piperazinu kontrolovaný v EU

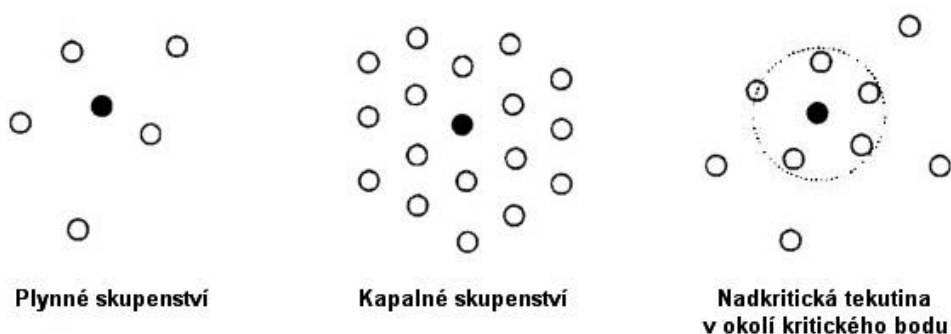
Ostatní látky tvoří téměř třetinu všech NPL a za rok 2013 měly největší podíl na počtu nově objevených látek. Velký podíl na užívání NPL v ČR mají rostlinné drogy, např. kratom a šalvěj divotvorná¹. Dále se začíná zvyšovat počet nových syntetických opioidů, jako jsou AH-7921, MT-45 a karfentanil⁵. Nové opioidy jsou vnímány jako možné riziko vzhledem tomu, jaké riziko představují mezi klasickými drogami. Drogová úmrtí v Evropě jsou ze tří čtvrtin zapříčiněna právě opioidy²⁴. Dalšími látkami, které jsou kvůli způsobeným úmrtím kontrolovány v EU, jsou 5-IT a 4,4'-DMAR, ze stejného důvodu zmíněné již v kapitole 2.1.1.

2.2 Superkritická fluidní chromatografie

Analytická chemie směřuje svůj vývoj k metodám rychlým, účinným, použitelným na široké spektrum vzorků a nenáročným na spotřebu toxických rozpouštědel. Hranice některých kombinací těchto požadavků posouvá v chromatografii k lepšímu technika, která těží z chování látek nad kritickými hodnotami teploty a tlaku. Význam získala především v analýze nepolárních a chirálních sloučenin a po překonání nedostatků, zabraňujících jejímu širšímu přijetí, se k ní obrací pozornost. Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je založena na jedinečných fyzikálních vlastnostech mobilní fáze, které jí poskytují oproti plynové a kapalinové chromatografii zvláštní výhody, a je použitelná pro rostoucí počet analytů.

Jednou z charakteristických změn v chování látek při překročení kritických podmínek je zvýšená rozpouštěcí schopnost, jejíž příčinu popisuje teorie shlukování³⁵ (*cluster theory*). V nadkritickém stavu vznikají nestálé shluky, rychle měnící velikost a složení vlivem srážek. Molekula je zachycena do shluku ve chvíli, kdy je její okamžitá kinetická energie nižší než přitažlivá energie k sousedním částicím. Solut je takovým solventem obklopen, jestliže jejich přitahování je energeticky výhodnější než interakce molekul solventu mezi sebou. Situaci v plynném, kapalném a nadkritickém stavu porovnává Obrázek 8. Rozpustnost solutu v nadkritické tekutině roste s tlakem a postupně jsou solvatovány i polárnější nebo výševroucí sloučeniny³⁶. Změnou tlaku lze ovlivňovat selektivitu separace a řídit gradientovou eluci, což v plynové a kapalinové chromatografii není možné.

Druhým rysem nadkritického stavu jsou difúzní koeficienty, které přesahují hodnoty typické pro kapaliny a nepřekračují hodnoty plynů³⁷ (Tab. IV). S difúzním koeficientem se zvyšuje optimální lineární průtoková rychlost mobilní fáze (u), a nemění se minimum výškového ekvivalentu teoretického patra (H). Znamená to, že při zachování stejné účinnosti roste



Obrázek 8: Chování molekul v různých skupenských stavech (převzato z cit.³⁵)

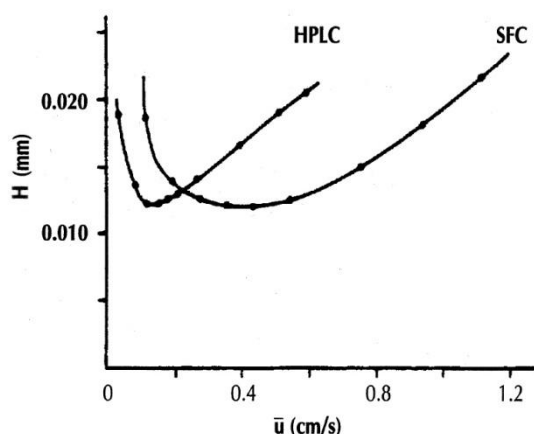
Tabulka IV: Průměrné fyzikální vlastnosti plynů a kapalin při normálních podmínkách a nadkritických tekutin při nadkritických podmínkách (převzato z cit.³⁶)

Skupenský stav	Hustota ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Difúzní koeficient ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	Dynamická viskozita ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
Plyn	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}
Nadkritická tekutina	$3\cdot 10^{-1}$	10^{-3}	10^{-2} až 10^{-1}
Kapalina	1	10^{-5}	1

rychlost analýzy od HPLC přes SFC ke GC. Z tohoto pohledu je SFC sice nejméně 100× pomalejší než GC, ale až 10× rychlejší než HPLC. Průběh závislosti H na u je na Obrázku 9.

Za třetí, hodnota dynamické viskozity nadkritických tekutin rovněž leží mezi hodnotami pro plyny a kapaliny³⁷ (Tab. IV). Dynamická viskozita nižší ve srovnání s kapalinami znamená výhodu menšího tlakového spádu na koloně, využitelnou různými způsoby. Na koloně dané délky je možné použít nižší tlak než u HPLC, a to i pro vyšší u , neboť tlakový spád bude například při 2,5násobném průtoku čtvrtinový. Naopak při daném tlaku může být kolona delší nebo spojena s dalšími kolonami, jako tomu bylo u separace citronových olejů na sérii 10 kolon za sebou³⁸. Spojení chirální a achirální kolony zde navíc nevyžaduje odlišné mobilní fáze a SFC dovoluje oddělení dvou enantiomerů i matrice v jednom kroku³⁹.

Dále nadkritická mobilní fáze díky svým vlastnostem usnadňuje ekvilibraci kolony a separaci ve velkém měřítku a nejčastěji používaná mobilní fáze nezatěžuje životní prostředí. Pokud jde o ekvilibraci kolony, stačí množství eluentu, které odpovídá jen trojnásobku až pětinasobku jejího objemu⁴⁰. Mezi analýzami se pak podmínky po gradientu tlaku, teploty nebo složení rychle navrací do původního stavu. Příznivá pro preparativní metodu je vysoká účinnost kolon. Metoda je navíc poměrně jednoduše převaditelná z vyvinutého analytického



Obrázek 9: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze (u) pro pyren analyzovaný HPLC a SFC na koloně typu C_{18} (převzato z cit.⁴¹)

postupu, protože až pětkrát větší průtok a stejná velikost částic náplňové kolony nevedou k potížím s tlakem⁴². Po skončení separace rozpouštědlo snadno přechází do plynného stavu a izolace produktu je proto rychlá. Například v práci zaměřené na vývoj léčiva zkrátily autoři nahrazením HPLC za SFC odstraňování solventu z původních 8 h na 1 h (cit.⁴³). Namísto organických rozpouštědel, v preparativní HPLC spotřebovávaných ve velkých objemech, je mobilní fází téměř výhradně CO_2 , šetrný k životnímu prostředí. Námitku, že CO_2 pro SFC by mohl přispívat ke skleníkovému efektu, vyvrací tvrzení o jeho původu⁴⁴. Získává se jako vedlejší produkt procesů v chemickém průmyslu nebo přírodních procesů, jako je fermentace.

Okruh vzorků zahrnuje oproti GC i tepelně nestálé a netěkavé bez nutnosti derivatizovat, a z tohoto pohledu je SFC bližší HPLC. Při použití samotného nepolárního CO_2 má blízko k chromatografii na normálních fázích a je tak komplementární k HPLC na obrácených fázích (RP-HPLC). Ke klasickým analytům patří nepolární až mírně polární organické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností do 10 000, rozpustné v methanolu a méně polárních rozpouštědlech. Obtížné analyty se vyznačovaly rozpustností ve vodě nebo potřebou tlumivého roztoku³⁷. Situace se však změnila s modifikátory, aditivy a vývojem kolon a v posledních deseti letech množina vhodných vzorků zahrnuje i sloučeniny polární a iontové. Publikované práce se zabývají například hydrofilními peptidy⁴⁵, složenými až ze 40 aminokyselin, nebo polárními a iontovými organickými látkami z oblasti farmacie⁴⁶, včetně zásad⁴⁷, pro SFC původně problematických. V jakém rozsahu se v oblasti farmacie SFC vyrovná původně komplementární RP-HPLC, ukázalo porovnání obou způsobů separace

pro 2153 sloučenin⁴⁸. Jediným případem, kdy první metoda neuspěla, a druhá ano, byly fosfáty, fosfonáty a bisfosfonáty. SFC se významně uplatnila v analýze enantiomerů, léčiv, fosilních paliv a uhlovodíků, tuků a jiných nepolárních biomolekul, povrchově aktivních látek, zemědělských chemikálií, výbušnin a organokovů⁴⁹.

Plynová, superkritická a kapalinová chromatografie na sebe navazují a překrývají se nejen v oblastech uplatnění. Kritická teplota a tlak jsou pevně stanoveny, ale fyzikální veličiny jako viskozita a difúzní koeficienty se mění pozvolna. Při určitých změnách podmínek v průběhu experimentu tedy metoda plynule přechází mezi GC, SFC a LC. V kontrastu s přeceňováním rozdílů mezi nimi jejich provázanost zdůrazňuje výraz „jednotná chromatografie“ (*unified chromatography*)³⁷.

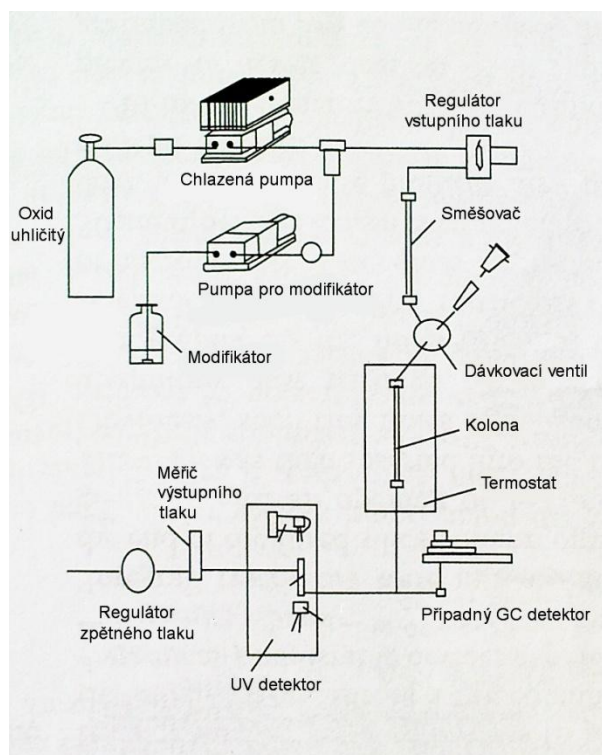
2.2.1 Instrumentace

V roce 1962 byly chromatograficky odděleny tepelně nestálé porfyriny za teploty a tlaku přesahujících kritické hodnoty freonové mobilní fáze, a tímto byla poprvé uskutečněna superkritická fluidní chromatografie⁵⁰. První komerční přístroj pro SFC byl k dostání v roce 1982 jako rozšíření chromatografu pro HPLC a jeho součástí byla náplňová kolona. V roce 1986 se na trhu objevil další komerční přístroj, tentokrát podobný více GC a s kapilární kolonou. Jejich instrumentace je odlišná tak, že záměna kolony za náplňovou v systému pro kolonu kapilární není možná⁴². Dnes má po různých meznících ve vývoji (Tab. V) převahu v laboratořích i v následujícím textu uspořádání podobné HPLC, od níž se odlišuje především regulátorem zpětného tlaku. Dalšími součástmi tohoto uspořádání (Obr. 10) jsou zásobní lahev s CO₂, chlazená pumpa pro CO₂, zásobní lahev s modifikátorem a pumpa pro modifikátor. Následují regulátor vstupního tlaku, dávkovací ventil, kolona v termostatu, měřič výstupního tlaku a detektor. Součásti, jejichž výběr ovlivňuje separaci, a detektory jsou popsány blíže.

Kolony, kapilární a náplňové, se liší v rozměrech, způsobu gradientu a výběru detektoru. **Kapilární kolony** často dosahují 10 m, vnitřní průměr mají 50 až 100 μm, tedy výrazně menší než příslušné vybavení GC, a více zesíťovanou stacionární fází. Ideální vnitřní průměr, daný difúzním koeficientem mobilní fáze, je dokonce 10 μm a je pro praxi příliš malý. Kompromis v tomto ohledu vede ke kompromisu v rychlosti a účinnosti. Gradientová eluce je zajištěna změnou tlaku, čehož se dosahuje řízením průtoku. Jiná řešení jsou omezena technikou, zejména pumpami a restriktorem, takže tlak a průtok na sobě nemohou být

Tabulka V: Důležité kroky ve vývoji superkritické fluidní chromatografie^{35,37,42}

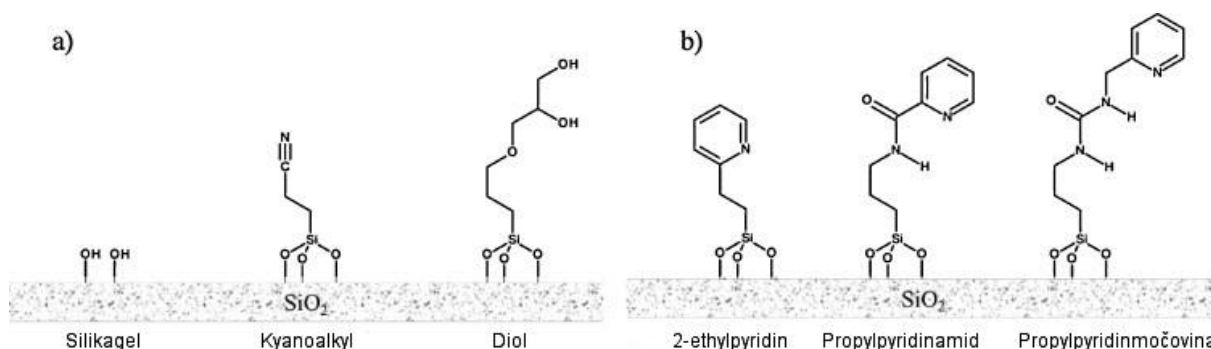
1958	myšlenka použití superkritického skupenství v chromatografii
1962	chromatografická analýza uskutečněná se superkritickou mobilní fází
1966	CO ₂ jako mobilní fáze
1968	nezávislost tlaku na průtoku
1969	použití modifikátorů mobilní fáze
1970	programování tlaku
1982	komerční přístroj s náplňovou kolonou
1985	využití k chirálním separacím
1986	komerční přístroj s kapilární kolonou
1988	použití aditiv k mobilní fázi
1988	analýza iontů pomocí iontově párového činidla ⁴⁰
1992	komerční přístroj s regulací průtoku nezávislou na gradientu složení a gradientu tlaku
2004	analýza polárních sloučenin a organických iontů pomocí aditiv ⁴⁶
2010	ultraúčinná analýza na koloně s 1,8 μm částicemi ⁵¹



Obrázek 10: Schéma SFC v uspořádání s náplňovou kolonou a UV detektorem (převzato z cit.⁵²)

nezávislé a nejsou optimální oba v jednom okamžiku. Technika také těžko dovoluje gradient složení nebo neměnný podíl modifikátoru v mobilní fázi. Na jednu stranu to znamená kompatibilitu s plamenově ionizačním detektorem (FID), na druhou stranu je tím vyloučena analýza polárnějších sloučenin, což bylo důvodem ústupu kapilární SFC^{35,37,42,53}. Rozměry **náplňových kolon** bývají 15 až 25 cm nebo více, vnitřní průměr 2 až 4,6 mm a velikost částic 3 až 5 μm . K dostání jsou také kolony pro ultraúčinnou SFC. Vzhledem k parametrům dnešních přístrojů jsou pro ně vhodné rozměry 3,0×100 mm, jejich náplň tvoří částice menší než 2 μm . Vymývání vzorku, který je vzhledem k velkému povrchu náplně zadržován 10× až 100× více než v kapilárách, usnadňuje programované složení mobilní fáze. Gradienty složení, tlaku a průtoku jsou na sobě nezávislé díky elektromechanickému regulátoru zpětného tlaku, jehož hlavní funkcí je stejně jako u restriktoru udržování nadkritických podmínek. Modifikátory a aditiva mají rušivý vliv na detekci FID, zato spojení s absorpční spektrofotometrií a hmotnostní spektrometrií je v tomto případě snazší než v kapilárním systému^{37,42,54}.

Stacionární fáze jsou převzaty z HPLC nebo vyvinuty speciálně pro SFC a některé se ukázaly jako všestranné. K převzatým sorbentům, které zohledňují nízkou relativní permitivitu čistého CO₂ a jsou polární, dlouho patří silikagel s chemicky vázaným kyanopropylem, aminopropylem, diolem nebo nemodifikovaný silikagel. Nepolární chemicky vázané skupiny jako oktyl, dodecyl nebo oktadecyl mohou ve shodě s pokrokem v HPLC obsahovat zabudovanou polární funkční skupinu (tzv. *polar embedded group*). Mohou být také upraveny pokrytím volných silanolových skupin, které zůstaly pro alkylační činidlo nepřístupné, méně rozměrným činidlem (tzv. *end-capping*)⁵⁵. Přestože výběr ze sorbentů určených původně pro kapalinový systém není ničím omezen, snaha analyzovat polární látky bez aditiv vedla k novým stacionárním fázím navrženým pro potřeby SFC. Jednou z prvních byl v roce 2001 ethylpyridin na plně porézním silikagelu, další nabízené fáze obsahují ve struktuře amid, sulfonamid nebo močovinu a jiné⁵⁶ (Obr. 11). Podle výrobců není aditivum potřeba například na ethylpyridinové koloně k separaci aminů a na aminofenylové koloně k separaci aminů, alkoholů nebo kyselin⁵⁷. Mezi vybranými stacionárními fázemi posuzovanými z hlediska všestrannosti nejlepší výsledky poskytly dvě, a to zesíťovaná diolová, vyvinutá pro HILIC, a ethylpyridinová⁵⁸. Aspoň jedna z nich umožnila dobré rozlišení pro 98 % vzorků pocházejících z farmaceutických výzkumných laboratoří a vhodných pro SFC. V jiné studii se z ethylpyridinové fáze a fáze typu *bridged ethylene*



Obrázek 11: Některé modifikace silikagelových stacionárních fází v SFC: **a)** převzaté z HPLC, **b)** vyvinuté speciálně pro SFC (převzato z cit.⁵⁶)

hybrid elovalo 100 % a 90 % sloučenin, kdy z celkového počtu 92 léčiv převažovaly zásadité nad neutrálními a kyselými⁴⁷. V pravděpodobně nejrozsáhlejší práci se sorbent s kyanoskupinou ukázal jako univerzální pro sloučeniny z oblasti farmacie, zahrnující přes 2000 různých struktur⁴⁸.

Stacionární fáze podléhající nedávnému trendu jsou navázány na částice menší než 2 μm , jejichž malý průměr ale díky vlastnostem superkritické mobilní fáze neznamená významně zvýšené nároky na přístroj⁵¹. Pro zvláště nízký průtok nemusí být instrumentace na rozdíl od UHPLC uzpůsobena, protože optimální průtoková rychlost je vyšší. Tlak, který musí superkritický chromatograf zajistit, nepřesahuje limity HPLC a dosahoval například 40 MPa při výstupním tlaku 15 MPa a průtoku 2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Tlakový spád odpovídal nejvýše 25 MPa, zatímco u UHPLC to může být 100 MPa při průtoku polovičním. S nižším tlakovým spádem následně souvisí nižší nežádoucí gradient teploty, který by byl způsoben třením. Nižší gradient teploty předchází situaci publikované pro UHPLC, kdy na vstupu a výstupu 5cm kolony byl při tlakové ztrátě 82 MPa naměřen rozdíl teplot 13 $^{\circ}\text{C}$ (cit.⁵⁹).

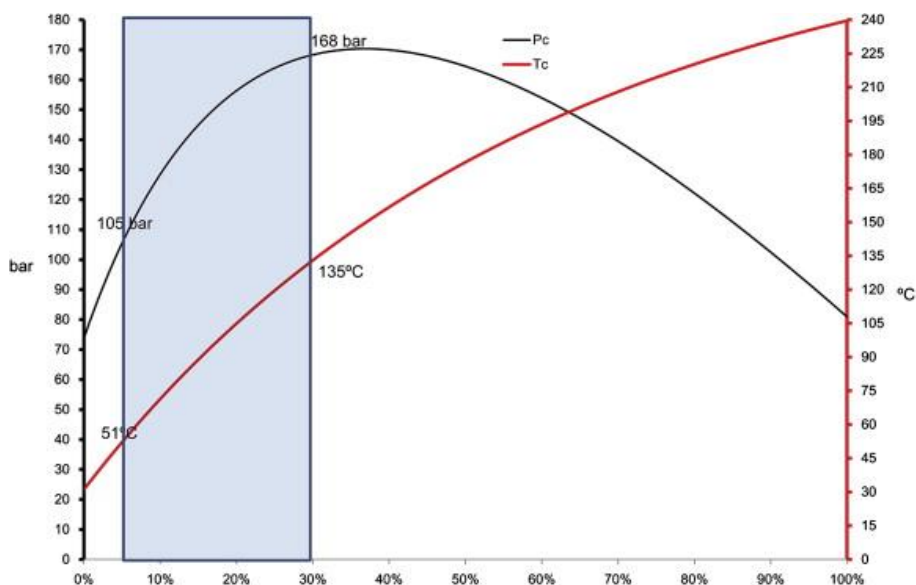
Mobilní fázi tvoří oxid uhličitý, často doplněný o polární organické rozpouštědlo a případně o aditivum. Jako superkritický eluent je jednoznačně nejprůhodnější, svou nízkou polaritou předurčuje okruh analytů a jen výjimky potvrzují pravidlo o jeho dostačující netečnosti. V jeho prospěch rozhodly nízké kritické hodnoty teploty (31 $^{\circ}\text{C}$) a tlaku (7,38 MPa), inertnost a příznivý poměr čistoty a ceny⁶⁰. Není toxický a nezatěžuje životní prostředí. Solvatační schopností se čistý CO_2 podobá hexanu³⁷, ale se zvyšující se hustotou se okruh rozpouštěných látek posouvá k polárnějším. Má nulový dipólový, ale významný kvadrupólový moment a může se chovat jako slabá lewisovská kyselina nebo zásada⁶¹. Nežádoucím způsobem kyselost CO_2 přispěla například při separaci léčiv se sulfoxidovou

skupinou k jejich degradaci⁶². S methanolem, který se velmi často přidává jako modifikátor pro zvýšení polaritu, dochází ke vzniku methylesteru kyseliny uhličité a posunu pH mobilní fáze k hodnotě 5. Tato reakce může mít ale i žádoucí účinek, například pokud vzorek obsahuje aminoskupiny, které by mohly s čistým CO₂ zreagovat. Za přítomnosti methanolu probíhá reakce CO₂ a methanolu přednostně a aminoskupiny jsou tak ochráněny. Reaktivita CO₂ se týká i aditiv, kdy zabraňuje nepříznivým účinkům hydroxidu amonného na silikagelovou kolonu⁴⁷.

Aditiva rozšířila aplikace SFC o separace řady polárních sloučenin. Důvodem pro jejich použití jsou snadnější eluce a symetričtější píky namísto zadržování na koloně nebo silného chvostování, typických u vícesytných kyselin a primárních alifatických aminů³⁷. Výrazné zlepšení díky použití aditiv vystihuje analýza vybraných zásad, kterých se bez úpravy eluovalo jen 29 %, ale s vhodně zvoleným aditivem 90 % (cit.⁴⁷). Účinné aditivum obsahuje obdobnou funkční skupinu jako analyt a je polárnější – kyseliny se nejlépe vymyjí s kyselinou trifluoroctovou, aminy s isopropylaminem³⁷. Kromě nich se přidávají kyselina mravenčí a octová, hydroxid amonný, dimethyl- a trimethylamin a ze solí mravenčan, octan a uhličitán amonný a jiné, všechny typicky o nízké koncentraci⁴⁶. Separaci zlepšují různými způsoby od iontového párování a potlačení disociace analytu přes změnu polaritu a rozpouštěcí schopnosti mobilní fáze k pokrytí aktivních míst a změnu polaritu stacionární fáze⁴⁰.

Rozpouštěcí schopnost mobilní fáze lze plynule měnit **gradientem** hustoty nebo složení. Hustota má zásadní vliv v čistém CO₂ nebo za přítomnosti několika procent modifikátoru. Čím je vyšší, tím je intenzivnější interakce analytu s mobilní fází, lepší rozpustnost a nižší retence. Retence závisí na hustotě exponenciálně a posunuje se až o tři řády. Průběh hustoty se volí lineární s časem a prakticky se provádí změnou tlaku, případně teploty⁵³. Při gradientu složení roste podíl modifikátoru od jednotek po desítky procent a s ním i kritický tlak a teplota (Obr. 12). Přístrojové parametry nemusí vždy zaručit udržení mobilní fáze v superkritickém stavu, následkem toho se hustota příliš nemění a o retenci rozhoduje složení³⁵. Zůstává však zachována výhoda viskozity, difúzních koeficientů a zvýšené rozpouštěcí schopnosti, ke které přispívá i modifikátor. Molekuly modifikátoru se shlukují přednostně kolem polárního solutu, takže například 2 % methanolu mají vliv předpokládaný pro 10 % a rozpouštěcí schopnost stoupá nelineárně³⁷. Účinek strmě roste

při nízkých koncentracích, kdy probíhá soutěžení s analytem o aktivní místa stacionární fáze; další přídavky zvyšují polaritu a hustotu mobilní fáze, ale jejich účinek není tak patrný⁵³.



Obrázek 12: Závislost kritického tlaku (vlevo) a kritické teploty (vpravo) na rostoucím přídavku modifikátoru k superkritické mobilní fázi. Ohraničen je gradient od 5 % do 30 % modifikátoru (převzato z cit.³⁵)

Do **detektoru** může mobilní fáze přicházet v superkritickém stavu, po převedení na plyn nebo po zkvalnění, a díky tomu má SFC nejširší možnosti detekce z chromatografických technik. Plynové chromatografii se vyrovná začleněním FID, který se stal téměř samozřejmou součástí kapilárního uspořádání a který je kompatibilní s CO₂, ne však s modifikátory a aditivy. Uplatnění mají termoionizační, plamenově fotometrický detektor a detektor elektronového zachytu. Zároveň SFC není ochuzena o spojení s UV/Vis spektrometrií, typické v případě náplňových kolon; podmínkou je průtoková cela odolná vůči vysokému tlaku. Společným s HPLC je také detektor rozptylu světla po odpaření mobilní fáze (*evaporative light scattering detector*), pro který znamená výhodu snadné odpařování eluentu a podíl CO₂ na zmlžování. K dalším analytickým koncovkám zařazovaným za SFC patří spektrometr pro infračervenou oblast záření, kde ale poskytuje signál i mobilní fáze, pokud CO₂ není nahrazen xenonem. Významné je spojení s hmotnostní spektrometrií.^{37,49,63}

2.2.2 Superkritická fluidní chromatografie v analýze drog

Použití superkritické fluidní chromatografie v analýze drog je spjaté s jejím historickým vývojem. Po nástupu SFC kolem roku 1984 se rozmach týkal především instrumentace s kapilární kolonou a plamenově ionizačním detektorem. Toto uspořádání vystřídal na začátku 90. let kolony náplňové ve spojení s UV detektorem nebo hmotnostním spektrometrem⁴².

Dostupné odborné práce, které zahrnují SFC s kapilární kolonou a FID, popisují analýzu metabolitů kanabinoidů, alkaloidů z koky a opiátů. Metabolity kanabinoidů byly rozděleny za programované hustoty mobilní fáze a byla ověřena vhodnost tohoto postupu pro vzorky z praxe⁶⁴. Stejně přístrojové vybavení bylo použito i pro kokain⁶⁴. Pro izomery dalších alkaloidů z koky se na několika typech kapilárních kolon metoda SFC-FID ukázala jako nepraktická - za daných podmínek byly i přes gradient hustoty CO₂ separovány pouze částečně a až po 70 min (cit.⁶⁵). Úspěšně separovány a detekovány byly opiáty, jmenovitě heroin a acetylkodein, a sloučeniny používané k jejich ředění⁶⁶.

Časté spojení náplňové kolony s UV detektorem je zdokumentováno i pro opiáty, amfetaminy a množství zásad. Pro morfin, kodein, thebain, noskapiin a papaverin umožnilo toto spojení za použití modifikátorů zkrátit dobu analýzy na polovinu ve srovnání s HPLC. Mobilní fáze byla z 15-20 % tvořena směsí methanolu, triethylaminu a vody. Pro dvě drogy (noskapiin a papaverin) bylo obtížné dosáhnout úplného rozlišení, ze dvou testovaných kolon bylo na silikagelové stacionární fázi jen částečné a na silikagelové stacionární fázi s navázaným aminopropylem jej nebylo dosaženo vůbec⁶⁷. V jiné studii autoři upravili polaritu mobilní fáze 12 % methanolu a 1% vody za účelem eluce heroinu, acetylmorfinu a acetylkodeinu⁶⁶.

Podle další práce byly amfetamin, metamfetamin a efedrin po předchozí derivatizaci analyzovány na třech typech kolon vždy za dobu kratší než 6 min. Po reakci s 9-fluorenylmethylchlorformiátem byly separovány na silikagelu a silikagelu s navázaným oktadecylem nebo aminopropylem, mobilní fáze byla obohacena o 7 % methanolu a 5 % isopropylalkoholu. Podle autorů by se bez derivatizace amfetaminy vzhledem ke své polaritě silně sorbovaly na stacionární fázi a pravděpodobně by reagovaly s CO₂ za vzniku karbamátů. Tento krok navíc však způsobil, že SFC-UV neposkytla výrazné výhody oproti zavedené GC-MS metodě⁶⁸. Amfetamin, metamfetamin a jejich 3,4-methylenedioxyderiváty byly analyzovány také po reakci s fenylisothiokyanátem na dvou typech kolon, které bylo

pro rozlišení alespoň většiny sloučenin nutné spojit. Jako stacionární fáze autoři zvolili silikagel a polystyrendivynylbenzen. Tento experiment byl proveden po zavedení komerčně dostupných regulátorů tlaku, dovolujících měnit tlak, průtok a složení mobilní fáze nezávisle na sobě. Množství modifikátoru v mobilní fázi se tedy mohlo měnit a obsah methanolu s nepatrným přídavkem diethylaminu se pohyboval v rozmezí od 1 % do 12 %. V otázkách úprav vzorku, doby potřebné pro analýzu a hodnot rozlišení SFC nepřekonalala paralelně zkoumané metody HPLC-DAD, GC-FID a CE-UV, poskytla však nižší mez detekce⁶⁹. Později byly obtíže v analýze polárních a organických iontových látek vyřešeny jinak než derivatizací, a to využitím amonných solí jako modifikátorů⁴⁶.

V nedávné době byl dále zkoumán trvajícím problémem asymetrie píků zásad, silně rostoucí zhruba od pH 6, a byly popsány nejpříznivější podmínky pro separaci. Po předběžném experimentálním ohodnocení sedmi kolon byly určeny dva nejvhodnější typy, kterými následně prošlo 92 sloučenin včetně amfetaminu, kokainu, heroinu a dalších drog. Užší okruh analytů byl vybrán pro dvě obdobné kolony s částicemi náplně menšími než 2 μm . Na prvním typu stacionární fáze, silikagelové s navázaným 2-ethylpyridinem, bylo separováno až 98 % sloučenin při optimální lineární rychlosti 4 \times vyšší než u HPLC. Gradient se pohyboval mezi 5 % až 40 % methanolu v CO_2 bez dalšího modifikátoru. Předpokládá se, že 2-ethylpyridin omezuje interakci s volnými silanolovými skupinami sterickým stíněním a zastává tak funkci bazické přísady. Chování kolon záviselo na druhu silikagelu, hustotě ligandů, pK silanolových skupin, vazebných procesech a pokrytí silanolových skupin (*end-cappingu*). Na druhém typu stacionární fáze, hybridní silikagelové, byly zachovány stejné podmínky doplněné o hydroxid amonný s výsledkem 90 % uspokojivě eluovaných sloučenin. Oba postupy byly zopakovány na kolonách s částicemi menšími než 2 μm a pro sloučeniny s pK až 7 se mezi nimi neprojevil žádný rozdíl. Nejsilnější, a tedy nejproblémovější zkoumané zásady s pK 8 až 9 vykazovaly na ethylpyridinové fázi přílišnou asymetrii, zato hybridní silikagel za přítomnosti modifikátoru prokázal použitelnost i v těchto podmínkách⁴⁷.

Kombinací SFC a hmotnostně spektrometrické detekce se zabývá samostatný oddíl práce.

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která je schopná využít stopové množství analytu a odhalit jeho strukturu. Její začátky se vztahují ke hledání izotopů a důležitým hmotnostně spektrometrickým experimentem bylo v roce 1913 oddělení ^{20}Ne a ^{22}Ne po jejich převedení do nabitého stavu⁷⁰. Principem tehdejšího pokusu i dnešní metody je rozdělení iontů působením elektrického a/nebo magnetického pole podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Od té doby bylo odborníky dvakrát vysloveno přesvědčení, že vyčerpala své možnosti. Rozvoj instrumentace přesto hmotnostní spektrometrii dovedl k současnému širokému uplatnění, stále pokračuje a od několika vývojových směrů se očekávají významné pokroky⁷¹.

Základní součásti hmotnostního spektrometru představují vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (oba ve vakuu) a počítač pro zpracování dat. Iontové zdroje pracují za sníženého nebo atmosférického tlaku a obecně je lze rozřadit na elektronové, sprejové, chemické a desorpční. Jde například o ionizaci elektronem, fotoionizaci, elektrosprej, chemickou ionizaci, desorpční ionizaci za přítomnosti matrice (MALDI), desorpční elektrosprej a mnoho dalších. Hmotnostní analyzátory lze rozdělit na průletové a na iontové pasti. Jmenovitě jsou to analyzátor doby letu (TOF), magnetický sektorový, iontová past, kvadrupólový hmotnostní filtr, orbitrap, iontový cyklotron (ICR) a jiné^{71,72}. Fakt, že nejde o bezvýznamné položky ve výčtu součástí přístroje, zdůrazňují kromě praxe také Nobelovy ceny udělené za vývoj elektrospreje, MALDI a iontové pasti⁷⁰.

V praxi hmotnostní spektrometrie pronikla do mnoha odvětví a přesáhla hranice analytické chemie. Slouží k ověření kvality potravin, zemědělských produktů a předmětů denní potřeby včetně dětského zboží. Používá se ve farmacii při hledání nových léků, v lékařství k diagnostice nádorových onemocnění a metabolických poruch, v toxikologii a při antidopingové kontrole. Kriminalisté s její pomocí identifikují drogy a výbušniny a je součástí výbavy vesmírných sond. Používá se v geologii a k určení stáří historických předmětů⁷¹.

Očekávání do budoucna se vztahuje k miniaturizaci, rozvoji instrumentace a některým technikám. Přenosné spektrometry, u kterých se uvažuje až o integraci iontové optiky do čipů, by mohly odhalovat například chemické nebo biologické zbraně přímo v terénu. Výhodu rychlé analýzy vzorku bez předchozího zpracování poměrně nedávno přinesly ambientní iontové zdroje, pracující za atmosférického tlaku a teploty. Kromě toho se rozšířily nové

fragmentační techniky a zlepšují se analyzátory s vysokou rozlišovací schopností. Hmotnostně spektrometrické zobrazování poskytuje informace o chemickém složení povrchu, ale bude pro něj podstatné zdokonalení povrchového rozlišení. Spektrometrie iontové pohyblivosti odlišuje například konformace proteinů, neboť rozděluje ionty podle účinného kolizního průřezu, a tedy podle velikosti, tvaru a náboje⁷². Prakticky dnes pokrok znamená například jednoduché a velmi rychlé stanovení kokainu z jednoho vlasu a důkaz o průběhu jeho užívání podle rozložení koncentrace od kořínku ke konečku⁷³. Dále může být usvědčen pachatel znásilnění díky hmotnostně spektrometrickému zobrazení lubrikantu z prezervativu na otiscích prstů, a to po jejich sejmutí ještě několik týdnů po činu⁷⁴. Dopady rozvoje hmotnostní spektrometrie se postupně promítnou do rutinní analýzy drog a posunou o krok dál její současný stav.

2.3.1 Instrumentace hmotnostní spektrometrie v analýze drog

Ve většině forenzních a klinických laboratoří jsou v současné době zavedenými metodami pro analýzu neznámé drogy HPLC s detektorem s diodovým polem a GC-MS (cit.⁷⁵). Hmotnostní spektrometrie se zde v posledních letech používá také po separaci HPLC a v menší míře se začíná prosazovat kombinace s kapilární elektroforézou⁷⁶. Co se týká SFC, oživení zájmu o ni nastalo poměrně nedávno a přehledové články ji jako klasickou výbavu laboratoří neuvádějí. Každé z používaných technik předchází úpravy vzorku, jsou pro ně vhodné různé způsoby ionizace a analyzátory a mají silné i slabé stránky.

Postavení GC-MS v analýze drog mezi lety 2002 až 2011 popisují vybrané odborné práce, shrnuté v několika přehledových článcích^{18,77,78}. Úpravy vzorku před vlastní analýzou podle nich zahrnují extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) nebo extrakci pevnou fází (SPE), odstranění proteinů nebo filtraci. Pro GC-MS je navíc specifická derivatizace (methylace, acetylace, trimethylsilylace, trifluoracetylace) nebo v případě metabolitů štěpení konjugátů druhé fáze metabolismu. Ze způsobů převedení vzorku do nabitého stavu je v uvedených pracích nejvíce zastoupena ionizace elektronem. Pro dosažení nízké meze detekce a vysoké citlivosti a selektivity poskytuje výhodu chemická ionizace, ať už pozitivní nebo negativní. V hmotnostním spektru je pak ale přítomno malé množství charakteristických fragmentů, a tyto způsoby ionizace tak nemusí být například pro forenzní účely dostačující. Z analyzátorů jednoznačně převládá jednoduchý kvadrupólový. Slabou stránkou GC-MS jsou omezení pro analýzu polárních, tepelně nestálých a málo těkavých analytů.

Informace z vybraných studií zaměřených na analýzu drog pomocí LC-MS a vedených mezi lety 2002 až 2011 porovnává několik přehledových článků^{18,75,77-79}. Uváděné způsoby zpracování vzorku se shodují s úpravami před GC-MS. Výjimku tvoří derivatizace a štěpení konjugátů, které v tomto případě nejsou nutné, přesto však mohou být užitečné. Derivatizace může pomoci objasnit nebo prokázat strukturu nebo zvýšit účinnost ionizace, štěpením konjugátů se může zlepšit stanovení metabolitů první fáze. Vzorky jsou v daných studiích nejčastěji ionizovány elektrosprejem (ESI) v kladném módu, v menší míře se objevuje využití chemické ionizace za atmosférického tlaku. K vyhodnocení poměru m/z je s převahou používán trojitý kvadrupólový analyzátor (QQQ). Následují iontová past (IT), jednoduchý kvadrupólový analyzátor (Q), hybridní spojení trojitého kvadrupólu a lineární iontové pasti (QQQ/LIT) a průletový analyzátor (TOF). LC-MS ve srovnání s GC-MS umožňuje nižší mez detekce a analýzu hydrofilních, termolabilních a méně těkavých sloučenin. Nevýhodou je neporovnatelnost spekter získaných na různých typech přístrojů a matricové efekty, zvláště výrazné u vzorků slin, zředěné moči a komplexních matric, jako je mozková tkáň. Zkoumání matricových efektů se proto stalo základní součástí validace metod LC-MS.

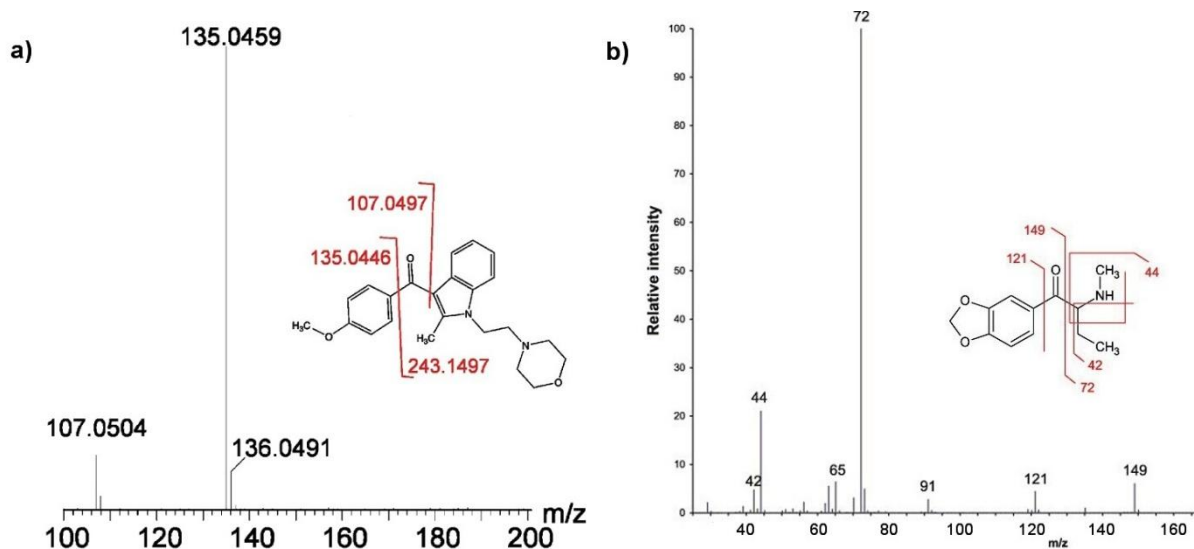
Kombinace kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií je méně zastoupena jak ve forenzních laboratořích, tak v počtu odborných publikací⁷⁶. Vlastní elektroforéze opět může předcházet LLE nebo SPE. Jako iontový zdroj převládá elektrosprej, ačkoliv vysoké citlivosti také dosáhla ionizace elektronem za atmosférického tlaku. Z analyzátorů jsou uváděny IT, Q a TOF. Metoda CE-MS dosahuje velmi nízkých mezí detekce a předpokládá se proto, že poroste její význam například pro analýzu drog ve vlasech.

2.3.2 Hmotnostní spektrometrie v analýze nových psychoaktivních látek

Nové drogy znamenají pro vědu nové výzvy a podněcují vývoj nových analytických postupů. Klasickým screeningem na drogy nejsou detekovány, ani po odhalení o nich není mnoho známo, zato jejich počet je vysoký a analýzu ztěžují některé okolnosti. Nové látky zachytí jedině testy rozšířené nebo necílené, protože klasické testy jsou zaměřeny na určité sloučeniny. Toxikologickým laboratořím chybí spektra¹⁶, standardy jsou komerčně dostupné obvykle až po 6 až 24 měsících²⁶ a dříve případně nezbyvá, než je připravit ze zboží z „head shopů“⁸⁰. Tento nedostatek ale není nepřekonatelný a jednotlivé nové drogy nepředstavují z hlediska analýzy větší obtíže než drogy klasické. Oříškem je screening při jejich množství a chemické rozmanitosti a rychlá obměna, kdy může být dostupnost produktu na trhu kratší než příprava komerčního standardu⁸¹. Ztížením identifikace některých fenylethylaminů a fentanylů je, že se prodávají ve formě cyklodextrinových komplexů¹⁷. Samotný důkaz přítomnosti v biologickém vzorku navíc nemusí dokazovat rekreační užití - například PMMA a PMA jsou metabolity léku proti křečím a mCPP je hlavním metabolitem antidepressiva⁸². Pro nové psychoaktivní látky, které byly úspěšně identifikovány, se objevují studie zaměřené na jednotlivé sloučeniny, na skupiny sloučenin i studie se širokým záběrem.

Výzkumy individuálních drog odrážejí nabídku a zabývají se hlavně kanabinoidy, katinony a fenylethylaminy a často i jejich metabolity^{18,81}. Zejména kanabinoidy jsou v těle rychle přeměněny, takže původní sloučenina není vždy využitelná k analýze a identifikace metabolitů už byla publikována nejméně pro deset z nich⁸³. Ve shrnutí odborných prací lze vysledovat, že kanabinoidy jsou separovány nejčastěji kapalinovou chromatografií a katinony a fenylethylaminy chromatografií plynovou. Kapalinové chromatografii předchází LLE, SPE nebo jen zředění, následuje ji ionizace elektrosprejem v kladném módu a detekce pomocí QQQ nebo QQQ/LIT. Nejnížší uvedená mez stanovení dosáhla $0,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Plynová chromatografie vyžaduje LLE, SPE nebo derivatizaci, vzorek je ionizován elektronem nebo pozitivní chemickou ionizací a detekován v jednoduchém kvadrupólovém analyzátoru. Nejnížší mez stanovení je zde rovna $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Příklady spektra a štěpení syntetického kanabinoиду a katinonu ukazuje Obrázek 13.

Představu o možnostech analýzy dvaceti a více sloučenin najednou vykreslují vybrané publikace z odborných časopisů, zahrnující určitou skupinu nebo průřez skupinami nových psychoaktivních látek. Všechny jsou založeny na HPLC nebo ultraúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC), ionizaci ESI v kladném módu, detekci QQQ a u všech je



Obrázek 13: Hmotnostní spektra a fragmentace nových psychoaktivních látek

a) Fragmenty syntetického kanabinoidu WIN 48,098 získané na QTOFu při kolizní energii 20 až 40 eV (převzato z cit.⁸⁴). b) Fragmenty syntetického katinonu ethylonu získané po ionizaci elektronem při 70 eV (převzato z cit.⁸⁵).

samozřejmostí validace. Celkem 27 kanabinoidů bylo kvantifikováno v krvi⁸⁶ s mezí stanovení $0,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a bez určení meze detekce. Vzhledem k typu vzorku byla nejprve provedena extrakce, centrifugace, odpaření do sucha a rozpuštění v methanolu, separace na reverzní fázi trvala 28 min. Pro 20 katinonů v krvi⁸⁷ určili stejní autoři mez stanovení na $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rychlejší byla kvantifikace celkem 26 katinonů, fenylethylaminů, piperazinů a tryptaminů v séru⁸⁸ po 10 min separace s výsledky pro mez stanovení mezi 1 až $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a s mezí detekce blízkou $0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pokud jsou matricí sliny, jako tomu bylo při identifikaci 24 kanabinoidů, fenylethylaminů a katinonů⁸⁹, není třeba vzorek zpracovávat jinak než ředěním. Mez detekce je ale vyšší, zde konkrétně mezi 1 až $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Časově velmi nenáročná je metoda kvantifikace 26 různých nových drog v moči⁹⁰, kdy jsou omezeny úpravy vzorku pouze na zředění a separace na koloně na 4 min. Tento postup byl navržen pro široký rozsah polarit analytů, aby bylo v budoucnosti možné bez velkých změn podmínek začlenit další nové drogy. Mez stanovení i mez detekce se shodně pohybují mezi $0,5$ a $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ačkoliv všechny tyto práce používají jako detektor QQQ, řešením pro screening je také MS s vysokou rozlišovací schopností.

Současné hmotnostní spektrometry s vysokou rozlišovací schopností (HRMS) a vysokou přesností určení m/z dovolují rozsáhlý cílený i necílený screening a sloučení

identifikace a stanovení do jednoho kroku. Celkem 277 nových nebo nejrozšířenějších drog, jako jsou tetrahydrokanabinol, kokain a amfetamin, zahrnuje validovaná kvalitativní metoda pro vzorky moči⁹¹. Nejprve se provádí v několika krocích úprava, a to enzymatická hydrolyza, extrakce, odpaření rozpouštědla a převedení do roztoku, pak probíhá 22minutová separace UHPLC s obrácenými fázemi. Ionizace elektrosprejem a hybridní spektrometr, který spojuje kvadrupólový a průletový analyzátor (QTOF), vedou k výsledkům s rozlišovací schopností 23 500 FWHM a přesností 0,3 mDa. Nejnižší koncentrace, při níž jsou splněny stanovené předpoklady pro spolehlivou identifikaci (*cut-off*), se pro katinony pohybuje v rozmezí 0,7 až 15 ng·ml⁻¹. Pro kanabinoidy se různí od 0,2 do 60 ng·ml⁻¹ a hodnoty nižší než 1 ng·ml⁻¹ dosahuje pro polovinu z nich. Ani rozšíření počtu analytů na 277 však nezaručuje odhalení nových psychoaktivních látek, pokud na ně metoda není předem zaměřena.

Necílený screening pro nové drogy odvozené ze známé struktury je v takzvaném *mass defect filtering* inspirovaný analýzou metabolitů a jeho úspěšnost zvyšuje hledání prekurzorového iontu⁸⁴. Derivatizace podstatně mění monoizotopickou hmotnost oproti původní sloučenině, ale hodnota za desetinnou čárkou (*mass defect*) zůstává podobná. Například celočíselná molekulová hmotnost mnoha kanabinoidů analogických k JWH-018 se pohybuje mezi 321 až 435 Da, ale neceločíselná část je pro většinu z nich v rozpětí od 0,13 do 0,23 Da. *Mass defect filtering* pak ze všech naměřených dat ponechává k vyhodnocení jen ta, která v neceločíselné části spadají do určitého intervalu. Zjednodušení souboru dat znamená také snížení šumu a interferencí. Hledané sloučeniny, které se vymykají stanovenému intervalu, ale s výchozí sloučeninou jsou tímto způsobem podobné alespoň ve fragmentech, nejsou opomenuty díky hledání prekurzorového iontu. Spektra pro každé *m/z* byla získána na QTOFu při nízké a vysoké kolizní energii téměř najednou a k fragmentům byly prekurzorové ionty přiřazeny zpětně podle retenčního času. Popsaný screening vede k identifikaci analytů, ale k potvrzení je stále nutný standard. Autoři v rostlinném zboží identifikovali syntetické kanabinoidy a u vybraných provedli s pomocí standardů i stanovení.

Sloučení identifikace a stanovení do jednoho kroku je jedna z výhod, které může poskytnout HRMS s určitými parametry, a to bez snížení nároků na výsledky⁹². Stanovení vyžaduje přístroj s rozlišovací schopností větší než 30 000, lineárním dynamickým rozsahem tří řádů, rychlostí získávání dat nejméně 5 Hz a tandemovým uspořádáním. Porovnání pro 25 potenciálně biologicky účinných sloučenin ukázalo, že mez detekce a lineární

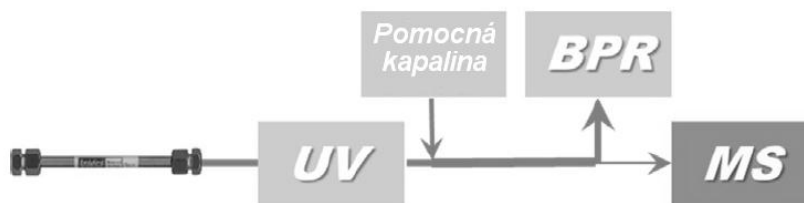
dynamický rozsah byly u QTOF stejné nebo lepší než u QQQ. Pro analýzu nových psychoaktivních látek je HRMS ideálním řešením vzhledem k proměření spekter v plném rozsahu m/z a automatické fragmentaci intenzivních iontů, tedy všestrannosti a zároveň specifitě⁸¹. Forezní a toxikologické laboratoře si však kvůli vysoké ceně takovou instrumentaci často nemohou dovolit, na rozdíl od rozšířenějšího QQQ.⁸⁸

2.4 Spojení superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Rychlost superkritické fluidní chromatografie doplňuje hmotnostní spektrometrie o citlivost a selektivitu. Jak se zdá, odhad autorů učebnice *Encyclopedia of Separation Science* z roku 2000, že pro rozvoj SFC-MS chybí dostatek podnětů⁵³, neplatí především ve farmacii. Přednosti obou technik jsou žádané například při výrobě léčiv, kdy je jímání požadované sloučeniny ze separované reakční směsi automaticky řízeno podle intenzity signálu vybraného iontu⁶⁰. Tato aplikace se rychle rozmáhá a zdokonaluje. Různými vylepšeními až k současnému stavu prošla ale také instrumentace SFC-MS obecně a její uplatnění není omezeno jen na farmacii.

Jedno z možných provedení zařazuje za kolonu nejprve UV detektor, za něj pumpu s pomocnou kapalinou a nakonec rozvětvení k regulátoru zpětného tlaku a MS (Obr. 14). Spojení SFC a MS je ve srovnání s HPLC-MS díky povaze CO₂ snazší, co se týká odpaření mobilní fáze, a CO₂ navíc napomáhá zmlžování. Na druhou stranu může mobilní fáze v místě před vstupem do MS, kde není pod přímým vlivem regulátoru zpětného tlaku, ztrácet hustotu, eluční sílu a účinnost separace. Tento jev zmírňuje pomocná kapalina (*make-up fluid*), která je také dalším zdrojem protonů v iontovém zdroji a zvyšuje podíl nabitých částic vzorku⁹³.

Úspěšné spojení s iontovými zdroji pracujícími za atmosférického tlaku, uskutečněné v 90. letech, má podíl na rozšíření SFC-MS (cit.³⁵). APCI zde prokázala spolehlivost pro velký rozsah sloučenin⁴⁸, ESI je robustní i při podmínkách, které pro danou analýzu nejsou optimální⁹³. Častým analyzátozem je jednoduchý kvadrupól, pro analýzu látek ve směsích projevuje dobrou citlivost a linearitu QQQ. Pro určení struktury nové látky se používá Q-TOF, i při velmi rychlých separacích poskytuje vysoké rozlišení TOF a uskutečněno bylo i spojení s orbitrapem^{60,94,95}. Hmotnostně spektrometrická detekce má vliv na výběr aditiva, neboť například alkylaminy mohou potlačovat ionizaci, kontaminují



Obrázek 14: Schéma uspořádání SFC-MS za kolonou (BPR – regulátor zpětného tlaku) (převzato z cit.⁹³)

iontový zdroj a ve spektru tvoří adukty. Vhodnou volbou jsou aditiva jako $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, HCOONH_4 a $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

SFC-MS obstála v analýzách širokého rozpětí vzorků a zasahuje do různých oblastí. Dva nejrozsáhlejší projekty zahrnovaly 2153 sloučenin z oblasti farmacie⁴⁸ a neurčený počet struktur, které bylo potřeba analyzovat ve farmaceutických výzkumných laboratořích za 18 měsíců⁵⁸. Jiné publikované práce se týkají uhlovodíků, polymerů, organokovů⁹⁵, pesticidů⁹⁶, ale i lipidů⁹⁴, karotenoidů⁹⁷, polárních peptidů⁴⁵ a hydrofobních proteinů⁹⁸. Desetiminutová analýza 15 metabolitů estrogenů⁹⁹ vyniká zvláště při srovnání se separací HPLC-MS, která je delší o 60 min. Pro analýzu drog je k dispozici jen několik málo příkladů.

Využití SFC-MS v analýze drog dokládají odborné práce o kokainu, heroinu, kanabinoidech a morfinu. První z nich se objevila už několik let po zavedení komerčních přístrojů pro SFC a informovala o eluci kokainu z náplňové kolony za méně než jednu minutu. Mobilní fáze obsahovala 10 % CH_3OH a kokain byl detekován s využitím chemické ionizace a kvadrupólového analyzátoru¹⁰⁰. Později byly podrobeny analýze vzorky heroinu na kapilární koloně za programované hustoty CO_2 a reverzního teplotního programu⁶⁶. Stanovení kanabinolu, Δ^9 -tetrahydrokanabinolu, Δ^8 -tetrahydrokanabinolu a kanabidiolu ve vzorcích konopí z praxe trvalo méně než 8 min (cit.¹⁰¹). Tyto sloučeniny byly separovány za gradientu methanolu na náplňové koloně, ionizovány chemicky za atmosférického tlaku a detekovány s pomocí kvadrupólového analyzátoru. Analýza proběhla výrazně rychleji než pomocí GC-MS a HPLC-UV, prováděnými pro srovnání, na rozdíl od GC-MS nevyžadovala derivatizaci a překonala rozlišení HPLC-UV. Autoři této práce zhodnotili SFC-MS jako citlivou a definitivní metodu a atraktivní alternativu ke GC-MS. V nedávné době potvrdila SFC-MS přítomnost morfinu jako degradačního produktu v léku proti kašli. Po několika minutách izokratické eluce s využitím 30 % ethanolu se 0,4 % diethylaminu v mobilní fázi následovala ionizace elektrosprejem. Rozhodující výhodou oproti GC vedoucí k volbě SFC bylo zamezení tepelnému rozkladu analytu¹⁰².

Novou psychoaktivní látkou, která byla jako první analyzována pomocí SFC-MS, je dextromethorfan. Tato látka je účinnou složkou některých léků proti kašli a ve vysokých dávkách má psychotropní účinky. Dextromethorfan byl vybrán jako modelová sloučenina pro určení hladiny léčiva v krevní plazmě, s cílem ověřit, nakolik je možné zkrátit takové stanovení jednoho vzorku oproti minutové kvantifikaci HPLC-MS (cit.¹⁰³). Instrumentální vybavení zahrnovalo náplňovou kolonu, ze které vzorek eluovala mobilní fáze

s 65 % CH₃OH, elektrosprej a trojitý kvadrupól. Výsledkem poměrně náročné úpravy plazmy byly zakoncentrované roztoky dextromethorfanu v 96 jamkách mikrotitrační destičky. Následné stanovení vyžadovalo pro jeden vzorek v průměru 6 s (na celou destičku připadlo 10 min) a splnilo podmínky dostatečné citlivosti, přesnosti a správnosti.

Využitím SFC-MS k analýze látek zakázaných ve sportovním odvětví se zabývá práce¹⁰⁴, která zahrnuje i několik nových psychoaktivních látek (BZP, katinon, mefedron, methkatinon, methedron, MTA, PMA). Na příkladu 110 sloučenin srovnává UHPSFC-MS a UHPLC-MS. Autoři došli k závěru, že obě metody jsou co do kvality separace a citlivosti detekce na srovnatelné úrovni. Zato rozdíl v retenci analytů a selektivitě byl natolik značný, že by UHPSFC-MS mohla být v antidopingové kontrole k UHPLC-MS vhodnou alternativou, která se pro dané vzorky navíc ukázala méně náchylná k matricovým efektům. Stejně jako u ostatních publikací, které se zabývají větším množstvím analytů, se i tito autoři soustředili na citlivost a selektivitu analýzy a na matricové efekty, a vlastní separace nebyla hlavním bodem zájmu. Na otázku, jaké možnosti nabízí SFC v separaci nových psychoaktivních látek, odpovídá praktická část předkládané diplomové práce.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje

Separace byly provedeny na superkritickém fluidním chromatografu ACQUITY UPC² System (Waters, Milford, USA), jehož součástí jsou Binary Solvent Manager, Sample Manager FL, Column Manager, Convergence Manager a PDA Detector. Chromatografické kolony ACQUITY UPC² (Waters, Milford, USA) s částicemi náplně menšími než 2 μm a o rozměrech 3,0 × 100 mm byly naplněny stacionárními fázemi Bridged Ethylene Hybrid (1,7 μm), Bridged Ethylene Hybrid 2-Ethylpyridine (1,7 μm), Charged Surface Hybrid Fluoro-Phenyl (1,7 μm) a High Strength Silica C18SB (1,8 μm). Čerpadlem pomocné kapaliny byla pumpa 515 HPLC Pump řízená pomocí Waters Pumps Control Module II (vše Waters, Milford, USA). Hmotnostní spektra byla získána po ionizaci elektrosprejem na trojitém kvadrupólovém analyzátoru Xevo TQD (Waters, Manchester, UK). Ovládání přístroje a vyhodnocení výsledků zajišťoval software MassLynx 4.1, SCN 882 (Waters, Milford, USA).

3.2 Chemikálie

Oxid uhličitý byl zakoupen u společnosti SIAD Czech spol. s r. o. (Braňany u Mostu, Česká republika). Dodavatelem acetonitrilu (99,9%), methanolu (gradient grade for HPLC), kyseliny mravenčí (>95%, reagent grade), kyseliny octové (>99,7%) a hydroxidu amonného (>28%) byla společnost Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Standardy analyzovaných drog ve formě hydrochloridů, 1,3-benzodioxolylbutanamin, 4-brom-2,5-dimethoxyfenylethylamin, bufedron, butylon, 2,5-dimethoxyfenylethylamin, ethylon, felfedron, katinon, methedron, 3,4-methylendioxyamfetamin, 4-methylethkatinon, methylon a nafyron, pocházely od firmy LIPOMED AG (Arlesheim, Švýcarsko). Standardy dalších dvou analyzovaných drog, hydrochloridy 3-fluormethkatinonu a 3-methylmethkatinonu, pocházely od Cayman Pharma (Neratovice, Česká republika). Voda byla deionizována na přístroji Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, USA).

3.3 Pracovní postup

Příprava roztoků

Zásobní roztoky jednotlivých drog obsahovaly 10 mg sloučeniny v 7 ml rozpouštědla. Počáteční rozpuštění drogy v 5 ml acetonitrilu nebylo vždy úplné, a proto bylo následně zajištěno doplněním roztoků o 2 ml methanolu a pětiminutovým ponecháním v ultrazvukové lázni. Pracovní roztoky směsi vždy čtyř vybraných drog (bufedronu, methedronu, 3 fluormethkatinonu a ethylonu), kdy každá z nich měla koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, byly připraveny ředěním zásobních roztoků methanolem nebo jinou pomocnou kapalinou. Obdobně byly připraveny pracovní roztoky směsí vždy tří až čtyř drog, každé o koncentraci $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Drogy byly rozřazeny tak, aby se izobarické látky nacházely v různých roztocích. Směs všech 15 drog, o koncentraci $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro každou z nich, obsahovala zásobní roztok každé drogy a methanol. Jako slepý pokus pro tuto směs sloužil roztok acetonitrilu v methanolu, $37,5 \mu\text{l}$ v 10 ml.

Mobilní fáze byla upravena směsí modifikátoru a aditiva, připravenou v několika obměnách. Tento přírůstek k mobilní fázi představovaly methanolové roztoky 20mM NH_4OH , 1% HCOOH , 20mM HCOONH_4 , 20mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a 2% H_2O nebo jen čistý methanol. Hotové roztoky mobilní fáze byly odvzdušněny na ultrazvukové lázni.

Nastavení hmotnostního spektrometru

Podmínky ionizace elektrosprejem byly nastaveny pomocí automatické optimalizace – napětí sprejovací kapiláry na +2,8 kV, teplota zdroje na $150 \text{ }^\circ\text{C}$ a desolvatační teplota na $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Průtok desolvatačního plynu byl nastaven na $500 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$ a průtok plynu v konusu na $30 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$. Na trojitém kvadrupólovém analyzátoru byl za použití pracovních roztoků pro každou drogu nalezen prekurzorový ion (protonovaná molekula) a čtyři nejintenzivnější produktové ionty, které nezahrnovaly fragmenty vzniklé odštěpením H_2O nebo CO_2 . Hodnota napětí na konusu elektrospreje a kolizní energie byly každému z iontů přiřazeny pomocí automatické optimalizace. Napětí se pohybovalo mezi 14 až 40 V, energie odpovídala nastavení mezi 14 až 28 V (Tab. VII).

Výběr pomocné kapaliny

Vhodná pomocná kapalina byla vybírána z následujících rozpouštědel: methanol, acetonitril, voda a směsi methanol+voda (50:50), acetonitril+voda (50:50). Všechny tyto roztoky, kromě směsi acetonitrilu a vody, byly připraveny navíc s přísadkou 1 % kyseliny mravenčí a s přísadkou 0,35 % hydroxidu amonného. Směs methanolu s vodou byla přichystána také v poměru 25:75 a 75:25. Přímým měřením na hmotnostním spektrometru byla zjištěna intenzita odezvy protonovaných molekul čtyř vybraných drog (bufedron, methedron, 3-fluormethkatinon a ethylon) v každém z vyjmenovaných pracovních roztoků. Pro tři nejlepší pomocné kapaliny byla zjištěna intenzita iontů všech drog a s cílem vybrat nejvhodnější kapalinu byly vypočítány poměry intenzity iontu a celkového iontového proudu. Intenzita byla posouzena kromě přímého zavádění vzorku také z chromatogramu. Průtok pomocné kapaliny odpovídal $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Nastavení chromatografu

Nástřik se rovnal $2 \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a zpětný tlak byl udržován na 2000 psi (13,8 MPa). Separace probíhaly při teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ nebo $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a při různých gradientech složení mobilní fáze. Separace trvala 5 min a ekvilibrace kolony další 2 min. Počáteční obsah modifikátoru byl testován v rozsahu 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 % a 12 %, nejvyšší 16 %, 22 % a 30 %.

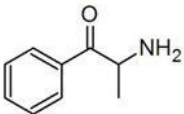
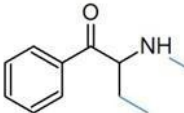
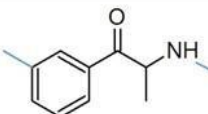
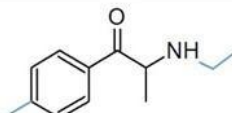
Kritéria pro vyhodnocení

Kvalita separace, vztažená k použité stacionární fázi, aditivu k mobilní fázi a teplotě, byla posuzována podle následujících kritérií. Největší váhu měly počet separovaných izobarických párů a celkový počet separovaných analytů. Za úspěšně oddělené píky zde byly považovány takové, jejichž rozlišení bylo větší než 1,0. Další podmínku, gaussovský tvar křivky, pík sledovaného iontu splňoval, pokud hodnota jeho symetrie v 10 % výšky ležela mezi 0,8 a 1,4 (cit. ⁴⁷). Doplnkovým kritériem byla doba potřebná pro separaci.

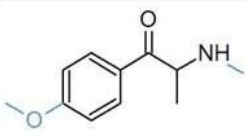
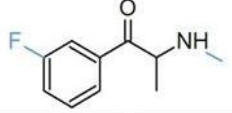
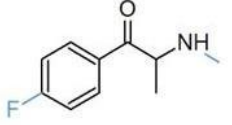
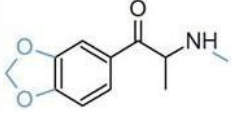
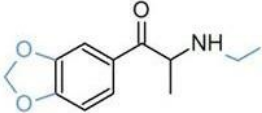
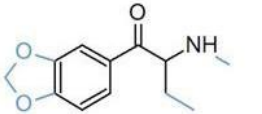
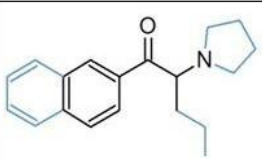
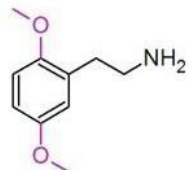
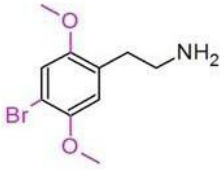
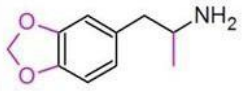
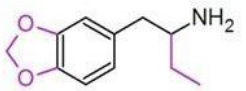
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem analýzy bylo 15 nových syntetických drog, patřících ke katinonům a fenylethylaminům (Tab. VI). Vlastní měření byla provedena po přizpůsobení experimentálních podmínek daným analytům (nastavení hmotnostního spektrometru, typ pomocné kapaliny, gradient složení mobilní fáze). Zkoumání kvality separace zohledňovalo použitou stacionární fázi, přídavné látky v mobilní fázi a teplotu. Směs všech 15 drog byla analyzována na čtyřech stacionárních fázích – Bridged Ethylene Hybrid (BEH), Bridged Ethylene Hybrid 2-Ethylpyridine (2-EP), Charged Surface Hybrid Fluoro-Phenyl (FPh) a High Strength Silica C18SB (C18). Měření na každé z nich proběhlo se šesti různými úpravami mobilní fáze. V pěti případech se jednalo o roztok methanolu a polárnějšího aditiva – 20mM NH₄OH, 1% HCOOH, 20mM HCOONH₄, 20mM CH₃COONH₄, 2% H₂O, posledním případem byl čistý methanol. Zvolená teplota vždy přesahovala kritický bod CO₂ a jednotlivé experimenty rozšířila o trojí informace (40 °C, 50 °C, 60°C). Ve výsledcích separace některé stacionární fáze a aditiva vynikly a při volbě podmínek analýzy nových syntetických drog předčí ty zbývající.

Tabulka VI: Analyzované drogy

Droga	Struktura	Zažité názvy, další názvy, zkratky* ^{110,111} Systematický chemický název ¹¹⁰ Anglický název podle IUPAC	V nařízení vlády 463/2013 Sb.
Katinony			
Katinon		β -keto-amfetamin 2-amino-1-fenylpropan-1-on 2-amino-1-phenylpropan-1-one	ano
Bufedron		α -methylamino-butyrofenon 2-(methylamino)-1-fenylbutan-1-on 2-(methylamino)-1-phenylbutan-1-one	ne
3-MMC		3-methylmethkatinon 2-(methylamino)-1-(3-methylfenyl)propan-1-on 2-(methylamino)-1-(3-methylphenyl)propan-1-one	ne
4-MEC		4-methylethkatinon 2-(ethylamino)-1-(4-methylfenyl)propan-1-on 2-(ethylamino)-1-(4-methylphenyl)propan-1-one	ano

(pokračování)

Methedron		4-methoxymethkatinon, bk-PMMA 1-(4-methoxyfenyl)-2-(methylamino)propan-1-on 1-(4-methoxyphenyl)-2-(methylamino)propan-1-one	ano
3-FMC		3-fluormethkatinon 1-(3-fluorfenyl)-2-(methylamino)propan-1-on 1-(3-fluorophenyl)-2-(methylamino)propan-1-one	ne
Flefedron		4-fluormethkatinon, 4-FMC 1-(4-fluorfenyl)-2-(methylamino)propan-1-on 1-(4-fluorophenyl)-2-(methylamino)propan-1-one	ano
Methylon		3,4-methylenedioxyethkatinon, bk-MDMA 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)propan-1-on 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)propan-1-one	ano
Ethylon		3,4-methylenedioxyethkatinon, bk-MDEA 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(ethylamino)propan-1-on 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(ethylamino)propan-1-one	ne
Butylon		bk-MBDB 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-on 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-one	ano
Nafyron		naftylpyrovaleron 1-naftalen-2-yl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-on 1-naphthalen-2-yl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-one	ano
Fenylethylaminy			
2C-H		2,5-dimethoxyfenylethylamin 2-(2,5-dimethoxyfenyl)ethanamin 2-(2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine	ne
2C-B		4-brom-2,5-dimethoxyfenylethylamin 2-(4-brom-2,5-dimethoxyfenyl)ethanamin 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)ethanamine	ano
MDA		3,4-methylenedioxyamfetamin 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)propan-2-amin 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)propan-2-amine	ano
BDB		1,3-benzodioxolylbutanamin 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)butan-2-amin 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)butan-2-amine	ne

*Uvedené české názvy jsou zařité mezi laickou veřejností, často jsou převzaty z angličtiny a neřídí se proto striktně českým chemickým názvoslovím.

4.1 Hmotnostněspektrometrická detekce drog

Pro každou drogu byl nalezen ion $[M+H]^+$ a čtyři nejintenzivnější produktové ionty. Tento počet byl snížen na jeden vyřazením těch přechodů, které byly málo intenzivní nebo náležely zároveň jiné sloučenině. Ionty využitě k analýze shrnuje Tab. VII.

Tabulka VII: Přechody SRM (*single reaction monitoring*) použité k analýze drog

Sloučenina	M	Q1	Q3	Napětí na konusu (V)	Nastavení kolizní energie (V)
Katinon	149,08	149,92	116,97	30	18
Bufedron	177,12	177,96	130,96	28	24
3-MMC	177,12	177,96	144,94	30	20
MDA	179,09	180,00	104,96	20	22
3-FMC	181,09	181,93	122,96	32	20
Flefedron	181,09	181,93	148,98	32	20
2C-H	181,11	181,95	149,97	14	18
4-MEC	191,13	191,97	144,20	30	28
BDB	193,11	194,02	134,93	24	14
Methedron	193,11	194,02	161,01	28	20
Methylon	207,09	207,93	159,97	18	16
Ethylon	221,11	222,01	174,12	32	18
Butylon	221,11	222,01	174,05	32	18
2C-B	259,02	259,86	227,85	20	22
Nafyron	281,18	282,08	140,96	40	22

M – monoizotopická hmotnost, *Q1* – *m/z* iontu $[M+H]^+$, *Q3* – *m/z* produktového iontu

V některých případech se jedinečný a zároveň dostatečně intenzivní přechod nepodařilo nalézt. Hmotnostní spektrometrie nerozlišila čtyři dvojice drog – bufedron od 3-MMC, 3-FMC od flefedronu, methedron od BDB a ethylon od butylonu. Tyto páry jsou izobarické, sdílejí rodičovský a některé produktové ionty a jejich analýza je závislá na separaci. Nové syntetické drogy zařazované do jedné skupiny většinou vycházejí ze stejné struktury, a proto se mezi nimi nachází mnoho izomerů, které se v iontovém zdroji štěpí na podobné fragmenty. Například mezi 46 katinony, které se objevily mezi lety 2005 až 2013, se 31 sloučenin shoduje v molární hmotnosti alespoň s jednou další sloučeninou.¹⁰⁵ Podobnost struktur tedy způsobuje omezení počtu iontů použitelných pro odlišení.

Pravidla pro určení, zda jsou údaje získané chromatografií a hmotnostní spektrometrií dostatečné pro spolehlivou identifikaci neznámé sloučeniny, nejsou v současnosti oficiálně

zavedena.⁷⁵ Posouzení je možné pouze podle měřítek stanovených pro analýzu zbytkových léčiv v potravinách v Rozhodnutí Evropské komise č. 2002/657 (cit.³). Opodstatněnost těchto měřítek podpořila analýza pomocí LC-MS/MS, kdy jejich dodržení zamezilo falešně pozitivním výsledkům pro LSD a další látky a vedlo ke správným závěrům.¹⁰⁷ Rozhodnutí udává, že je třeba vycházet nejméně ze tří iontů v jednoduché nebo ze dvou iontů v tandemové hmotnostní spektrometrii. Omezený počet iontů použitelných pro identifikaci, daný podobností struktur, tedy ztěžuje analýzu nových syntetických drog. Pro účely předkládané práce jeden přechod k analýze postačoval, neboť byly použity čisté roztoky standardů a práce se zaměřuje na chromatografickou separaci.

4.2 Pomocná kapalina

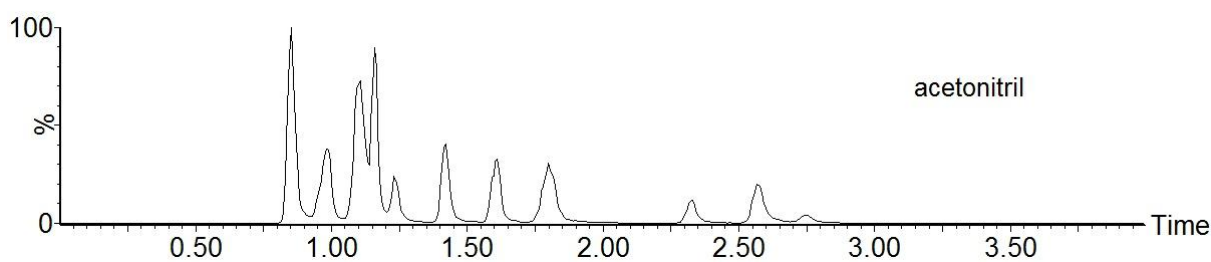
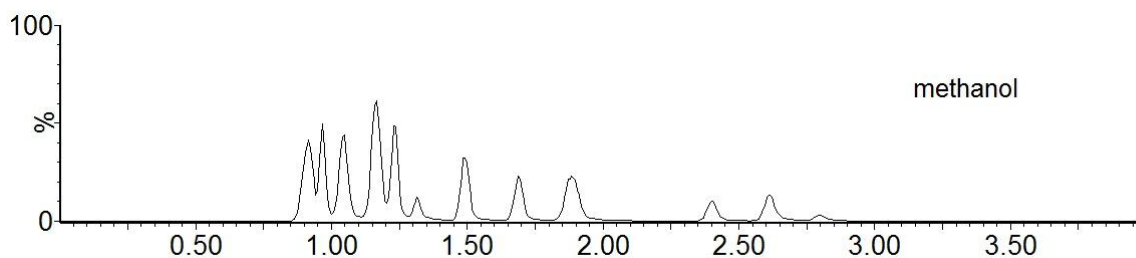
Při výběru pomocné kapaliny bylo zkoumáno několik roztoků různého složení a jejich obměny s přidávkem NH_4OH nebo HCOOH (viz experimentální část). Jako tři nevhodnější, co se týká intenzity sledovaných iontů čtyř vybraných drog, byly vyhodnoceny methanol, acetonitril a směs acetonitrilu a NH_4OH . S nimi byla provedena měření pro všechny drogy a byly pro ně vypočítány poměry intenzit iontů k celkovému iontovému proudu (Tab. VIII). Porovnání těchto poměrů neupřednostnilo žádný z roztoků a ani rozdíl v intenzitě odezvy v chromatogramu (Obr. 15) není významný. Pro jednoduchost byl za pomocnou kapalinu zvolen použitý modifikátor, tedy methanol.

4.3 Gradient složení mobilní fáze

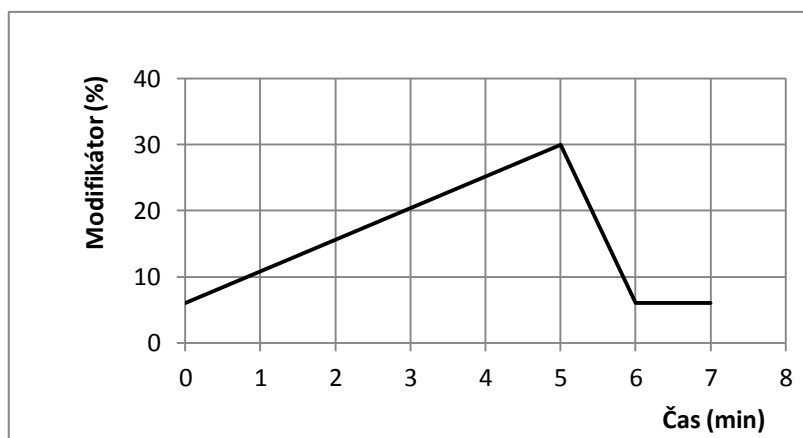
Výchozím bodem pro hledání vhodné změny složení eluentu byl jeden ze široce použitelných gradientů. Koncentrace modifikátoru začínala na 0 %, v 5 min vystoupala ke 30 % a během minuty se vrátila nazpět, kde setrvala další minutu. Od tohoto gradientu se odvíjely další (viz experimentální část), kdy nejrychlejší separaci umožnila počáteční koncentrace modifikátoru 6 % (Obr. 16). S tímto průběhem složení mobilní fáze byla separace téměř o minutu kratší než za gradientu původního (Obr. 17).

Tabulka VIII: Poměr intenzity iontu k celkovému iontovému proudu pro každou drogu za použití methanolu, acetonitrilu nebo směsi acetonitrilu a NH₄OH jako pomocné kapaliny

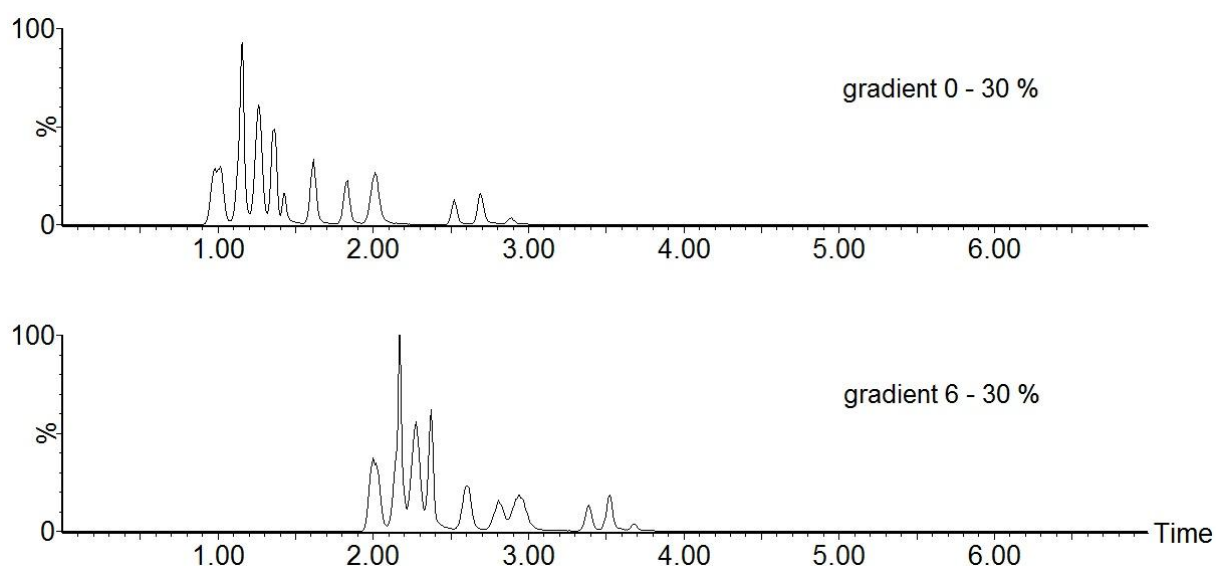
Sloučenina	Poměr v CH ₃ OH (%)	Poměr v CH ₃ CN (%)	Poměr v CH ₃ CN + 0,35% NH ₄ OH (%)
Katinon	16,6	16,3	14,2
Bufedron	19,9	18,8	24,3
3-MMC	21,8	25,5	17,9
MDA	6,9	13,5	7,4
3-FMC	14,5	16,0	18,7
Flefedron	18,8	20,3	15,6
2C-H	9,9	17,5	11,4
4-MEC	22,6	20,9	21,6
BDB	3,6	5,8	4,5
Methedron	13,3	10,0	14,3
Methylon	12,4	9,2	11,9
Ethylon	11,8	9,9	11,8
Butylon	12,1	13,3	9,6
2C-B	2,3	8,7	4,0
Nafyron	25,5	5,3	20,3



Obrázek 15: Srovnání intenzity odezvy po separaci na chromatografu při použití methanolu nebo acetonitrilu jako pomocné kapaliny (koncentrace vzorku 0,5 µg/ml, gradientová eluce, stacionární fáze BEH, aditivum 20mM NH₄OH, 50 °C; intenzita odpovídající 100 % na ose y: $1,20 \cdot 10^7$, výřezy z chromatogramů)



Obrázek 16: Gradient složení mobilní fáze vybraný jako nejvhodnější



Obrázek 17: Vliv gradientu na rychlost separace – chromatogram při výchozím gradientu (0 - 30 % modifikátoru během 5 min) a gradientu vybraném jako nejvhodnější (6 - 30 % modifikátoru během 5 min); stacionární fáze BEH, aditivum NH_4OH , 40 °C; intenzita odpovídající 100 % na ose y: $1,00 \cdot 10^7$

4.4 Aditivum

Typ použitého aditiva měl výrazný vliv na počet rozlišených píků v chromatogramu, na jejich tvar a šířku. Například na stacionární fázi BEH umožnily kvalitní separaci NH_4OH , HCOONH_4 a $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Zato použití HCOOH , H_2O a čistého methanolu vedlo k málo separovaným širokým píkům (Tab. IX, Obr. 18) a ne vždy k úspěšnému vymytí (Tab. X). Vliv aditiva na zbývajících třech stacionárních fázích byl obdobný.

Získané výsledky se přibližně shodují s dostupnými údaji z literatury. Těkavými solemi včetně HCOONH_4 a $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ se v této souvislosti jako první zabývá práce⁴⁶, která zdůrazňuje jejich kompatibilitu s hmotnostní spektrometrií. Přítomností těchto látek se buď výrazně zvýšila účinnost, nebo se přinejmenším nezměnila, a došlo k eluci jinak příliš zadržovaných analytů. Další publikace⁴⁷ se shoduje s předloženou diplomovou prací také v typu stacionární fáze (BEH) a volbě čtyř aditiv. Dvě z nich, NH_4OH a HCOONH_4 , vedly k vysokému počtu „gaussovských“ píků, zatímco HCOOH a absence aditiva zapříčinily asymetrii a obtížnost eluce většiny analytů.

Tabulka IX: Vliv aditiva na separaci (stacionární fáze BEH, 40 °C)

Aditivum	Počet rozlišených píků v chromatogramu	Počet rozlišených izobarických párů	Počet „gaussovských“ píků	Průměr FWHM (s)
NH_4OH	11	4	15	3
HCOOH	4	2	1	11
HCOONH_4	11	4	10	3
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	10	4	14	3
H_2O	4	0	0	15
Bez aditiva	4	3	0	11

FWHM – šířka píku v polovině jeho výšky

4.5 Stacionární fáze

Použitý typ stacionární fáze se podobně jako typ aditiva projevil v počtu eluovaných a separovaných analytů a v rychlosti analýzy (Obr. 19, Tab. X). Základní předpoklad úspěšné analýzy, vymytí všech analytů z kolony, byl vždy splněn u BEH. Na C18 a 2-EP se nevymyl jeden analyt bez přidavku aditiva (2C-B, resp. 2C-H). Na FPh se neeluoval jeden analyt s přidavkem H_2O (2C-H) a až 9 sloučenin bez aditiva (MDA, 2C-H, 4-MEC, BDB, methedron, methylon, ethylon, 2C-B, nafyron). Počet rozlišených píků v chromatogramu, další kritérium, byl vysoký a přibližně srovnatelný pro BEH a FPh, v některých případech pro FPh mírně nižší. Výrazně redukovaný počet rozlišených píků poskytla 2-EP. Co se týká dělení izobarických párů, výsledné pořadí stacionárních fází záviselo na vhodnosti aditiva. Za použití aditiv poskytujících přijatelnou celkovou separaci (viz Tab. X), a tedy z hlediska vyhodnocení nejdůležitějších, se jako nejlepší jeví jednoznačně BEH, následovaná FPh a C18, většinou horšími o jeden nerozlišený pár. Stacionární fáze 2-EP poskytovala dostatečné rozlišení jen pro polovinu izobarických párů. S aditivy neumožňujícími přijatelnou celkovou

separaci probíhalo dělení izobarických látek poměrně hladce jen na FPh. Z hlediska rychlosti analýzy bylo pořadí značně jiné než v dosavadním popisu a úspora času (ovšem na úkor kvality separace) byla například na 2-EP oproti BEH minutová.

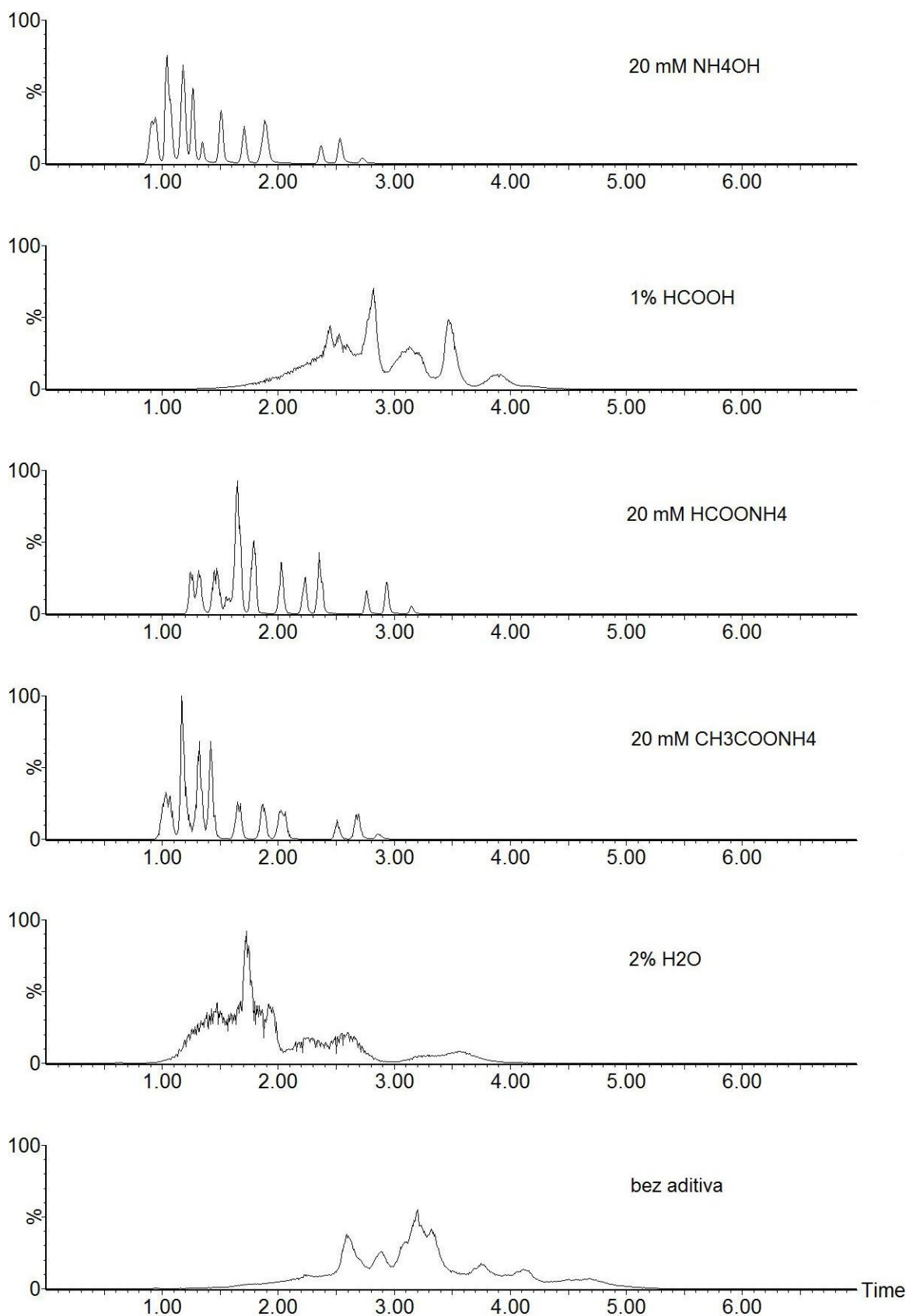
Celkově vzato v pomyslném žebříčku vyzkoušených stacionárních fází vede BEH a uzavírá jej 2-EP. S použitím BEH bylo většinou dosaženo jak nejvyššího počtu eluovaných analytů, tak rozlišených píků v chromatogramu a především rozlišených izobarických párů. Přesto, že při výběru stacionární fáze tento typ předčí ostatní, také výsledky získané na FPh a C18 jsou uspokojivé. Většinou se nepodařilo rozdělit na nich všechny izobarické páry, ale umožnily separaci 10 a 12 analytů z 15, což je počet srovnatelný s BEH. Porovnání výsledků 2-EP s ostatními fázemi se může zdát na první pohled překvapivé, neboť jako jediná byla původně vyvinuta speciálně pro SFC⁵⁶. Její vlastnosti však velmi závisí na tom, od jakého výrobce pochází, a jsou dané typem silikagelu, vazebnými procesy, hustotou navázání ligandu, kyselostí silanolových skupin a jejich případným pokrytím (*end-capping*). Podle publikace⁴⁷, která hodnotí pět různých 2-EP od několika výrobců, se stacionární fáze liší natolik, že první dovolila gaussovský tvar křivky pro 77 % analytů a poslední pro 22 %.

4.6 Teplota

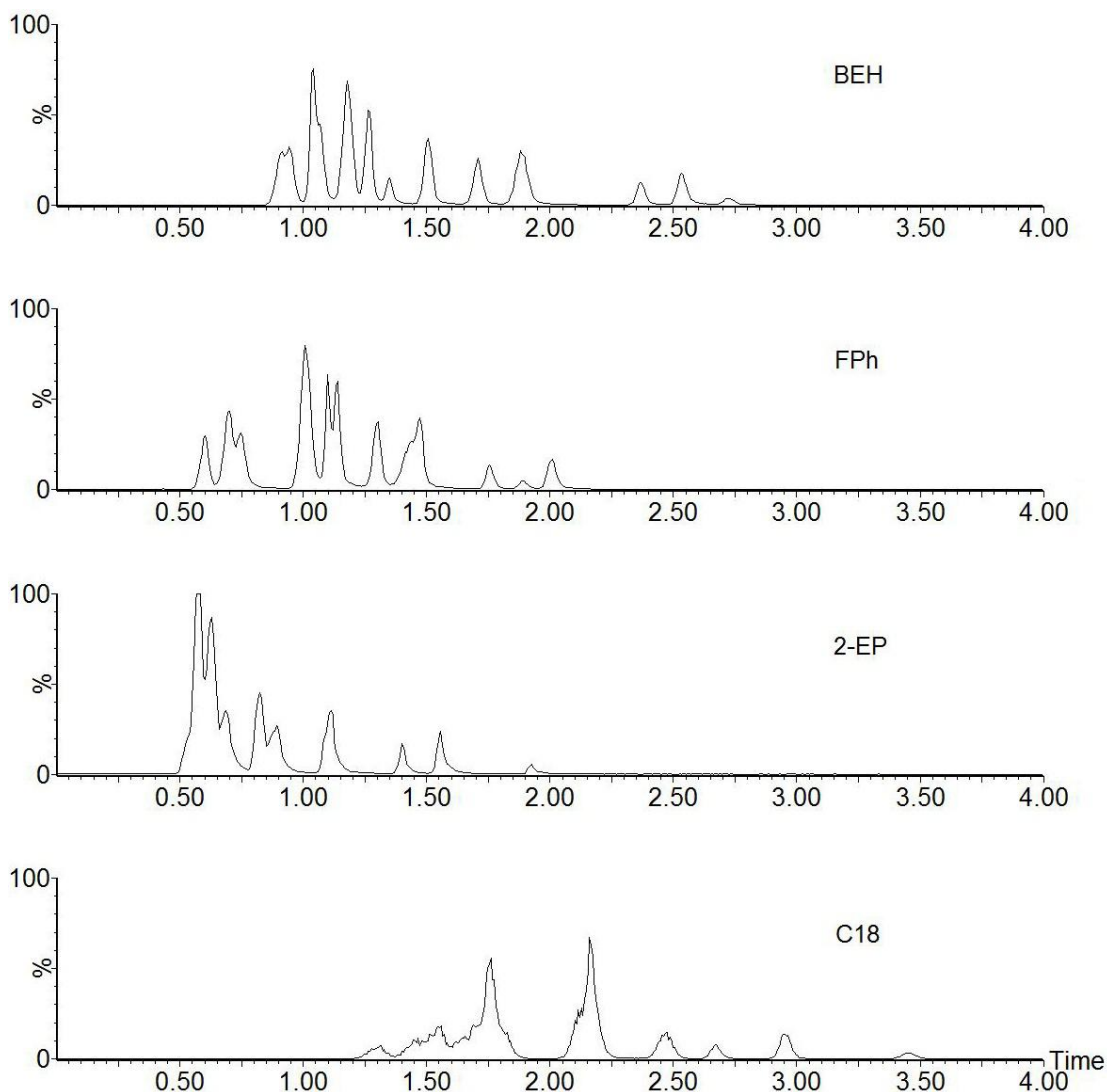
Teplota nejpříznivější pro separaci, dovolující nejlepší rozlišení, závisela na typu stacionární fáze. Pro BEH se ukázala jako nejvhodnější teplota 40 °C, pokud aditivem byl NH₄OH, HCOONH₄ nebo CH₃COONH₄, separace s HCOOH, H₂O a bez aditiva byly oproti jiným teplotám méně problematické při 60 °C. Na FPh poskytovala příznivější separaci převážně teplota 60 °C, což bylo zřetelné zvláště pro HCOOH (Obr. 20). Pro 2-EP a C18 byla většinou nejvhodnější teplota, 50 °C.

4.7 Nejvhodnější kombinace stacionární fáze, aditiva a teploty

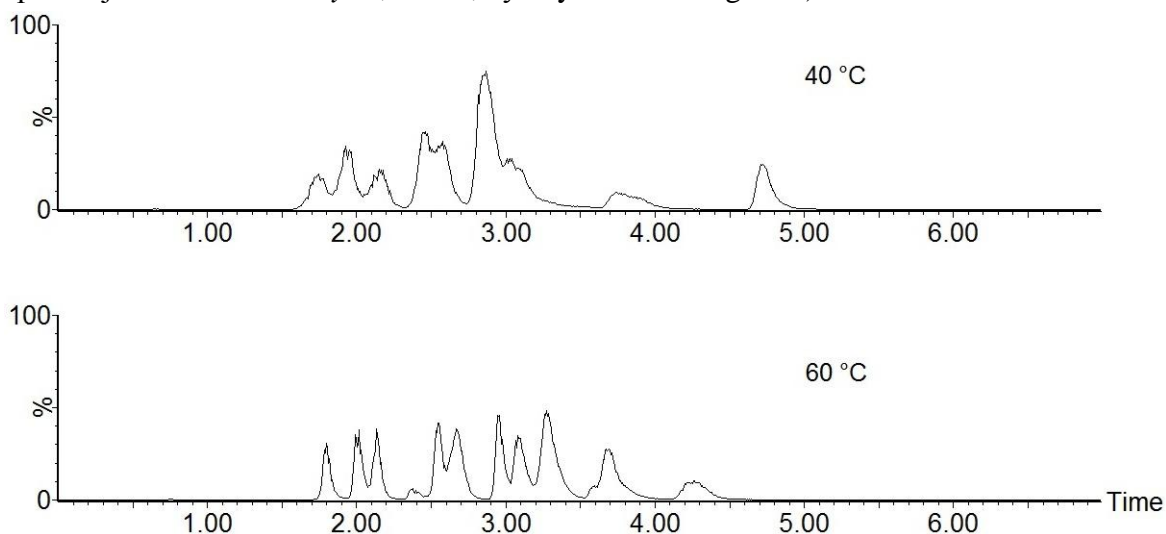
Každé ze stacionárních fází byla přiřazena nejlepší kombinace aditiva a teploty (Tab. XI). Tři kritéria byla základem pro výběr a podařilo se je splnit do různé míry. Největší váhu měl počet izobarických dvojic, které se podařilo separovat. Maximální dosažený počet rozlišených izobarických látek se různil – všechny čtyři páry (bufedron a 3-MMC, 3-FMC a flefedron, methedron a BDB, ethylon a butylon) byly odděleny na stacionární fázi BEH a FPh, jen tři na fázi C18 (neseparoval se poslední uvedený pár) a dva na 2-EP (neseparovaly



Obrázek 18: Vliv aditiva na separaci (stacionární fáze BEH, 40 °C; intenzita odpovídající 100 % na ose y: $1,00 \cdot 10^7$)



Obrázek 19: Vliv stacionární fáze na separaci (aditivum NH_4OH , $40\text{ }^\circ\text{C}$; intenzita odpovídající 100 % na ose y: $1,00 \cdot 10^7$, výřezy z chromatogramů)



Obrázek 20: Vliv teploty na separaci na stacionární fázi FPh při použití HCOOH jako aditiva (intenzita odpovídající 100 % na ose y: $1,00 \cdot 10^7$)

Aditivum	Teplota (°C)	Počet eluovaných analytů				Počet rozlišených píků v chromatogramu				Počet rozlišených izobarických párů				Počet "gaussovských" píků				Čas úplné eluce posledního píku (min)			
		BEH	FPh	2-EP	C18	BEH	FPh	2-EP	C18	BEH	FPh	2-EP	C18	BEH	FPh	2-EP	C18	BEH	FPh	2-EP	C18
NH ₄ OH	40	15	15	15	15	11	9	6	9	4	3	2	3	15	15	10	10	2,87	2,19	2,08	3,56
	50	15	15	15	15	10	9	6	10	3	3	2	3	12	13	9	10	2,86	2,24	2,11	3,53
	60	15	15	15	15	11	10	6	8	3	4	2	3	12	11	8	13	2,79	2,36	2,21	3,47
HCOONH ₄	40	15	15	15	15	11	10	9	8	4	3	2	3	10	10	11	8	3,25	2,55	2,38	3,47
	50	15	15	15	15	10	10	9	8	4	3	2	3	10	12	11	11	3,40	2,67	2,45	3,51
	60	15	15	15	15	10	10	7	12	4	3	2	3	12	12	10	12	3,38	2,78	2,55	3,53
CH ₃ COONH ₄	40	15	15	15	15	10	9	6	9	4	3	2	3	14	15	8	9	3,01	2,28	2,23	3,20
	50	15	15	15	15	10	9	8	9	4	3	2	3	15	10	8	15	2,99	2,37	2,26	3,22
	60	15	15	15	15	8	10	6	8	3	3	2	3	14	9	6	14	3,07	2,48	2,38	3,28
HCOOH	40	15	15	15	14	4	7	2	4	2	4	0	1	1	4	0	1	4,61	5,12	3,30	N
	50	15	15	15	15	5	6	2	4	0	3	0	3	0	5	0	1	4,58	4,52	3,38	6,56
	60	15	15	-	15	5	9	-	3	2	3	-	2	2	3	-	2	4,52	4,76	-	6,99
H ₂ O	40	15	15	14	15	4	5	2	3	0	3	0	2	0	0	9	5	4,49	6,75	N	5,24
	50	15	14	14	-	3	6	4	-	1	3	2	-	2	0	0	-	4,49	N	N	-
	60	15	14	-	-	6	6	-	-	2	3	-	-	3	0	-	-	4,52	N	-	-
Bez aditiva	40	15	6	14	15	4	3	2	3	3	3	1	3	0	0	0	1	5,97	N	N	6,99
	50	15	9	14	14	5	4	4	4	2	3	2	3	0	0	0	0	5,73	N	N	N
	60	15	12	14	14	6	5	5	6	2	2	2	3	0	0	0	0	5,96	N	N	N

modře – stacionární fáze s nejlepším výsledkem pro daný parametr; červeně – počet vymytých píků nižší než 15; pomíčka – měření nebylo provedeno; N – nelze určit čas eluce posledního píku, neboť se neeluovaly všechny

Tabulka X: Vliv stacionární fáze na separaci

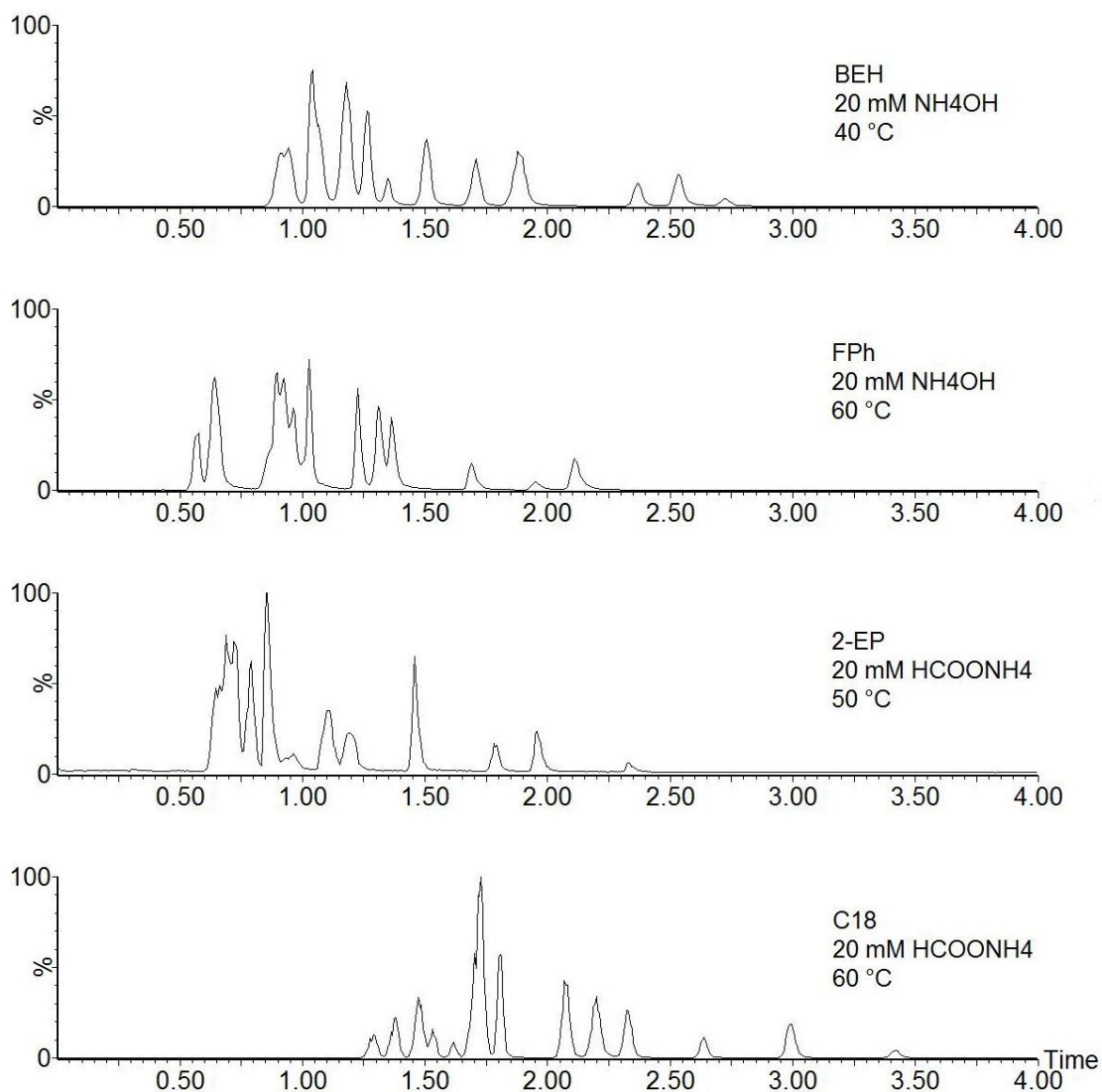
se druhý a čtvrtý pár). Mezi kombinacemi, které se ve výsledku pro první kritérium shodovaly, dále rozhodoval počet rozlišených píků v chromatogramu. Nejvyšší byl na oktadecylové stacionární fázi, kde se rovnal 12, a na druhé straně nepřesahoval 9 v případě 2-EP. V posledním kritériu, počtu „gaussovských“ píků, horní meze dosáhla BEH s vyhovujícím profilem píků pro každý z 15 analytů. Chromatogramy pro separaci na jednotlivých stacionárních fázích za nejpříznivější kombinace experimentálních podmínek ukazuje Obr. 21. Metoda SFC-MS za použití stacionárních fází BEH a FPh prokázala schopnost sledovat všech 15 drog ve směsi za necelé tři minuty, s celkovou dobou analýzy 7 min včetně ekvilibrace kolony.

Tabulka XI: Podmínky, při kterých bylo na jednotlivých stacionárních fázích dosaženo nejlepších výsledků

Stacionární fáze	Aditivum	Teplota (°C)	Počet rozlišených izobarických párů	Počet rozlišených píků v chromatogramu	Počet „gaussovských“ píků	Čas úplné eluce posledního píku (min)
BEH	NH ₄ OH	40	4	11	15	2,87
FPh	NH ₄ OH	60	4	10	12	2,36
C18	HCOONH ₄	60	3	12	12	3,53
2-EP	HCOONH ₄	50	2	9	11	2,45

4.8 Srovnání s HPLC-MS

Zatímco podrobné srovnání výsledků s jinými používanými metodami není možné, hrubé srovnání se zdá velmi slibné. Pro nové syntetické drogy převažuje technika HPLC-MS, zvláště uspořádání s elektrosprejem a trojitým kvadrupólovým analyzátozem.⁸⁶⁻⁹⁰ V žádné z uvedených citací není separace drog podrobně optimalizována a analýza je založena na selektivitě trojitého kvadrupólu. Právě tato skutečnost ztěžuje srovnání. Odborné články, blížíci se předkládané práci v počtu a typu analytů, převážně uvádějí delší dobu analýzy (Tab. XII).



Obrázek 21: Separace na čtyřech typech stacionární fáze za použití nejpříznivější kombinace aditiva a teploty (intenzita odpovídající 100 % na ose y: $1,00 \cdot 10^7$, výřezy z chromatogramů)

Tabulka XII: HPLC-MS analýzy porovnatelné s předkládanou prací

Odborný článek	Cit. ¹⁰⁸	Cit. ⁸⁷	Cit. ⁹⁰	Cit. ¹⁰⁹
Celkový počet analytů	9 analytů	25 analytů	28 analytů	28 analytů
Čas	12 min	24 min	4 min	20 min
Shoda s předkládanou prací	4 drogy	9 drog	8 drog	8 drog
Okruh analytů:				
Katinony	✓	✓	✓	✓
Fenylethylaminy			✓	
Další sloučeniny		✓	✓	✓
Kolona	XDB C18	XDB C18	BEH C18	Accucore C18
Hmotnostní spektrometr	ESI-QQQ	ESI-QQQ	ESI-QQQ	HESI-QExactive

5 ZÁVĚR

Ze získaných výsledků lze pro případnou další analýzu daných kationů a fenylethylaminů vyvodit jednoznačné doporučení, pokud jde o volbu stacionární fáze a aditiva. Naměřená data naznačují, že jak nejvyšší počet oddělených izobarických párů, tak nejvyšší počet celkově separovaných analytů byl dosažen s využitím stacionární fáze BEH. Počty úspěšně separovaných analytů se snižovaly mírně pro FPh a C18 a výrazněji pro 2-EP. Ohledně počtu „gaussovských“ piků trend nebyl tak zřejmý a pořadí kolon se měnilo podle použitého aditiva a teploty. Pokud by měl být jako doplňkové měřítko hodnocen i čas, analýza na FPh a 2-EP ušetřila minutu oproti BEH a C18. Aditiva k mobilní fázi, která se ukázala velmi vhodná, zahrnovala NH_4OH , HCOONH_4 and $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Zbývající aditiva, HCOOH a H_2O , a absence aditiva ovlivnily tvar piků, šířku piků a rozlišení výrazně nepříznivě. Na rozdíl od stacionární fáze a aditiva nelze obecně doporučit teplotu pro separaci, protože závisela na dalších podmínkách. Nejlépe separace proběhla na stacionární fázi BEH s NH_4OH jako aditivem a při teplotě $40\text{ }^\circ\text{C}$. V chromatogramu lze rozeznat 11 piků náležících celkem 15 analytům, byly rozděleny všechny čtyři izobarické páry a piky všech sledovaných iontů byly symetrické. Celkový čas analýzy činil 7 min, ale poslední analyt se eluoval již za 2,9 min. V praxi by časový program pro sledované analyty mohl být kratší, např. ekvilibrace může být zahájena po 3 min.

Superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií umožnila úspěšnou rychlou analýzu 15 drog ve směsi za méně než 3 min. Podle literatury je pro nové syntetické drogy stejně vhodná jako kapalinová chromatografie, umožňuje jejich rychlejší separaci a nevyžaduje příliš jiné vybavení. Koncentrace zkoumané směsi řádově odpovídala koncentraci účinné dávky v těle a použitá metoda by proto mohla být dále optimalizována pro analýzu tělních tekutin. Jako zavedená technika pro analýzu strukturně podobných sloučenin by SFC-MS mohla ulehčit screening velkého množství izomerních kationů a fenylethylaminů. Celkově by tak SFC mohla přispět ke zdokonalení současného přístupu k analýze současných drog.

6 LITERATURA

1. Národní monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2011*. Úřad vlády České republiky, Praha (2012).
2. Národní monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2010*. Úřad vlády České republiky, Praha (2011).
3. Wilkins C.: *Addiction* 109, 1580 (2014).
4. EMCDDA and Europol: *EMCDDA–Europol 2011 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2012).
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: *New psychoactive substances in Europe*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2015).
6. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol: *EU drug markets report: a strategic analysis*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2013).
7. Národní monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2012*. Úřad vlády České republiky, Praha (2013).
8. Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti: *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2013*. Úřad vlády České republiky, Praha (2014).
9. Grolmusová L., Mravčík V.: *Nové syntetické drogy: Aktuální situace. Zaostřeno na drogy*. Úřad vlády České republiky, Praha (2012).
10. Rozhodnutí Rady 2005/387/JVV ze dne 10. května 2005 o výměně informací, hodnocení rizika a kontrole nových psychoaktivních látek. *Úřední věstník Evropské unie* L 127, 20. 5. 2005, svazek 48, str. 32.
11. Společná akce ze dne 16. června 1997 přijatá Radou na základě článku K.3 Smlouvy o Evropské unii o výměně informací, hodnocení rizika a kontrole nových syntetických drog. *Úřední věstník Evropské unie* L 167, 25. 6. 1997, kapitola 19, svazek 1, str. 70.
12. Davies, C. et al. *United Kingdom drug situation: annual report to the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) 2012. Overview of New Psychoactive Substances (NPS)*. UK Focal Point on Drugs, Liverpool 2012. ISBN: 978-1-908929-23-5.
13. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: *EMCDDA–Europol Joint Report on a new psychoactive substance: MDPV (3,4-methylenedioxypropylone)*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2014).
14. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: *EMCDDA–Europol 2013 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2013).
15. Staack R.F., Maurer H.H.: *Curr. Drug Metab.* 6, 259 (2005).

16. Páleníček T.: *Taneční drogy: Aktuální informace o drogách na taneční scéně. Zaostřeno na drogy*. Úřad vlády České republiky, Praha (2010).
17. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction and Europol: *New drugs in Europe, 2012. EMCDDA-Europol 2012 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2012).
18. Meyer M.R., Maurer H.H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 195 (2012).
19. Wong M.L., Holt R.I.: *Drug Test. Anal.* 3, 464 (2011).
20. Rádl S.: *Chem. Listy* 98, 1073 (2004).
21. Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost: *Výroční zpráva za rok 2012: Stav drogové problematiky v Evropě*. Úřad pro publikace Evropské unie, Lucemburk (2012).
22. Hughes B., Gallegos A., Sedefov R.: *Úkol Drogy 22, Reakce na nové drogy*. Úřad pro publikace Evropské unie, Lucemburk (2011).
23. European Commission. *Report from the Commission on the assessment of the functioning of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances*. Dostupné z: http://ec.europa.eu/justice/policies/drugs/docs/com_2011_430_en.pdf, zobrazeno 11. 7. 2011.
24. Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost: *Evropská zpráva o drogách 2014: trendy a vývoj*. Úřad pro publikace Evropské unie, Lucemburk (2014).
25. Maurer H.H.: *Ther. Drug Monit.* 32, 544 (2010).
26. King, L.A., Kicman A.T.: *Drug Test. Anal.* 3, 401 (2011).
27. The Gallup Organization. *Youth attitudes on Drugs - Flash Eurobarometer No. 330*. (The Gallup Organization for European Commission, 2011).
28. <http://www.emcdda.europa.eu/stats13#display:/stats13/gpstab7b>, Lifetime prevalence of drug use in all available national general population surveys, zobrazeno 17. 12. 2013.
29. Zákon č. 106/2011 Sb. ze dne 6. dubna 2011, kterým se mění zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů. *Sbírka zákonů 2011*, částka 40, str. 1056.
30. Nařízení vlády č. 463/2013 ze dne 18. prosince 2013 o seznamech návykových látek. *Sbírka zákonů 2013*, částka 178, str. 7774.
31. Národní protidrogová centrála služby kriminální policie a vyšetřování: *Výroční zpráva 2013*. Praha (2013).
32. Chomynová, P. Národní výzkum užívání návykových látek 2012. *Zaostřeno na drogy 2/2013*. Praha: Úřad vlády České republiky 2013. ISSN 1214-1089.
33. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Synthetic cannabinoids in Europe. Perspective on Drugs* (2013).
34. Hill S.L., Thomas S.H.L.: *Clin. Toxicol.* 49, 705 (2011).

35. Saito M.: *J. Biosci. Bioeng.* 115, 590 (2013).
36. Churáček J.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha (1990).
37. Berger, T. A., v knize: *Encyclopedia of Separation Science* (Wilson I. D. *et al.*, ed.), sv. 2, kap. II/CHROMATOGRAPHY: SUPERCRITICAL FLUID/Instrumentation. Academic Press, Londýn 2000. ISBN: 0122267729.
38. Berger T.A., Wilson W.H.: *Anal. Chem.* 65, 1451 (1993).
39. Alexander A.J., Staab A.: *Anal. Chem.* 78, 3835 (2006).
40. Taylor L.T.: *LCGC North Am.* 27, 490 (2009).
41. Gere D.R.: *Science* 222, 253 (1983).
42. Taylor L.T.: *J. Supercrit. Fluids* 47, 566 (2009).
43. McClain R.T., Dudkina A., Barrow J. et al.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32, 483 (2009).
44. Majewski W., Valery E., Ludemann-Hombourger O.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28, 1233 (2005).
45. Zheng J., Pinkston J.D., Zoutendam P.H. et al.: *Anal. Chem.* 78, 1535 (2006).
46. Pinkston J.D., Stanton D.T., Wen D.: *J. Sep. Sci.* 27, 115 (2004).
47. Grand-Guillaume Perrenoud A., Boccard, J., Veuthey J.-L., Guillarme D.: *J. Chromatogr. A* 1262, 205 (2012).
48. Pinkston J.D., Wen D., Morand K.L. et al.: *Anal. Chem.* 78, 7467 (2006).
49. Bartle, K. D., v knize: *Encyclopedia of Separation Science* (Wilson I. D. *et al.*, ed.), sv. 2, kap. II/CHROMATOGRAPHY: SUPERCRITICAL FLUID/Historical Development. Academic Press, Londýn 2000. ISBN: 0122267729.
50. Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A.: *J. Org. Chem.* 27, 700 (1962).
51. Berger T.A.: *Chromatographia* 72, 597 (2010).
52. Berger, T. A., v knize: *Encyclopedia of Analytical Science* (Worsfold, P. J., Townshend, A., Poole, C. F.), sv. 7, kap. SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY: Overview. Elsevier Ltd 2005. ISBN: 978-0-12-369397-6.
53. Schoenmakers, P., v knize: *Encyclopedia of Separation Science* (Wilson I. D. *et al.*, ed.), sv. 2, kap. APPENDIX 2/ESSENTIAL GUIDES TO METHOD DEVELOPMENT IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY str. 4644-4652. Academic Press, Londýn 2000.
54. Nováková L., Perrenoud A.G., Francois I. et al.: *Anal. Chim. Acta* 824, 18 (2014).
55. Lesellier E.: *J. Chromatogr. A* 1216, 1881 (2009).
56. Poole C.F.: *J. Chromatogr. A* 1250, 157 (2012).
57. Berger T.A., Berger B., Majors R.E.: *LCGC North Am.* 28, 344 (2010).
58. De la Puente M.L., López Soto-Yarritu P., Anta C.: *J. Chromatogr. A* 1250, 172 (2012).
59. De Villiers A., Lauer H., Szucs R. et al.: *J. Chromatogr. A* 1113, 84 (2006).

60. Li F., Hsieh Y.: *J. Sep. Sci.* *31*, 1231 (2008).
61. Raveendran P., Ikushima Y., Wallen S.L.: *Accounts Chem. Res.* *38*, 478 (2005).
62. Andersson S., Nelander H., Öhlén K.: *Chirality* *19*, 706 (2007).
63. Smith R.M.: *J. Chromatogr. A* *856*, 83 (1999).
64. Later, D.W., Richter, B.E., Knowles, D.E., Andersen M.R.: *J. Chromatogr. Sci.* *24*, 249 (1986).
65. Lurie, I.S., Moore, J.M., Kram, T.C., Cooper D.A.: *J. Chromatogr. A* *504*, 391 (1990).
66. MacKay, G.A., Reed G.D.: *J. High Resolut. Chromatogr.* *14*, 537 (1991).
67. Janicot, J.L., Caude, M., Rosset R.: *J. Chromatogr. A* *437*, 351 (1988).
68. J.L. Veuthey W.H.: *J. Chromatogr. A* *515*, 385 (1990).
69. McAvoy Y., Cole M.D., Gueniat O.: *Forensic Sci. Int.* *102*, 13 (1999).
70. http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_mass_spectrometry, zobrazeno 14. 4. 2014.
71. Vidová V., Lemr K., Havlíček V.: *Chem. Listy* *102*, 957 (2008).
72. Volný M.: *Chem. Listy* *105*, 230 (2011).
73. Porta T., Grivet C., Kraemer T. et al: *Anal. Chem.* *83*, 4266 (2011).
74. Bradshaw R., Wolstenholme R., Blackledge R.D. et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *25*, 415 (2011).
75. Peters F.T.: *Clin. Biochem.* *44*, 54 (2011).
76. Cruces-Blanco C., García-Campaña A.M.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* *31*, 85 (2012).
77. Kraemer T., Paul L.D.: *Anal. Bioanal. Chem.* *388*, 1415 (2007).
78. Saito K., Saito R., Kikuchi Y. et al.: *J. Health Sci.* *57*, 472 (2011).
79. Maurer H.H.: *Anal. Bioanal. Chem.* *388*, 1315 (2007).
80. Moosmann B., Kneisel S., Wohlfarth A. et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 3929 (2013).
81. Favretto D., Pascali J.P., Tagliaro F.: *J. Chromatogr. A* *1287*, 84 (2013).
82. Elliot S.: *Bioanalysis* *3*, 249 (2011).
83. ElSohly M.A., Gul W., Wanas A.S. et al.: *Life Sci.* *97*, 78 (2014).
84. Grabenauer M., Krol W.L., Wiley J.L. et al.: *Anal. Chem.* *84*, 5574 (2012).
85. Zuba D.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* *32*, 15 (2012).
86. Ammann J., McLaren J.M., Gerostamoulos D. et al.: *J. Anal. Toxicol.* *36*, 372 (2012).
87. Ammann D., McLaren J.M., Gerostamoulos D. et al.: *J. Anal. Toxicol.* *36*, 381 (2012).
88. Swortwood M.J., Boland D.M., DeCaprio A.P.: *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 1383 (2013).
89. Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignanò E. et al.: *J. Chromatogr. A* *1258*, 37 (2012).
90. Al-Saffar Y., Stephanson N.N., Beck O.: *J. Chromatogr. B* *930*, 112 (2013).
91. Sundström M., Pelander A., Angerer V. et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 8463 (2013).

92. Ramanathan R., Jemal M., Ramagiri S. et al.: J. Mass Spectrom. 46, 595 (2011).
93. Grand-Guillaume Perrenoud A., Veuthey J.-L., Guillarme D.: J. Chromatogr. A 1339, 174 (2014).
94. Yamada T., Uchikata T., Sakamoto S. et al.: J. Chromatogr. A 1301, 237 (2013).
95. Chen R.: Chromatography Today 4, 11 (2009).
96. Ishibashi M., Ando T., Sakai M. et al.: J. Chromatogr. A 1266, 143 (2012).
97. Matsubara A., Bamba T., Ishida H. et al.: J. Sep. Sci. 32, 1459 (2009).
98. Zhang X., Scalf M., Westphall M.S. et al.: Anal. Chem. 80, 2590 (2008).
99. Xu X., Roman J.M., Veenstra T.D. et al.: Anal. Chem. 78, 1553 (2006).
100. Crowther J.B., Henion J.D.: Anal. Chem. 57, 2711 (1985).
101. Bäckström, B., Cole, M.D., Carrott, M.J., Jones, D.C., Davidson, G., Coleman K.: Sci. Justice 37, 91 (1997).
102. Bronz I.: Am. J. Anal. Chem. 03, 870 (2012).
103. Hoke S.H., Tomlinson J.A., Bolden R.D. et al.: Anal. Chem. 73, 3083 (2001).
104. Nováková L., Rentsch M., Perrenoud A.G. et al.: Anal. Chim. Acta 853, 647 (2015).
105. www.emcdda.europa.eu/publications/implementation-reports, zobrazeno 17. 12. 2013.
106. Rozhodnutí Komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků. Úřední věstník Evropské unie L 221, 17. 8. 2002, kapitola 3, svazek 36, str. 493.
107. Sauvage F.-L., Gaulier J.-M., Lachâtre G. et al.: Clin. Chem. 54, 1519 (2008).
108. Marinetti L.J., Antonides H.M.: J. Anal. Toxicol. 37, 135 (2013).
109. Concheiro M., Anizan S., Ellefsen K. et al.: Anal. Bioanal. Chem. 405, 9437 (2013).
110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>, zobrazeno 13. 11. 2014.
111. www.wikipedia.org.

8 DOPORUČENÁ LITERATURA

Drogy 2.0 přicházejí: Internet radikálně proměňuje světový obchod s omamnými látkami

<http://respekt.ihned.cz/c1-60029280-drogy-2-0-prichazeji>, zobrazeno 13. 4. 2014

Implementation report 2011

EMCDDA and Europol: *EMCDDA–Europol 2011 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA*. Publications Office of the European Union, Luxembourg (2012).

CHROMATOGRAPHY: SUPERCRITICAL FLUID / Instrumentation

Berger, T. A., v knize: *Encyclopedia of Separation Science* (Wilson I. D. et al., ed.), sv. 2, kap. II/CHROMATOGRAPHY: SUPERCRITICAL FLUID/Instrumentation. Academic Press, Londýn 2000. ISBN: 0122267729.

History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development

Saito M.: *J. Biosci. Bioeng.* 115, 590 (2013).

Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 μ m particles: A tutorial

Novakova L., Grand-Guillaume Perrenoud A., Francois I. et al.: *Anal. Chim. Acta* 824, 18 (2014).

Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: Attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility

Grand-Guillaume Perrenoud A., Boccard, J., Veuthey J.-L., Guillarme D.: *J. Chromatogr. A* 1262, 205 (2012).

New challenges and innovation in forensic toxicology. Focus on the “New Psychoactive Substances”

Favretto D., Pascali J.P., Tagliaro F.: *J. Chromatogr. A* 1287, 84 (2013).

Analysis of Synthetic Cannabinoids Using High-Resolution Mass Spectrometry and Mass Defect Filtering: Implications for Nontargeted Screening of Designer Drugs

Grabnauer M., Krol W.L., Wiley J.L. et al.: *Anal. Chem.* 84, 5574 (2012).

9 SEZNAM ZKRATEK

BEH	Bridged Ethylene Hybrid
BPR	Regulátor zpětného tlaku
EMCDDA	Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost
ESI	Elektrosprej
FID	Plamenově ionizační detektor
FPh	Fluoro-Phenyl
FWHM	Šířka píku v polovině jeho výšky
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	Hmotnostní spektrometr s vysokou rozlišovací schopností
ICR	Iontová cyklotronová rezonance
IT	Iontová past
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
MALDI	Desorpční ionizace za přítomnosti matrice
MDPV	Methylendioxypropylvaleron
NMS	Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti
NPL	Nové psychoaktivní látky
Q	Kvadrupólový analyzátor
QQQ	Trojité kvadrupólový analyzátor
RP-HPLC	HPLC na obrácených fázích
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SPE	Extrakce pevnou fází
TOF	Analyzátor doby letu
UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
2-EP	2-Ethylpyridine