

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Spojení rychlých separací s hmotnostní spektrometrií v analýze
oligosacharidů a nových syntetických drog**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

Mgr. Lucie Borovcová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2018

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

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

V Olomouci dne

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, informace, ochotu a vstřícnost během mého postgraduálního studia.

Ráda bych poděkovala všem svým kolegům z Katedry analytické chemie PřF UP především pak M.Sc. V. Paukovi, Ph.D. a dále rovněž Mgr. M. Hermannové, Ph.D. z firmy Contipro a.s. za spolupráci při realizaci vybraných experimentů.

Disertační práce vznikla za finanční podpory projektů LO1305, IGA_PrF_2016_016, IGA_PrF_2017_020, IGA_PrF_2018_027.

SOUHRN

Disertační práce se zabývá studiem rychlých separací ve spojení s hmotnostní spektrometrií se zaměřením na analýzu nových psychoaktivních látek a oligosacharidů. Teoretická část je věnována rychlým chromatografickým separacím a separacím iontovou mobilitou ve spojení s hmotnostní spektrometrií včetně jejich praktických aplikací. Jsou zde rovněž popsány postupy umožňující odlišení nedostatečně separovaných mobilitních píků. Teoretickou část uzavírají kapitoly zabývající se novými psychoaktivními látkami (NPS) a kyselinou hyaluronovou.

Výsledky práce zahrnují studium a validaci chromatografické separace 15 NPS ze skupiny kationů a fenylethylaminů v moči pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) a ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC). K úpravě vzorků moče byl použit jednoduchý postup „zředit-zfiltrovat-analyzovat“. Z hlediska výtěžnosti i matričních efektů poskytovala UHPSFC kompaktnější výsledky, avšak na vyšších koncentračních hladinách docházelo k přenosu analytu do následující analýzy. Tento jev lze minimalizovat proložením analytické sekvence slepými vzorky. Při separaci izomerů NPS bylo dosaženo lepších výsledků technikou UHPSFC, která oproti UHPLC umožnila úspěšně rozlišit izomery 3-FMC a 4-FMC. Pro všech 15 NPS byly stanoveny limity detekce a kvantifikace, přičemž limity detekce se pohybovaly v rozmezí 0,01 až 5 ng/ml moče. Kromě chromatografické separace byly nové psychoaktivní látky analyzovány pomocí iontové mobility ve spojení s hmotnostní detekcí. Vedle testování vlivu druhu driftového plynu na iontově mobilitní separaci byly vypočteny hodnoty CCS (účinného srážkového průřezu), které jsou další charakteristikou látky vhodnou pro potvrzení její identifikace.

V souvislosti s menší rozlišovací schopností iontové mobility byl vyvinut jednoduchý postup k určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků, který vychází z předpokladu dobré opakovatelnosti driftového času a tvaru mobilitního píku (ATD profilu). Profil mobilitního píku je popsán jednou nebo více Gaussovskými funkcemi, z nichž je pro jednotlivé složky v binárních směsích získána tzv. ATD funkce. Tyto ATD funkce byly aplikovány na iontově mobilitní data modelových směsí oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové. Plochy píků jednotlivých složek získané fitováním dobře korelovaly s hodnotami,

které byly získány integrací HPLC píků. Navržený postup se může uplatnit nejen při analýze oligosacharidů, ale také u dalších analytů špatně separovaných iontovou mobilitou. Dosažené výsledky ukazují význam rychlých separací při analýze toxikologicky nebo biologicky zajímavých látek.

SUMMARY

The dissertation deals with rapid separations coupled to mass spectrometry with the focus on analysis of new psychoactive substances and oligosaccharides. The theoretical part is devoted to fast chromatographic separations and separations by ion mobility spectrometry coupled to mass spectrometry, including their practical applications. Procedures allowing for distinguishing poorly separated mobility peaks are also described. The theoretical part is concluded by the chapters dealing with new psychoactive substances (NPS) and hyaluronic acid.

The results include the development and validation of chromatographic separation of 15 NPS (cathinones and phenylethylamines) in urine based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) and ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC). A simple "dilute-filter-and-shoot" procedure was used to treat urine samples. UHPSFC provided more uniform results in terms of recovery and matrix effects, but carryover of certain analytes was observed at higher concentration levels. This phenomenon can be reduced sufficiently by inserting blank samples into the analytical sequence. Regarding the separation of NPS isomers, better results were obtained by the UHPSFC that allowed for successful differentiation of 3-FMC and 4-FMC isomers, as opposed to UHPLC. Limits of detection and quantification were determined and LOD in the range from 0.01 to 5 ng/mL urine was observed. Besides chromatographic separation, new psychoactive substances were analyzed using ion mobility coupled to mass detection. In addition to testing the influence of the drift gas on the ion mobility separation, the CCS (collision cross section) values were also measured. CCS represents another characteristic suitable for confirming the identity of the substance.

Due to the lower resolving power of ion mobility, a simple procedure has been developed to determine areas of insufficiently separated mobility peaks, based on the assumption of good repeatability of drift time and peak shape (ATD profile). The mobility peak profile is described by one or more Gaussian functions, from which ATD functions are obtained for the individual components of the binary mixtures. These ATD functions were applied to the ion mobility data of model mixtures of hyaluronic acid-derived oligosaccharides. The peak areas of the individual components obtained by fitting correlated well with the values got integrating HPLC peaks. ATD functions might be useful not only for analysis of oligosaccharides but also for other

analytes poorly separated by ion mobility. The achieved results demonstrate the importance of rapid separations for analysis of toxicologically or biologically relevant substances.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. Úvod k rychlým separacím	2
2.2. Rychlé chromatografické separace	3
2.3. Aplikace rychlých chromatografických separací	9
2.4. Separace iontovou mobilitou a iontovou mobilitou s hmotnostní spektrometrií	13
2.4.1. Iontově mobilní cely.....	15
2.4.2. Účinný srážkový průřez (Collision Cross Section, CCS, Ω).....	20
2.5. Aplikace iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií.....	20
2.6. Postupy pro odlišení nedostatečně separovaných mobilních píků.....	23
2.7. Nové psychoaktivní látky a jejich analýza.....	25
2.8. Iontově mobilní spektrometrie v analýze kyseliny hyaluronové	29
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1. Ultra-vysokoúčinná chromatografie nových psychoaktivních látek.....	33
4.2. Analýza nových psychoaktivních látek pomocí spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií	40
4.3. Určení ploch nedostatečně separovaných mobilních píků.....	44
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	49
5.1. Ultra-vysokoúčinná chromatografie nových psychoaktivních látek.....	49
5.1.1. Chromatografická separace	49
5.1.2. Příprava vzorků a volba rozpouštědla	53
5.1.3. Limit detekce	53
5.1.4. Preciznost, lineární rozsah a přesnost.....	55
5.1.5. Matriční efekt	55
5.1.6. Výtěžnost.....	56
5.1.7. Přenos analytu do následných analýz (carryover).....	57
5.1.8. Závěr.....	58

5.2. Analýza nových psychoaktivních látek pomocí spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií	59
5.2.1. Vliv volby driftového plynu na iontově mobilitní separaci vybraných nových psychoaktivních látek	59
5.2.2. Určování účinného srážkového průřezu	61
5.2.3. Závěr	62
5.3. Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků	63
5.3.1. Opakovatelnost driftových časů	63
5.3.2. Postup zpracování dat, tvorba ATD funkce	63
5.3.3. Aplikace ATD funkce na modelové směsi	65
5.3.4. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi	69
5.3.5. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi při využití jedinečných fragmentových iontů	71
5.3.6. Závěr	72
6. ZÁVĚR.....	74
POUŽITÁ LITERATURA	75
SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	87
ŽIVOTOPIS.....	90
PŘÍLOHY	I
Přílohy A: Ultra-vysokoúčinná chromatografie nových psychoaktivních látek	I
Přílohy B: Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků	VI
Přílohy C: Publikační výstupy	XI

1. ÚVOD

Význam analytické chemie v dnešní době dokládá skutečnost, že se tento obor stává stále více nepostradatelnou součástí řady odvětví, mezi které patří farmacie, toxikologie, potravinářský průmysl, sledování životního prostředí, dopingové kontroly a mnoho dalších. Vysoké nároky na analýzu rozmanitých vzorků vedou k vývoji velmi citlivých a selektivních technik umožňujících analýzu širokého spektra analytů v matričně složitých vzorcích ve velice krátkých časech. Právě rychlost separace je jedním z hlavních parametrů, kterému je v této práci věnována pozornost.

Disertační práce je zaměřena na studium, vývoj a aplikaci rychlých separací ve spojení s citlivou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Vyvíjeny a porovnány byly dvě chromatografické techniky (UHPLC a UHPSFC) v analýze patnácti nových psychoaktivních látek v lidské moči. Kromě chromatografické separace byla řešena také problematika iontově mobilní separace těchto látek s cílem určení jejich účinného srážkového průřezu jako charakteristické veličiny přispívající k identifikaci. Pro odlišení špatně separovaných iontově mobilních píků byl navržen postup, který byl testován na binárních směsích oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Úvod k rychlým separacím

Z hlediska chromatografie lze za rychlé separace považovat analýzy, u kterých dochází k eluci složek vzorků v jednotkách minut příp. sekund. V případě iontové mobility lze výsledky měření získat v jednotkách až desítkách sekund. Narůstající zájem o oblast vývoje rychlých separací je způsoben především neustále se zvyšujícím počtem prováděných analýz a potřebou získat rychle výsledky a to i v případě matričně složitých a rozmanitých vzorků. Cílem je dospět k co nejrychlejší separaci dosahující potřebné účinnosti a rozlišení s následnou citlivou a selektivní detekcí. Rychlé separace nacházejí své uplatnění v mnoha oblastech, kde je kladen důraz především na čas. Například v toxikologii, klinické chemii, při dopingových kontrolách, ale i v proteomice a metabolomice, kde je potřebná účinná separace velmi komplexních vzorků obsahujících až stovky složek.

Na základě těchto požadavků je v posledních letech směřována pozornost na vývoj vysokotlakých technik poskytujících výsledky ve významně kratších časech ve srovnání s technikami konvenčními. Mezi tyto techniky, dnes již běžně používané, řadíme ultravysokoúčinnou kapalinou chromatografii (UHPLC) využívající pro zvýšení účinnosti separace stacionární fáze s plně porézními částicemi menšími než 2 μm . Rychlých separací lze však dosáhnout i jinými cestami, než je zmenšování plně porézních částic, např. použitím monolitických kolon nebo povrchově porézních částic. Později na trh uvedená ultravysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) není prozatím tak běžnou technikou, v mnoha případech se však osvědčila jako vhodná alternativa k UHPLC. Právě proto je možné nalézt řadu publikací, ve kterých jsou tyto dvě techniky vzájemně porovnávány [1-7]. Rovněž elektromigrační techniky je možné využít k rychlým separacím. To dokládá řada publikovaných aplikací, které v módu kapilární elektroforézy (CE) jsou schopny separací v řádu sekund až jednotek minut [8-11].

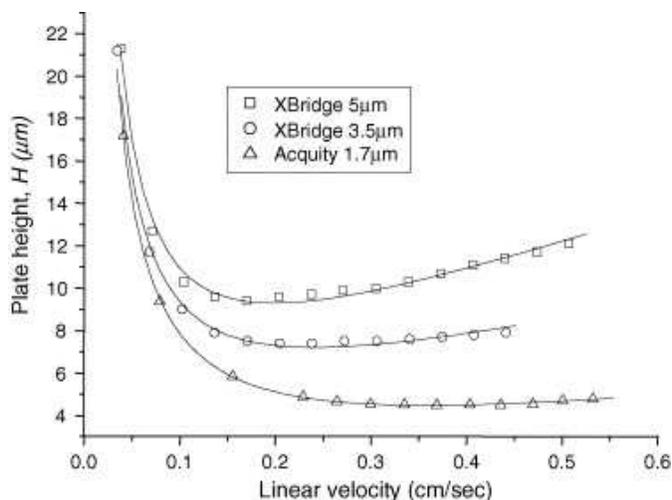
Dalším typem techniky umožňující rychlou separaci, které je taktéž věnována pozornost, je spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IM-MS). Tato technika je schopná poskytovat rychlé výsledky i bez nutnosti zařazení chromatografického systému, jelikož umožňuje separaci iontů přímo v mobilitní cele integrované s hmotnostním spektrometrem.

Spojení IM-MS přineslo nové možnosti v separaci a kvantifikaci izobarických/izomerních sloučenin. IM-MS rozšiřuje možnosti identifikace látek, ověřování struktur, ale také zlepšuje poměr signálu k šumu při kvantitativní analýze. K ověření a identifikaci látek se využívá charakteristické veličiny – účinného srážkového průřezu neboli CCS (collision cross section), jehož hodnotu lze touto technikou určit [12].

2.2. Rychlé chromatografické separace

V posledních letech došlo ke značnému nárůstu počtu nových komerčně dostupných technologií v oblasti chromatografie. Cílem těchto nových technologií je dosažení rychlejší analýzy bez ztráty kvality separace nebo získání vyššího rozlišení v rozumném čase [13].

Jednou z možností jak dosáhnout rychlejších separací je zmenšování plně porézních částic chromatografického sorbentu až na průměr menší než 2 μm , což ovšem přináší zvýšené nároky na chromatografickou instrumentaci z hlediska tlaku, za kterého je systém schopen pracovat. Tento směr vývoje rychlých separací se prosadil v roce 2004 příchodem prvního komerčně dostupného UHPLC systému Acquity UPLC od firmy Waters. Dnešní moderní systémy jsou schopny pracovat až do tlaků 1500 barů (~ 22000 psi) [14]. Z Van Deemterovy křivky pro různé průměry částic sorbentu (Obr. 1) je zřejmé, že optimální separační účinnosti pro menší částice je dosaženo při vyšších lineárních průtokových rychlostech a v jejich širším rozsahu a to z důvodu nízkého odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi. S použitím kolon naplněných částicemi menšími než 2 μm lze tak dosáhnout lepší účinnosti, rozlišení a zkrácení doby analýzy [15,16].



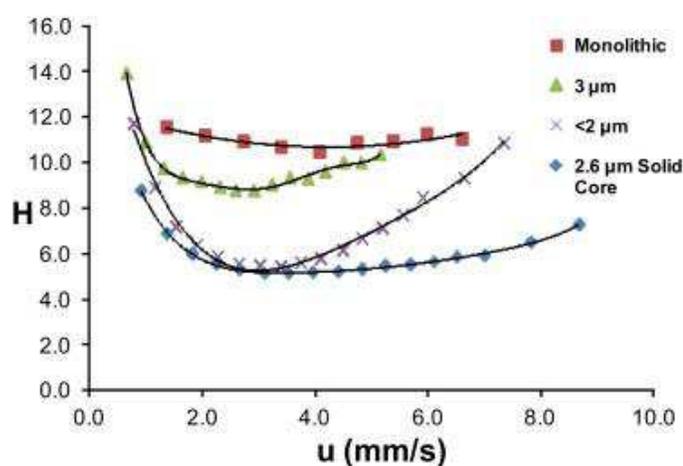
Obr. 1: Znárodnění van Deemterovy křivky pro různé průměry plně porézních částic stacionární fáze. (převzato z cit. [16])

Na druhou stranu využití takto malých částic sebou nese nárůst zpětného tlaku v systému dle Darcyho zákona [17,18]. Při rychlých a účinných separacích za ultra-vysokého tlaku je kladen velký důraz na kvalitu a stabilitu stacionární fáze. V dnešní době jsou pro techniku UHPLC dostupné různé typy stacionárních fází (pro reverzní, normální LC, hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) aj.) v rozmezí průměru částic sorbentu 1,5 – 2 μm. Tento typ kolon se s úspěchem využívá v řadě odvětví jako je například farmacie, biomedicína, analýza potravin a monitoring složek životního prostředí.

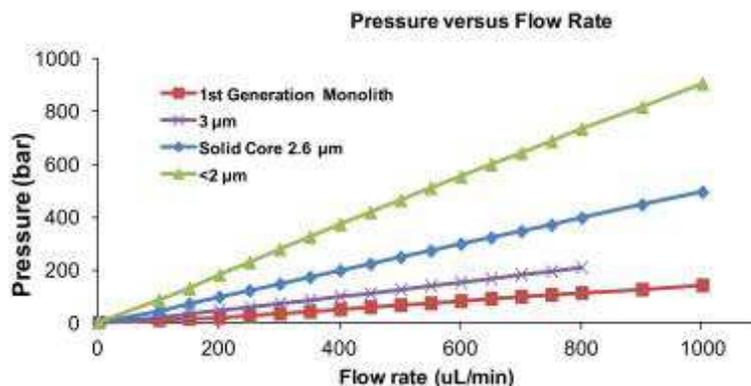
Dalším pokrokem ve vývoji stacionárních fází bylo vyvinutí povrchově porézních částic (SPP – superficially porous particles) složených z pevného neporézního jádra o průměru 1,7 μm a pórovitého vnějšího obalu o tloušce ~ 0,5 μm. Tento moderní typ stacionárních fází, označován také jako „fused-core“, „core-shell“ nebo „solid-core“, řeší díky malým rozměrům částic problém nízké kapacity kolon, který nastává při použití klasických povrchově porézních částic s většími rozměry. Současně také používané malé rozměry povrchově porézních částic pozitivně ovlivnily odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi, podélnou a vířivou difúzi [19-22]. Koncept povrchově porézních stacionárních fází s průměrem částic pod 3 μm byl komercializován v roce 2007 představením této nové generace částic určených pro separaci malých i velkých molekul [23]. Použití kolon naplněných tímto typem částic umožňuje dosáhnout podobných výsledků jako u UHPLC kolon s 2-3krát nižšími tlaky [24,25]. SPP

kolonová technologie představuje jednoho z hlavních konkurentů k UHPLC kolonám, jelikož počet výrobců těchto kolon narůstá [13,20,26].

Zrychlení chromatografické separace lze také docílit pomocí monolitických stacionárních fází. Jsou tvořeny jedním kusem porézního pevného materiálu s jedinečnými vlastnostmi z hlediska permeability a účinnosti [27,28]. Na monolitických kolonách lze pozorovat dva typy pórů: I) makropóry – umožňující rychlý tok mobilní fáze skrz monolit při relativně nižších tlacích, II) mesopóry – které zajišťují velký povrch monolitu a tím i vysokou separační kapacitu [29]. Během 90. let 20. století byly vyvinuty jak organické monolity např. na bázi polymetakrylátu (vhodné k separaci biomolekul včetně oligonukleotidů, peptidů a intaktních proteinů [30,31]), tak anorganické monolity založené např. na oxidu křemičitém. Ty nacházejí uplatnění při separaci malých molekul. Dnes je rozšířená druhá generace monolitů uvedených v roce 2011, které mají menší makropóry 1,2 μm a větší mesopóry 15 nm. Tato generace křemičitých monolitů má obdobné kinetické vlastnosti jako kolony naplněné porézními částicemi menšími než 2 μm [32]. Ve srovnání s kolonami plněnými klasickými plně porézními částicemi o průměru 5 μm umožňují monolitické kolony dosažení vyšší účinnosti za současně nižších zpětných tlaků [33,34]. Komerčně dostupné monolitické kolony z oxidu křemičitého se připravují v PEEK kolonách a mohou být vystaveny maximálnímu tlaku 200 bar [4]. Na Obr. 2 a 3 jsou srovnány různé typy výše popsaných stacionárních fází z hlediska účinnosti a zpětných tlaků při daných průtocích [35].



Obr. 2: Zobrazení van Deemterovy křivky pro různé typy stacionárních fází. (převzato z cit. [35])



Obr. 3: Srovnání kolonového tlaku (100 mm × 2,1 mm) pro různé stacionární fáze při použití mobilní fáze voda:acetonitril (1:1 v/v) a teplotě 30 °C. (převzato z cit. [35])

Stacionární fáze jsou využívány nejen při výrobě klasických kolon, ale také se používají jako náplň kanálků separačních mikročipů [36], které mohou nacházet uplatnění v oblasti mobilních analytických systémů. Zajímavou oblastí, ve které se s úspěchem využívá nových stacionárních fází, jsou tzv. sub-sekundové separace neboli separace pod jednu sekundu. Tyto separace využívají nejkratších komerčně dostupných kolon (50 × 4,6 mm i. d.), které jsou naplněny různými stacionárními fázemi (obvykle povrchově porézními částicemi), k analýze různých tříd sloučenin. Binární nebo ternární směsi, chirální a achirální analyty jsou odděleny v čase i kratším než jedna sekunda. Tento nový přístup by mohl být využíván jak při rychlém screeningu, tak ve dvourozměrné kapalinové chromatografii [37].

S vývojem nových a stabilnějších stacionárních fází začal být na poli chromatografické separace více studován vliv teploty, což směřovalo k nové technice – ultra rychlé kapalinové chromatografii za zvýšené teploty (UFHTLC – Ultra Fast High Temperature Liquid Chromatography). S rostoucí teplotou klesá viskozita mobilní fáze [38], snižuje se zpětný tlak v systému a lze pracovat za vyšších průtoků, což vede k rychlejšímu vymytí látek z kolony [39]. Při extrémně vysokých teplotách postačí pro separaci čistě vodná mobilní fáze, která oproti organickým mobilním fázím přináší řadu výhod z hlediska ceny, toxicity a vlivu na životní prostředí. Na druhou stranu tato technika sebou nese i řadu úskalí, např. degradaci termolabilních analytů, vliv teploty na stabilitu stacionární fáze a konstrukční náročnost instrumentace [40].

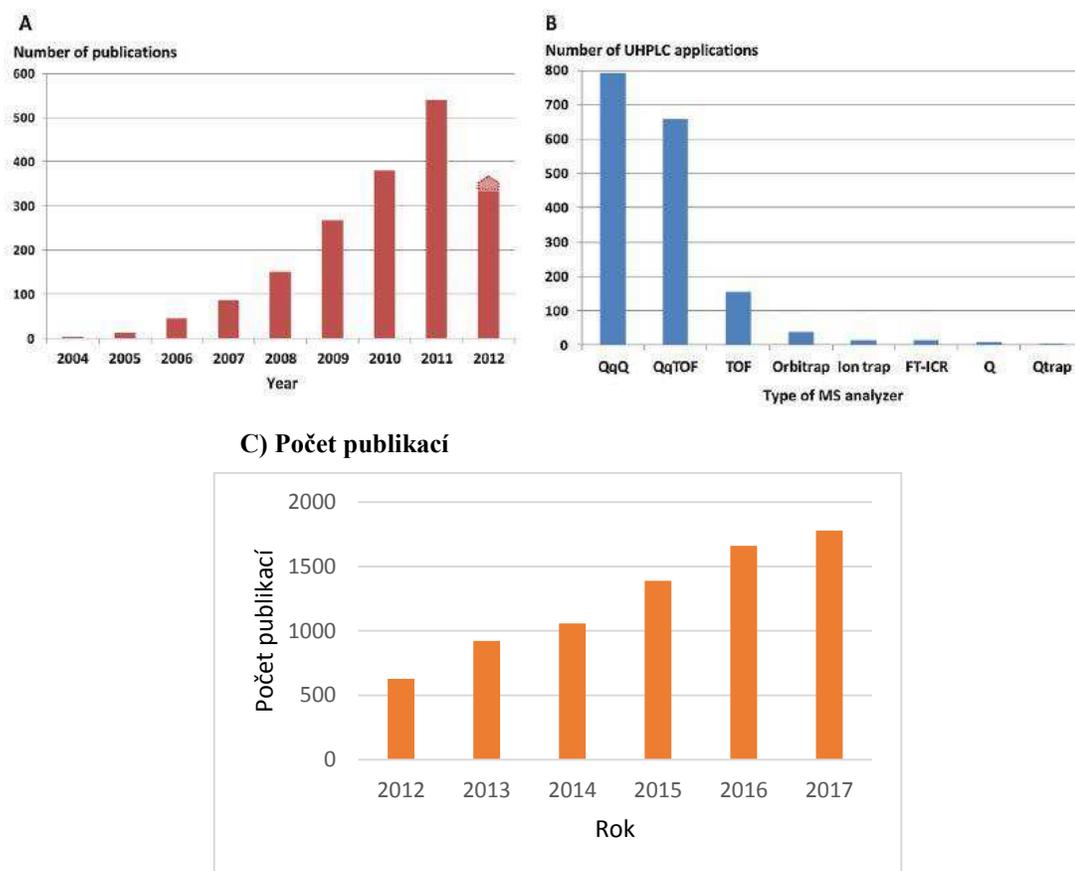
Na poli rychlých separací se stále častěji lze setkat s aplikací superkritické fluidní chromatografie (SFC), která se v posledních letech stala užitečnou alternativou k UHPLC.

Superkritická fluidní chromatografie je založena na jedinečných fyzikálních vlastnostech mobilní fáze, kdy je využíván především oxid uhličitý (CO_2) v nadkritickém stavu. Nevýhodou CO_2 je jeho nízká polarita a s tím i spojená nedostatečná eluce polárních látek z kolony. Tento problém je často vyřešen přidáním modifikátoru do mobilní fáze. Obvykle se jedná o polární organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril apod.). Při separaci se pracuje při teplotě a tlaku vyšším, než jsou kritické hodnoty. Za těchto podmínek mobilní fáze vykazuje vyšší hustotu než plyn, což přispívá k rychlejší eluci látek bez vzniku nadměrného zpětného tlaku v systému [41]. Difuzivitou a viskozitou se k němu přibližuje. Hodnoty difúzního koeficientu látek se v nadkritickém stavu pohybují o 1-2 řády výše než v kapalinách [42]. Stejně jako v případě vývoje kapalinové chromatografie, kdy byl v roce 2004 představen systém UHPLC, tak i vývoj SFC vedl ke vzniku systému UHPSFC (ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie), který umožňuje analýzy za vysokých zpětných tlaků. První komerčně dostupný ultra-vysokoúčinný superkritický fluidní chromatograf Acquity UPC² byl v roce 2012 představen firmou Waters [3,43].

Aplikace rychlých separací se uplatňuje taktéž v oblasti plynové chromatografie. Takzvané „Fast GC“ dovoluje 3-10krát snížit časovou náročnost analýzy oproti konvenční plynové chromatografii. Od klasické plynové chromatografie se odlišuje v použití kratších kolon, s užším průměrem a tenčím filmem stacionární fáze, rychlejšími teplotními programy, volbou nosného plynu (vodík) a jeho průtokovou rychlostí [44,45].

K rychlému získání kvalitních analytických výsledků je zapotřebí nejen dobře optimalizované separace, ale i správně zvolené detekční techniky kompatibilní s chromatografickým systémem. S nárůstem ultra-vysokoúčinných chromatografických separací se objevují některá omezení ve spojení těchto technologií s hmotnostní spektrometrií (MS). Pro rychlé separace a zachování rozlišení/účinnosti (získání úzkých píků) je zapotřebí i adekvátně rychlý pracovní cyklus hmotnostního analyzátoru obecně detektoru. Nejnovější generace hmotnostních spektrometrů tato spojení již umožňují. Některé analyzátory jsou vhodnější pro UHPLC a UHPSFC (např. trojitý kvadrupól nebo průletový analyzátor) než jiné (např. iontová past nebo hmotnostní analyzátory s Fourierovou transformací). Z důvodu používání kolon o nízkých objemech je třeba počítat s významnějším vlivem mimo-kolonových příspěvků na rozšiřování píků, tedy i příspěvku detektoru. Ultra-vysokoúčinné systémy umožňují pracovat při vyšších lineárních průtokových rychlostech mobilní fáze, proto je rovněž

důležitá schopnost zvolené ionizační techniky zajistit vysokou citlivost i za těchto vyšších průtoků. Nejnovější vývoj v oblasti hmotnostně spektrometrické instrumentace spočívá ve změně v technologiích analyzátorů a v designu iontové optiky, která tak umožňuje lepší transmisi iontů a dosažení vyšší citlivosti a rychlosti měření, což je výhodné pro spojení ultra-vysokoúčinné chromatografie s hmotnostní spektrometrií na poli rychlých separací [13,46]. Toto tvrzení je doloženo prudkým nárůstem počtu publikací zabývajících se technikou UHPLC-MS (Obr. 4 A, C). Mezi nejčastěji využívané hmotnostní analyzátoři ve spojení UHPLC-MS patří jednoznačně trojitý kvadrupól (QqQ) a kombinace kvadrupólu s průletovým analyzátořem (Q-TOF) (Obr. 4 B) [13].



Obr. 4: **A)** Zobrazení počtu publikací využívajících techniku UHPLC-MS od roku 2004. **B)** Zobrazení počtu aplikací UHPLC-MS systémů na základě použitého typu MS analyzátoři. (převzato z cit. [13]) a **C)** Graf počtu publikací aktualizovaný o roky 2012 – 2017. (vyhledávání na Web of Science dle slov „(UPLC or UHPLC) and MS“ 6. 3. 2018)

2.3. Aplikace rychlých chromatografických separací

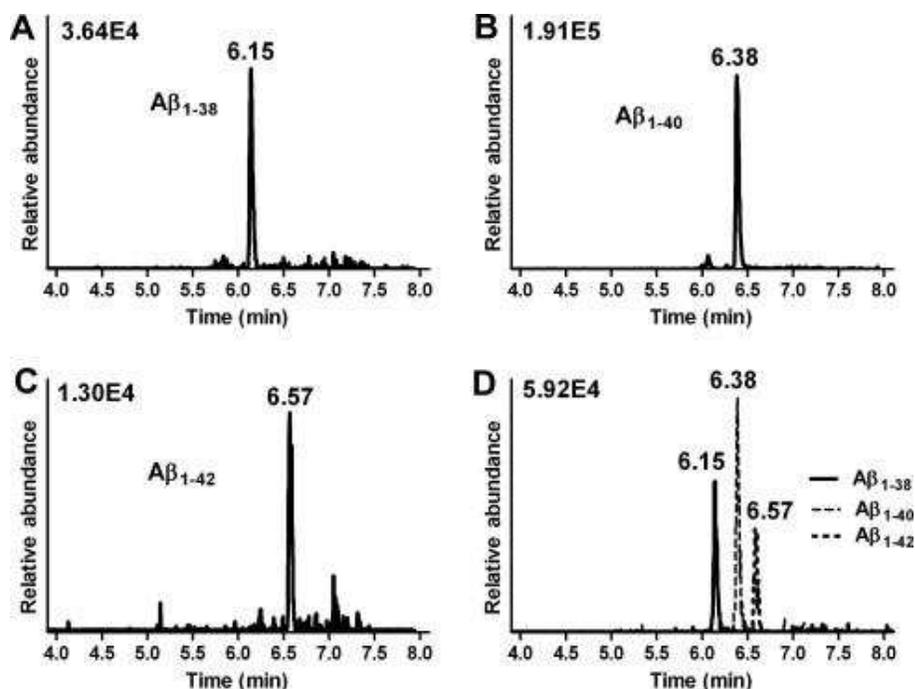
S rychlými chromatografickými separacemi se setkáváme v celé řadě odvětví, kde se využívají k identifikaci a kvantifikaci různých typů analytů. Tato kapitola pojednává o praktické aplikaci dvou technik ultra-vysokoúčinné chromatografické separace (UHPLC a UHPSFC) především z oblasti bioanalýzy, studia metabolismu léčiv, multi-reziduálního screeningu vzorků potravin a životního prostředí.

UHPLC-MS technika nachází uplatnění při cílené analýze léčiv v biologických matricích, jako je plazma, moč, sliny, tkáň, vlasy aj. Součástí tohoto typu vzorků je celá řada endogenních sloučenin, které mohou interferovat se sledovaným analytem a překrývat detekovaný signál. Proto je důležité minimalizovat matriční efekty a zlepšit analytické postupy již od přípravy vzorku, přes chromatografickou separaci, detekci a způsoby kvantifikace (např. použití standardů značených stabilními izotopy). V případě analýzy matričně složitých vzorků se proto jako nejvýhodnější kombinace jeví spojení UHPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií [13,47]. Tato kombinace technik byla využita při vývoji metody pro stanovení léčiva nifedipinu (blokátor vápníku, používaný při léčbě kardiovaskulárních poruch) v lidské plazmě u 30 dobrovolníků. Metoda s celkovým časem separace do 1,2 min. byla validována v širokém koncentračním rozmezí (0,05 – 150 ng/ml) a její reprodukovatelnost byla ověřena reanalýzou 116 vzorků [48].

V případě studia metabolismu léčiv rozlišujeme dva typy přístupů. Prvním je cílená analýza, kdy jsou sloučeniny/struktury metabolitů známy či předpokládány. Využívá se především při studiu stability, aktivity či při kvantifikaci metabolitů. Po chromatografické separaci se jako detekční technika nejčastěji volí trojitý kvadrupól pracující v režimu SRM (single reaction monitoring, sledování jedné/vybrané reakce). Druhý přístup se uplatňuje při identifikaci metabolitů a zkoumání metabolických cest léčiv. Jedná se o necílenou analýzu a využívá se hmotnostně spektrometrických systémů s vysokou rozlišovací schopností [13,47]. UHPLC-MS/MS nachází uplatnění ve farmakologii a farmakokinetice při tzv. ADME screeningu léčiv. Jedná se o monitoring absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece aktivní léčivé látky. UHPLC separace na koloně BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C18 s částicemi o velikosti 1,7 μm například umožnila zkrátit celkovou dobu analýzy o 80 % ve srovnání s klasickou HPLC separací [49].

Další oblastí, kde se s výhodou uplatňuje UHPLC, je multi-reziduální screening. V rámci tohoto screeningu je důležité najít rovnováhu mezi zvolenou extrakční technikou a zároveň dosažením co nejvyššího rozlišení tak, aby byl co nejlépe minimalizován vliv matrice. Do této kategorie spadá analýza početných a komplexních vzorků potravin, životního prostředí aj. Při těchto analýzách je rovněž podstatné snížit riziko falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Náročnost vývoje metody umožňující multi-reziduální screening vyplývá z nutnosti skloubit hned několik důležitých faktorů. Metoda musí umožňovat monitoring vysokého počtu sloučenin různých struktur nacházejících se v komplexní matici v nízkých koncentracích [13,47]. Jako příklad využití UHPLC-MS v oblasti multi-reziduálního screeningu lze uvést analýzu 23 perfluorovaných alkylových sloučenin v potravinách živočišného původu (mléko a ryby). Vyvinutá metoda zahrnuje prekoncentraci analytů disperzní extrakcí tuhou fází pomocí sorbentu C18 a ENVI-Carb, což umožnilo dosáhnout limitů kvantifikace perfluorovaných sloučenin v rozsahu 0,001 – 0,006 µg/kg pro mléko a 0,002 – 0,013 µg/kg pro ryby [50]. V případě analýzy mléka stojí také za zmínku screening 21 veterinárních léčiv metodou kombinující rychlou QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe) extrakci s UHPLC separací a QqQ detekcí s celkovým časem separace 3 minuty [51].

Hlavní výzvou v oblasti metabolomiky je pochopení principů fungování buněčných metabolických procesů. Sledované analyty jsou součástí komplexních biologických matic, jako jsou tkáně a tělní tekutiny. Přitom je nezbytné použít separační metodu s vysokým rozlišením a citlivostí, aby bylo možné detekovat a kvantifikovat i velmi nízké obsahy metabolitů, které si často bývají chemickou strukturou velmi podobné [13,47]. Příkladem využití UHPLC-MS v metabolomice je stanovení biomarkerů značících rozvoj Alzheimerovy choroby. Onemocnění je možné rozpoznat na základě množství amyloidních β-peptidů v mozkomíšním moku. Jejich izolace ze vzorku byla provedena SPE extrakcí (Oasis MCX) s následnou UHPLC separací na koloně BEH300 C18 (2,1 × 150 mm, 1,7 µm). Detekce byla provedena na základě sledování MRM (multi-reaction monitoring, sledování více reakcí) přechodů (Obr. 5) pomocí QqQ. Bylo dosaženo hodnot LOQ lepších než 0,1 ng/ml mozkomíšního moku [52].



Obr. 5: A – C) Chromatogramy pro MRM přechody jednotlivých amyloidních β -peptidů extrahovaných z mozkomíšního moku, D) standardy těchto látek značené izotopem ^{15}N . (převzato z cit. [52])

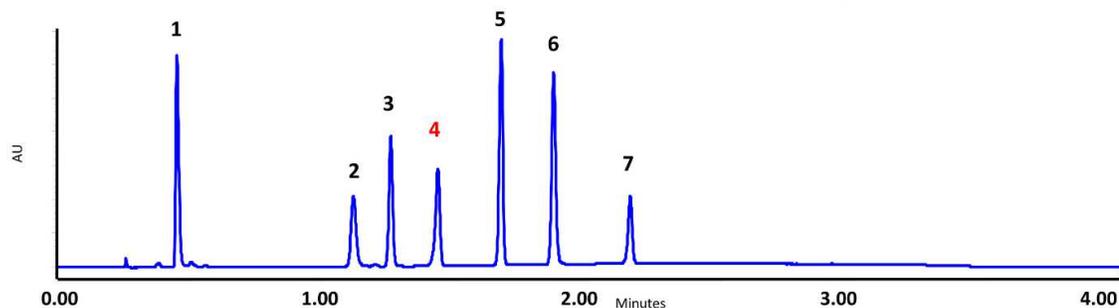
Kromě širokého uplatnění UHPLC v oblasti rychlých separací se stále častěji dostává do popředí technika UHPSFC. Ta je vhodná pro širokou škálu analytů a může sloužit jako alternativní nebo doplňková metoda k UHPLC. V řadě publikací jsou právě tyto dvě separační techniky srovnávány. Prostřednictvím UHPSFC byly analyzovány například směsi běžně užívaných léčiv [43], dopingové látky (anabolika, hormony, kanabinoidy, glukokortikoidy aj.) [1,2,7,53], nové syntetické drogy [54], izomery farmaceuticky zajímavých látek [5] a textilní barviva [55].

S narůstající sofistikovaností dopingových podvodů v profesionálním i amatérském sportu je nezbytné pracovat na vývoji nástrojů a metod umožňujících odhalit zneužívání zakázaných látek sportovci. V rámci antidopingových kontrol bývá sledována přítomnost nelegálních látek nebo jejich metabolitů v těle sportovce. Za jednu ze slibných metod odhalující přes sto dopingových látek v moči lze považovat UHPSFC-MS/MS metodu vyvinutou *L. Novákovou a kol.* Její výsledky byly porovnány s výsledky získanými konvenčním UHPLC-MS/MS systémem. Obě metody umožňují separaci během 7 minut včetně ekvilibrace. UHPLC-MS/MS prokázalo nižší limit detekce pro 21 % analytů, zatímco UHPSFC-MS/MS poskytovala

nižší limit detekce ve 32 %. Ve zbylých procentech testovaných dopingových látek se obě metody v limitech detekce významně nelišily. Tato studie prokázala, že UHPSFC-MS/MS je slibnou technikou při odhalování dopingových podvodů [1,2].

Aplikační možnosti UHPSFC-MS/MS metody byly prokázány rovněž při kontrole alergenních disperzních barviv přítomných v textilních výrobcích. Metoda založená na ultrazvukem asistované extrakci vzorku textilu umožňuje ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (QqQ) detekci až 17 barviv v čase kratším než 5 min. Pro dosažení optimální chromatografické separace byly testovány čtyři typy stacionárních fází, z nichž nejlepší separaci a citlivost detekce poskytla kolona BEH C18 [55].

UHPSFC nachází své uplatnění také v oblasti kontroly kvality farmaceutických produktů. Jako příklad lze uvést analýzu tablet agomelatinu, který patří do skupiny nových antidepresiv. Aktivní farmaceutická složka agomelatinu může být při výrobě doprovázena až šesti strukturně velice podobnými nečistotami, které ovšem mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Nejlepší chromatografická separace s úplným rozlišením byla dosažena na stacionární fázi BEH 2-EP při použití CO₂ s gradientem organického modifikátoru (methanolu) od 5 do 30 % s přídavkem 20 mM mravenčanu amonného a 5 % vody (Obr. 6). Látky byly detekovány PDA detektorem při 225 nm [6].



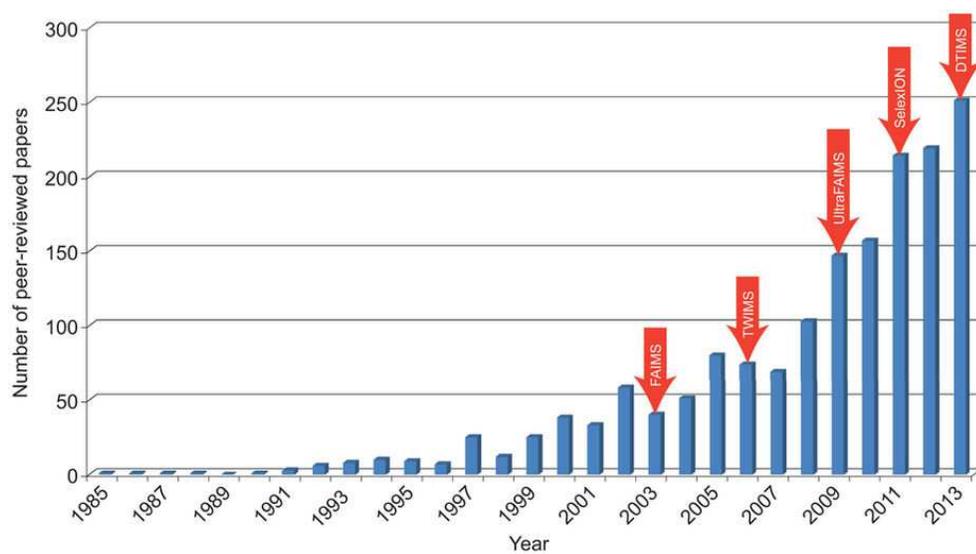
Obr. 6: Separace aktivní farmaceutické složky agomelatinu a šesti strukturně podobných nečistot. **1.** 2-(7-methoxynaftalen-1-yl)acetonitril, **2.** N,N-bis[2-(7-methoxynaftalen-1-yl)-ethyl]acetamid, **3.** 2-(7-methoxynaftalen-1-yl)acetamid, **4. agomelatin (API)**, **5.** 2-(7-methoxynaftalen-1-yl) kyseliny octové, **6.** bis[2-(7-methoxynaftalen-1-yl)-ethyl]amin, **7.** (2-(7-methoxynaftalen-1-yl)ethan-1-amin hydrochlorid. (převzato z cit. [6])

Kromě výše zmíněných aplikací existuje celá řada dalších studií zabývajících se využitím obou ultra-vysokoučinných chromatografických technik. Z těchto studií vyplývá, že rychlé separace budou stále častěji vytěsňovat klasické časově náročnější techniky/metody, což může v konečném důsledku vést ke snížení provozních nákladů, popř. k omezení vlivu na životní prostředí díky menší spotřebě rozpouštědel.

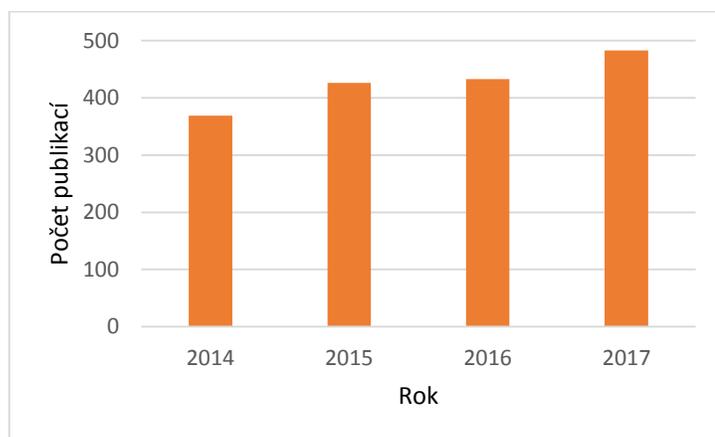
2.4. Separace iontovou mobilitou a iontovou mobilitou s hmotnostní spektrometrií

Na zcela odlišném principu rychlé separace funguje iontově mobilitní spektrometrie (IMS). Jedná se o techniku, která umožňuje separaci již ionizovaných látek během několika milisekund. Její princip je založen na separaci iontů v plynné fázi na základě jejich rozdílné pohyblivosti. Pohyb těchto iontů je ovlivňován elektrickým polem vkládaným na mobilitní celu a také srážkami s driftovým (tlumícím) plynem přítomným v cele. Rychlost pohybu iontů je rovněž dána jejich hmotností, nábojem, velikostí a tvarem, přičemž vlastnosti iontu analytu a driftového plynu určují tzv. účinný srážkový průřez iontu [56-58]. Instrumentace pro analytickou iontově mobilitní spektrometrii byla prvně představena pod názvem *plasmová chromatografie* nebo *plynová elektroforéza* [59]. Tato nová technika byla následně rozvíjena především ve spojení s hmotnostní spektrometrií. V roce 1962 bylo poprvé popsáno spojení těchto dvou tak blízkých technik iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IM-MS) [12,58]. Jak lze vidět na Obr. 7, tak přibližně od roku 2000 dochází k významnému využití této techniky v oblasti výzkumu, což dokládá nárůst v počtu recenzovaných publikací [58].

A)



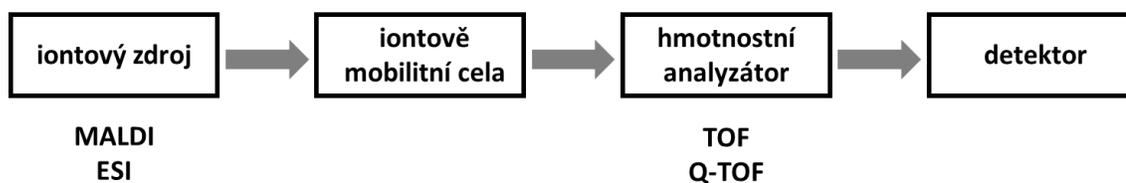
B)



Obr. 7: A) Graf zobrazující vývoj v počtu publikací související s technikou IM-MS během posledních 30 let. Šipky ukazují roky, kdy byly uvedeny na trh komerční přístroje. (převzato z cit. [58]) B) Graf počtu publikací aktualizovaný o roky 2014 – 2017. (vyhledávání na Web of Science dle slov „ion mobility and mass spectrometry“ 6. 3. 2018)

Iontově mobilní spektrometr se skládá ze tří základních částí (*iontový zdroj, iontově mobilní cela a detektor*). V případě spojení s hmotnostním spektrometrem je mezi iontově mobilní celou a detektorem zařazen *hmotnostní analyzátor*. Jako iontový zdroj pro IM-MS bývá voleno MALDI (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onization, ionizace a desorpce laserem za účasti matrice) nebo ESI (electrospray, elektrosprej). Následuje mobilní cela, ve které ionty migrují vlivem elektrického pole. Další částí je hmotnostní analyzátor. Obvykle se jedná o TOF

nebo Q-TOF, což jsou analyzátoři s vysokou rychlostí měření. Poslední částí je detektor iontů (Obr. 8) [60,61].



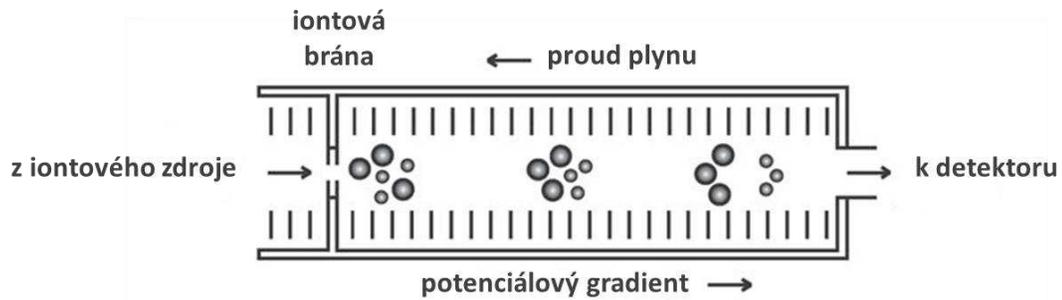
Obr. 8: Schéma IM-MS.

Ve spojení IM-MS jsou využívány především čtyři typy iontově mobilních spektrometrů – iontově mobilní spektrometrie v driftové trubici (*DTIMS*), s pohybující se vlnou (*TWIMS*), s vysokonapěťovou asymetrickou vlnou (*FAIMS*) a se zachycením iontů (*TIMS*) [12,57,58,60-65]. Jednotlivé principy iontově mobilních cel jsou uvedeny v kapitole 2.4.1., kde je rovněž pojednáváno o jejich výhodách a nevýhodách (Tab. I).

2.4.1. Iontově mobilní cely

- Iontově mobilní spektrometrie v driftové trubici

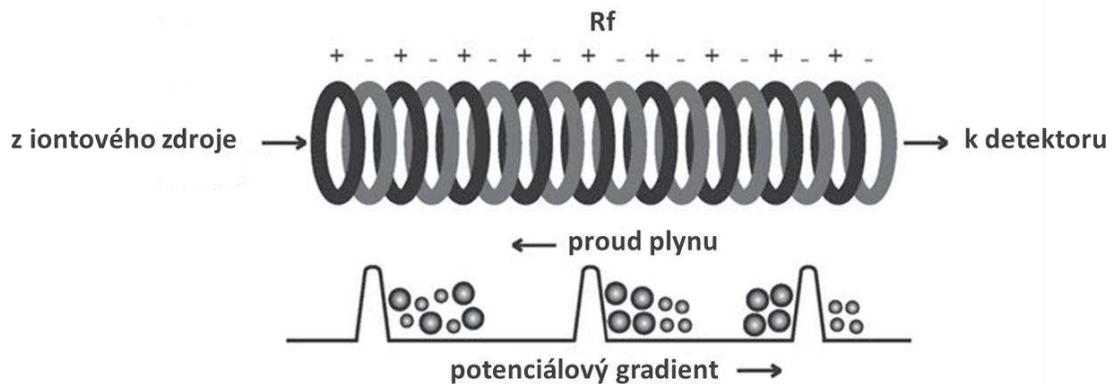
Jedná se o nejstarší a zároveň koncepčně nejjednodušší iontově mobilní analyzátor. Ionty jsou přivedeny do driftové trubice, kde putují působením slabého elektrického pole (5 – 100 V) za přítomnosti inertního plynu (nejčastěji se jedná o helium) s protisměrným prouděním. K separaci iontů dochází na základě rozdílných iontových mobilit. Menší a kompaktnější ionty se méně často srážejí s inertním plynem, jsou méně zpomalovány a jejich driftové časy jsou kratší ve srovnání s většími ionty (Obr. 9) [58,60-62]. Doba potřebná k průletu iontu driftovou trubicí (driftový čas) se vztahuje k jeho rotačně průměrované průřezové ploše tj. účinnému srážkovému průřezu (CCS , Ω). Při použití tohoto typu mobilní cely jsou hodnoty CCS měřeny a vypočítávány přímo viz kap. 2.4.2. (str. 20).



Obr. 9: Princip iontově mobilní spektrometrie v driftové trubici. (převzato z cit. [62] a upraveno)

- Iontově mobilní spektrometrie s pohybující se vlnou

Druhý typ mobilní cely je tvořen sérií kruhových elektrod, kdy se na každou z těchto elektrod vkládá stejnosměrné napětí, čímž je vytvářena kontinuální symetrická potenciálová vlna. Na sousední elektrody se aplikuje radiofrekvenční napětí opačných fází, které fokusuje ionty. Cela je naplněna inertním plynem s protisměrným pohybem. Ionty s vyšší mobilitou jsou unášeny vlnou rychleji, zatímco ionty s nižší mobilitou se převalují přes vlnu a putují tak pomaleji (Obr. 10) [58,60-62].



Obr. 10: Princip iontově mobilní spektrometrie s pohybující se vlnou. (převzato z cit. [62] a upraveno)

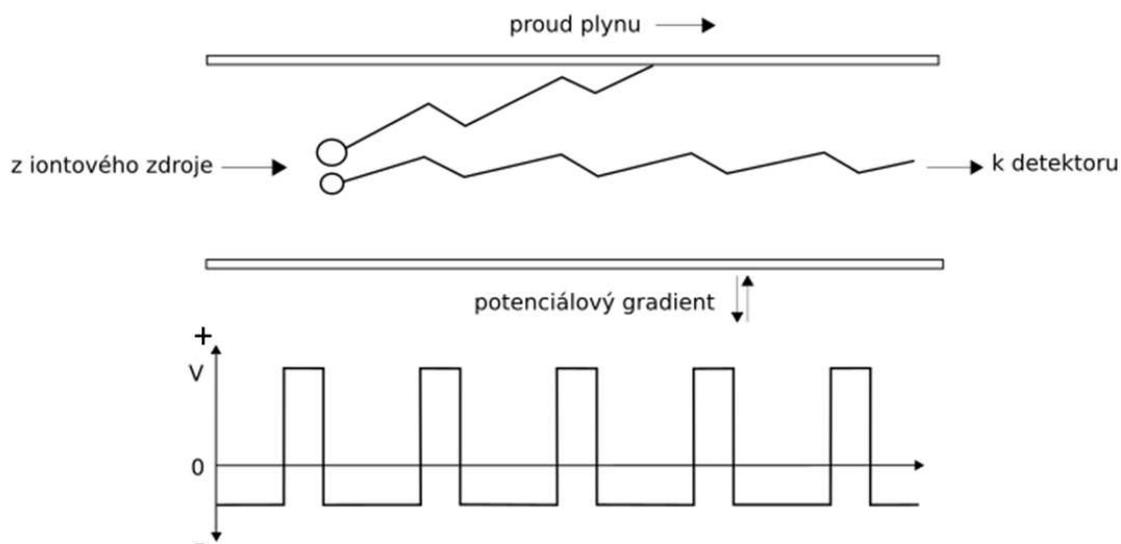
Hodnoty účinného srážkového průřezu s využitím tohoto typu iontově mobilní cely nelze měřit přímo z důvodu komplikovaného působení elektrického pole na ionty. Účinný

srážkový průřez lze získat pomocí kalibrace na standardy, jejichž hodnoty CCS jsou známy z měření v driftové trubici (DTIMS).

- Iontově mobilitní spektrometrie s vysokonapětovou asymetrickou vlnou

Další uvedené zařízení (Obr. 11) je zkonstruováno ze dvou elektrod, na které se vkládají napětové pulzy. Ionty jsou zaváděny do mobilitní cely kolmo k elektrickému poli a rovnoběžně s prouděním driftového plynu. Disperze iontů je určována střídavým asymetrickým tvarem napětových pulzů. Kladný vysokonapětový pulz je vkládán po kratší dobu oproti nízkonapětovému negativnímu pulzu. Aplikací jen těchto pulzů by docházelo k vychýlení iontů k jedné ze dvou elektrod a nakonec ke kontaktu iontů s elektrodou a jejich neutralizaci. Z tohoto důvodu je nutné trajektorii pohybu iontů upravit vložení kompenzačního napětí, kdy při jeho určité hodnotě na detektor prochází pouze určité ionty. Skenováním tohoto napětí lze získat celé iontově mobilitní spektrum.

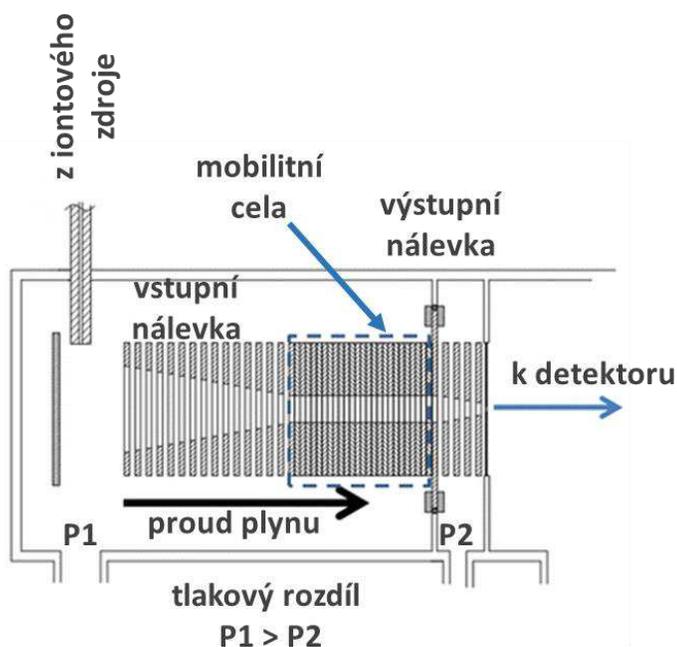
Tento typ iontově mobilitní cely se primárně využívá k odstranění nežádoucího pozadí v analyzovaném vzorku a k separaci analytů. Nelze ji využít k určování účinného srážkového průřezu (CCS), jelikož se aplikují vysoké hodnoty elektrického pole, což neumožňuje přímou korelaci mezi driftovým časem a strukturou analytu [58,60-62].



Obr. 11: Princip iontově mobilitní spektrometrie vysokonapětovou asymetrickou vlnou. (převzato z cit. [62] a upraveno)

- Iontově mobilitní spektrometrie se zachycením iontů

V pořadí čtvrtý uvedený iontově mobilitní spektrometr využívá elektrické pole s axiálním gradientem k udržení iontů ve stacionární pozici (nehybně) oproti pohybujícímu se driftovému plynu. Síla elektrická je v rovnováze s působením proudu plynu a ionty se po dosažení rovnováhy sil ve směru podélné osy nepohybují, jsou zafokusuovány a separovány na základě poměru velikosti k náboji. Aplikované radiofrekvenční napětí ionty fokusuje v radiálním směru. Separované ionty jsou následně za snižování intenzity elektrického pole (snižování elektrické síly na ně působící) eluovány driftovým plynem, který je unáší směrem k hmotnostnímu analyzátoru/detektoru (Obr. 12). Ionty s větším poměrem velikosti k náboji vstupují do detektoru dříve oproti iontům s menším poměrem [63-66].



Obr. 12: Princip iontově mobilitní spektrometrie se zachycením iontů. (převzato z cit. [64] a upraveno)

Tab. I. Srovnání výhod a nevýhod čtyř typů iontově mobilních cel [58,63-65].

	Výhody	Nevýhody
<i>DTIMS</i>	<p>Přímé stanovení CCS (Ω) z Mason-Schampovy rovnice.</p> <p>Oddělení iontů s velice podobnou mobilitou – vysoká rozlišovací schopnost (>100, def. $\Omega/\Delta\Omega$ měřeno FWHM[*]).</p>	<p>Geometrické uspořádání nynějších komerčních přístrojů dovoluje zařazení mobilní cely pouze hned za ionizaci.</p> <p>Pokud se iontově mobilní separace provádí za atmosférického tlaku, dochází ke ztrátám iontů při jejich přenosu do vakuovaného hmotnostního prostoru.</p>
<i>TWIMS</i>	<p>CCS (Ω) mohou být určeny pomocí kalibrace.</p> <p>Může být využito při mobilní separaci fragmentových iontů generovaných např. kolizí indukovanou disociací.</p>	<p>Nutnost provedení kalibrace při určování CCS (Ω).</p> <p>Relativně nízká rozlišovací schopnost (≤ 45, def. $\Omega/\Delta\Omega$ měřeno FWHM[*]).</p> <p>Může docházet ke zvyšování vnitřní energie iontů v TWIMS cele a jejich fragmentaci.</p>
<i>FAIMS</i>	<p>Vysoká rozlišovací schopnost (≤ 100, měřeno FWHM[*]).</p> <p>Relativně jednoduchá instalace iontové mobility na různé typy hmotnostních spektrometrů.</p>	<p>CCS (Ω) nelze určit.</p> <p>Geometrická konfigurace přístrojů umožňuje zařazení mobilní cely pouze hned za ionizaci.</p> <p>Snížení citlivosti v důsledku horšího pracovního cyklu při vložení kompenzačního napětí.</p>
<i>TIMS</i>	<p>Zařízení je kompatibilní a snadno propojitelné s MS.</p> <p>Lze dosáhnout rozlišovací schopnosti >100.</p> <p>Možnost dosažení vyšší citlivosti díky lepšímu přenosu iontů.</p>	<p>Pro určování CCS (Ω) nutná kalibrace.</p> <p>Při současném technickém řešení je mobilní cely předřazena před kolizní celou, nelze provádět mobilní separaci fragmentových iontů.</p>

* FWHM – full width at half of maximum, šířka píku v polovině výšky

2.4.2. Účinný srážkový průřez (Collision Cross Section, CCS, Ω)

Účinný srážkový průřez je mírou interakce iontu s neutrálními molekulami driftového plynu. Souvisí s chemickou strukturou, tvarem a velikostí iontů, ale také s použitým typem driftového plynu. Hodnoty CCS jsou úměrné velikosti molekuly driftového plynu. Přímé určování účinného srážkového průřezu je možné jen v případě použití iontově mobilní cely *DTIMS*, kdy se driftové časy měřené při dané teplotě (T) a tlaku převádějí na CCS řešením Mason-Schampovy rovnice (1) bez nutnosti použití standardu. Přímé měření lze aplikovat jen na malé molekuly. U velkých molekul (např. proteiny) může docházet ke změnám hodnot CCS v závislosti na teplotě. V případě iontově mobilní cely *TWIMS* se měření účinného srážkového průřezu pro analyt provádí pomocí kalibrantu, jehož hodnoty CCS jsou v daném driftovém plynu známy. Experimentální hodnoty účinného srážkového průřezu lze srovnat s teoretickými hodnotami vypočtenými např. v programu MOBCAL pomocí molekulárně dynamických simulací [58,67].

$$\Omega = \frac{3ze}{16N} \cdot \left(\frac{2\pi}{\mu k_B T} \right)^{1/2} \cdot \frac{1}{K_0} \quad (1)$$

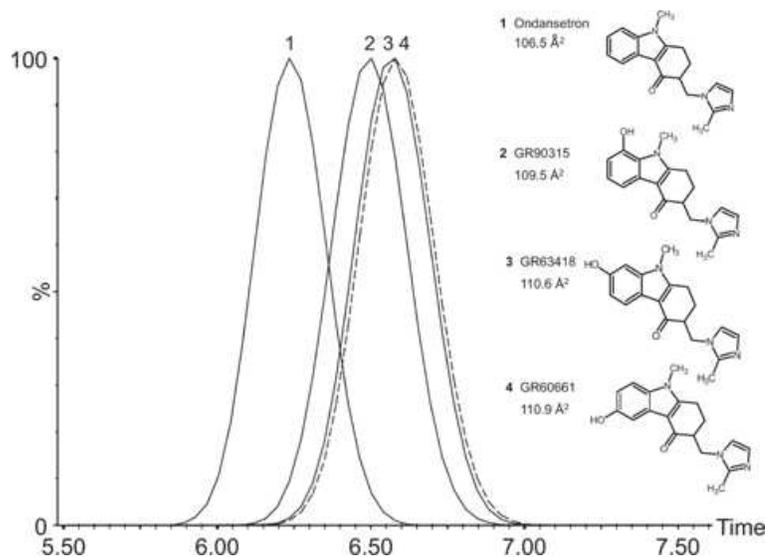
kde K_0 – redukovaná mobilita (hodnota pro standardní tlak a teplotu), z – počet elementárních nábojů iontu, e – náboj elektronu, N – počet částic driftového plynu v jednotkovém objemu, k_B – Boltzmanova konstanta, T – absolutní teplota plynu, μ – redukovaná hmotnost páru ion-driftový plyn [58].

2.5. Aplikace iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Iontová mobilita se využívá samostatně v řadě aplikací např. při bezpečnostních kontrolách na letištích, při ověřování čistících procedur ve farmaceutické výrobě a analýze farmaceuticky aktivních látek, při analýze pesticidů a veterinárních léčiv [68-73]. S uvedením komerčních řešení IM-MS se otevřely další zajímavé aplikační možnosti. Mezi hlavní přínosy tohoto spojení patří: potlačení chemického šumu, separace iontů do tříd, separace izomerů a izobarických látek, zlepšování identifikace látek (pomocí charakteristiky účinného srážkového průřezu).

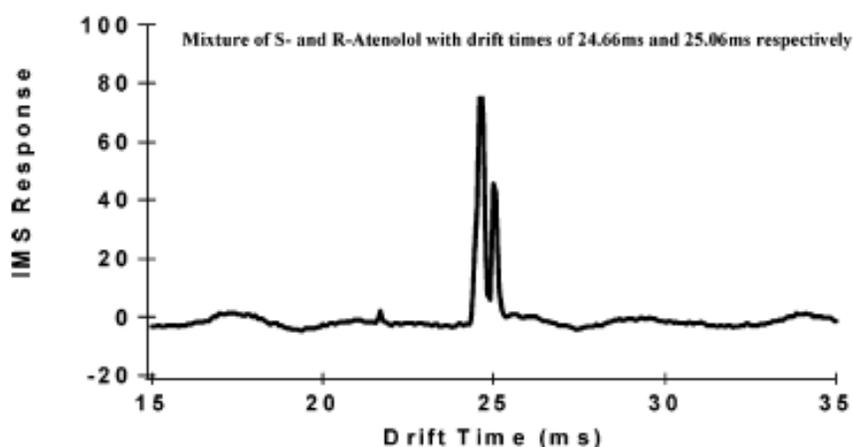
Jednou z oblastí kde lze IM-MS aplikovat je studium léčiv a jejich metabolitů [74,75]. Jedná se o součást vývoje nových léčiv a pochopení principů fungování léčiva, jelikož

v organismu může docházet ke vzniku metabolitů s toxickým účinkem. Tyto metabolity se v biologických vzorcích nacházejí v příliš nízkých koncentracích, než aby bylo možné pro charakterizaci jejich struktury použít NMR spektroskopii. Slibnou technikou s nízkými limity detekce vhodnými pro analýzu metabolitů je LC-MS/MS. Problematická může být identifikace izomerních látek poskytujících identická tandemová hmotnostní spektra, pokud nedisponujeme příslušnými referenčními standardy k určení retenčních časů izomerů [58]. Touto problematikou se zabýval *Dear a kol.* (2010), kteří využili spojení LC-IM-MS k charakterizaci modelové směsi hydroxylovaných metabolitů ondansetronu. Technikou TWIMS-MS od sebe úspěšně rozlišili ondansetron a tři jeho polohové izomery (6-, 7-, 8-(OH)) (Obr. 13). Autoři rovněž prostřednictvím softwaru MOBCAL vypočítali teoretické hodnoty CCS, které následně porovnali s experimentálními hodnotami CCS získanými z měření TWIMS-MS. Hodnoty CCS získané oběma způsoby se lišily o méně než 1 \AA^2 , což lze využít při přiřazení konkrétní struktury určitému mobilitnímu píku a tedy při identifikaci jednotlivých izomerů. I když by v tomto případě iontová mobilita neposkytla dostatečnou separaci izomerů ve směsi, IM-MS se může stát účinným nástrojem při strukturní charakterizaci metabolitů [74]. To bylo následně potvrzeno i studií zabývajících se polohovými izomery metabolitů léčiv publikované v roce 2011 [75].



Obr. 13: Mobilogramy ondansetronu a jeho 6-, 7- a 8-hydroxyl metabolitů. (převzato z cit. [74])

Taktéž problematiku separací chirálních látek je možné řešit prostřednictvím IM-MS [76-78]. *Dwiedi a kol.* představili metodu chirální iontově mobilní spektrometrie (CIMS) pro separaci enantiomerů léčiv, aminokyselin a cukrů. Tato technika je podobná tradiční IMS s tím rozdílem, že součástí driftového plynu je také těkavé chirální činidlo, v tomto případě se jednalo o (S)-(+)-2-butanol. Separace iontů je pak založena na jejich stereospecifické interakci s tímto chirálním činidlem. Tato metoda byla úspěšně testována na schopnosti separovat enantiomery, jak je doloženo např. separací racemické směsi atenololu (Obr. 14) [76]. Ne každé technické řešení IMS dovoluje přidávat do driftového plynu takovéto činidlo. Například u TWIMS by mohlo docházet k jeho kondenzaci v přístroji.



Obr. 14: Mobilogram racemické směsi atenololu v driftovém plynu N₂ s obsahem 10 ppm chirálního činidla (S)-(+)-2-butanolu. (převzato z cit. [76])

Velmi perspektivní oblastí, ve které se začíná uplatňovat technika IM-MS, je zobrazování (imaging) tkání. Profilování a zobrazování tkání umožňuje přímou analýzu a lokalizaci biomolekul (bílkovin, peptidů a lipidů), zatímco je udržena celistvost tkání. Zobrazování povrchů probíhá s žádnou nebo minimální úpravou vzorků. Ve spojení s IM-MS dochází k významnému zvýšení selektivity a potlačení vlivu biologické matrice na hodnotu poměru signál/šum a také k separaci izobarických interferujících molekul. *Jackson a kol.* využili spojení MALDI-IM-MS za účelem mapování distribuce lipidů v mozkové tkáni krys. Lipidy představují významné biomolekuly nacházející se v mozku. Hlavními detekovanými biomolekulami byly v tomto případě fosfolipidy, konkrétně fosfatidylcholin a sfingomyelin [79].

Další potenciální oblastí pro využití IM-MS je monitoring průběhu reakcí v reálném čase. Kontrola reakcí v reálném čase je důležitou součástí procesu výroby chemikálií a léčiv. Je to způsob, jak při výrobě zajistit jejich požadovanou čistotu a kvalitu. Kromě standardně využívaných technik jako LC, IČ, MS, NMR je žádoucí mít k dispozici i nové techniky poskytující v kratších časech kvantitativní a strukturní informace o reakčních meziproduktech a produktech, což dovoluje flexibilně ovlivňovat průběh probíhající reakce. *Harry a kol.* ověřili možnost použití IM-MS pro monitorování průběhu reakce na pokusu založeném na deprotonizaci 7-fluor-6-hydroxy-2-methylindolu hydroxidem sodným. Autoři současně porovnávali data získaná z IM-MS s daty naměřenými samotnou hmotnostní spektrometrií. Výsledky obou metod jsou srovnatelné, avšak iontová mobilita přináší možnost jak dosáhnout větší selektivity a může přispět i k řešení problémů strukturní analýzy [80].

Rozšiřující se využívání IM-MS ve vědecké sféře, biotechnologiích a farmacii klade vyšší nároky na vývoj a zdokonalení odpovídající instrumentace. V literatuře lze nalézt řadu dalších příkladů, které dokládají přínos iontové mobility v oblasti zlepšování chemického šumu, strukturní analýzy, zvýšení selektivity měření. Tak jak se bude IM-MS stávat komerčně dostupnější, tak i výhody tohoto post-ionizačního separačního kroku budou využívány nejen ve výzkumu, ale i při běžných laboratorních a průmyslových aplikacích.

2.6. Postupy pro odlišení nedostatečně separovaných mobilních píků

V předchozí kapitole bylo spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií představeno jako slibná analytická technika, která přináší nové možnosti separace a kvantifikace řady izomerních a izobarických sloučenin. Iontová mobilita s technologií TWIMS nebo DTIMS disponuje rozlišovací schopností v rozsahu desítek až stovky, což nemusí být v mnoha případech dostatečné. Pro srovnání v hmotnostní spektrometrii je dosahováno rozlišovací schopnosti v řádu desítek tisíc až miliónů. V IMS lze separace zlepšit použitím vyššího tlaku driftového plynu nebo přímou náhradou dusíku jakožto driftového plynu například argonem nebo oxidem uhličitým [81]. Ani tyto úpravy experimentálních podmínek však nemusí vést k požadovanému zlepšení separace.

Nedokonale separované analyty mohou být odlišeny za použití chemometrických metod. Tyto metody jsou obecně založeny na vyhledávání určitého počtu složek ve směsi s následným

extrahováním jejich mobilogramů z experimentálních dat. Jedna z využívaných metod se nazývá SIMPLISMA (Simple-to-use Interactive Self-modelling Mixture Analysis). SIMPLISMA je algoritmus, který je schopen dekonvolovat soubor dat do nezávislých komponent [82]. Metoda vyvinutá Windigem a Guilmentem [83] může být aplikována právě na iontově mobilní data. Jedna ze studií použila metodu SIMPLISMA pro detekci klastrových iontů generovaných ze směsi par pentan-1-olu a oktan-1-olu. Tento přístup vyžadoval sadu dat se dvěma nezávislými proměnnými např. driftovým časem a koncentrací. Během sběru dat byla koncentrace měněna za pomoci programované teploty odpařování vzorku [84]. Zpracování dat metodou SIMPLISMA bylo mimo jiné aplikováno i při identifikaci výbušnin [85]. Další možností jak řešit problematiku překrývajících se píků v mobilogramu nabízí metoda XFIDTD (Extracted Fragment Ion Drift Time Distributions, extrakce signálu fragmentových iontů v závislosti na driftovém čase). Látky jsou odlišeny na základě jejich jedinečných fragmentových iontů. Tento postup byl použit např. při analýze izomerů fosforylovaných peptidů, extraktů z nafty a izomerů glykanů manózy [86,87]. U zmíněných metod není nezbytné znát předem počet analytů, ale jejich signály se musí lišit pro některé kombinace nezávislých experimentálních proměnných jako driftový čas-koncentrace nebo driftový čas-hmotnostní spektrum. K selhání při zpracování dat může dojít například v případě špatně oddělených izomerů s identickým nebo velmi podobným hmotnostním spektrem.

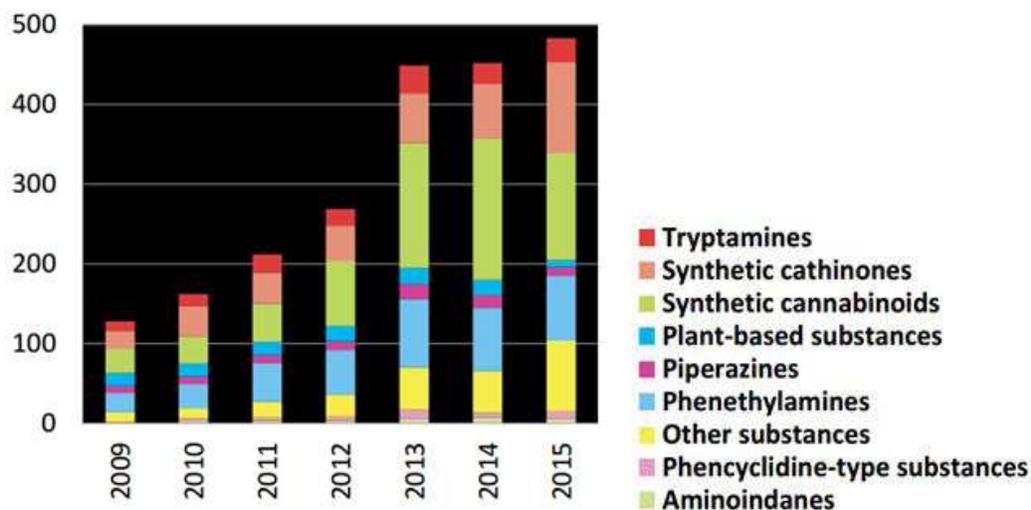
Princip dekonvoluce se také často aplikuje na komplexní chromatografické signály, u kterých dochází k částečné koeluci z důvodu nedostatečného rozlišení. Počet koeluovaných látek je možné určit na základě první nebo druhé derivace. Chromatografická data jsou následně vyhlazena a popsána kombinací jednotlivých chromatografických píků, které reprezentují konkrétní analyty [88]. Tvary těchto píků je možné predikovat pomocí chromatogramů z analýz standardů daných látek. Při navrhování jejich tvaru se předpokládá, že pík může být symetrický, frontující nebo chvostující, avšak s jedním maximem a dvěma inflexními body. Tento předpoklad nebývá v některých případech splněn u iontově mobilních dat. Profil mobilních dat jednoho analytu může mít více než jedno maximum nebo více než dva inflexní body, což by mohlo být mylně interpretováno jako důsledek přítomnosti většího počtu látek. [89]. Příčinou může být vliv prostorového náboje nebo přítomnost konformerů nebo protomerů (proton může být lokalizován na různých místech ve struktuře iontu). V důsledku toho může běžná dekonvoluce mobilogramu detekovat více než jeden pík pro jeden analyt. Může také dojít

k situaci, že část signálu jednoho analytu je přiřazena látce druhé a tím je chybně stanoven poměr analytů. Příkladem je analýza překrývajících se izomerních oligosacharidů [89]. ATD (arrival time distribution) profil jednoho analytu byl fitován Gausovskými funkcemi s cílem zpřesnit odečet driftového času a tím i určení CCS konformerů jednoho analytu. Postup byl demonstrován na crown-etherových komplexech a peptidech [90], nesloužil však k odlišení signálů různých analytů.

Technika iontové mobility poskytuje velmi stabilní hodnoty driftového času, které nejsou ovlivněny maticí vzorku. Dobrá opakovatelnost driftového času a tvarů ATD profilů umožňuje popsání těchto profilů superpozicí Gausovských funkcí. Každá vytvořená ATD funkce odpovídá jednomu analytu a může se skládat z jednoho nebo více Gausovských funkcí. Tento přístup umožňující řešit problematiku integrace překrývajících se asymetrických píků byl aplikován při analýze izomerů oligosacharidů kyseliny hyaluronové [91]. Podrobné řešení této problematiky je jedním z cílů disertační práce a je součástí experimentální části a výsledků.

2.7. Nové psychoaktivní látky a jejich analýza

Nové psychoaktivní látky (NPS) nazývané rovněž jako „nové syntetické drogy“ tvoří širokou skupinu zneužívaných látek. Tyto látky se získávají pozměněním chemické struktury zakázaných drog, jako jsou katinony, kanabinoidy, benzodiazepiny, fenylethylaminy apod., nebo syntézou látek s odlišnou strukturou, ale působící na stejné receptory jako klasické drogy. Mají obdobné účinky jako zakázané návykové drogy, avšak mohou být na trh uváděny jako jejich legální náhrada, protože nejsou legislativním procesem dostatečně rychle zařazeny na seznam zakázaných látek. Často jsou dostupné nejen na nezákonném („černém“) trhu, ale dokonce i volně na internetu a v obchodech typu „Amsterdam shop“. Významnější nárůst ve zneužívání NPS byl zaznamenán v roce 2009 (Obr. 15) a od tohoto roku se počet nově uvedených psychoaktivních látek neustále zvyšuje [92,93]. Pouze v Evropě jich bylo během let 2014 – 2016 nově detekováno celkem 265 [94]. Podle poslední dostupné statistiky byly v roce 2015 syntetické katinony nejčastěji zadrženou skupinou látek v rámci NPS a to v množství čítající celou jednu třetinu všech zabavených drog v uvedeném roce (přes 1.8 tuny) [94].



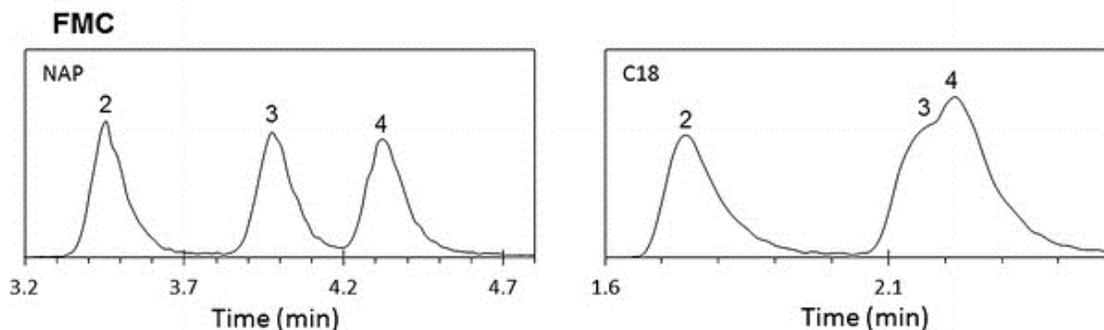
Obr. 15: Grafické zobrazení počtu NPS ohlášených UNODC systémem včasného varování. (převzato z cit. [93])

Nebezpečnost NPS spočívá v neznalosti jejich fyziologických účinků, čímž představují velmi vážné riziko pro lidské zdraví [95-97]. Rutinní postupy používané v toxikologických laboratořích byly vyvinuty pro identifikaci klasických zneužívaných drog, a proto mohou v případě identifikace NPS selhávat. Vývoj nových metod a postupů umožňujících jejich rychlé odhalení je zásadní pro zlepšení v oblasti diagnózy intoxikace nebo identifikace těchto neznámých látek.

Pro screening NPS v zadržených vzorcích a biologických materiálech byla popsána řada metod, nejčastěji založených na principu plynové a kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí [92,98-101]. Separace a identifikace těchto látek pomocí GC-MS vyžaduje přečištění vzorku, extrakci a často také derivatizaci polárních analytů (silylace, acetylace, methylyace). V případě použití elektronové ionizace poskytují tyto látky často jednoduchá hmotnostní spektra bez přítomnosti molekulového iontu, což nemusí postačovat k jejich identifikaci. Navíc se může jednat o nové analogy, jejichž hmotnostní spektra nejsou součástí databáze. Identifikaci může napomocet využití chemické ionizace, poskytující informaci o molekulové hmotnosti [98]. S komplikacemi se lze setkat například při použití GC-MS u analýzy fluormethkatinonů a fluoramfetaminů. Izomery fluormethkatinonů se vyznačují rozdílnou tepelnou stabilitou, kterou však lze řešit jejich acetylací. Ovšem ani po zařazení tohoto derivatizačního kroku nedochází ke zlepšení separace a jednotlivé izomery bývají odlišeny jen částečně (~ 0,2 min). Rovněž interpretace hmotnostních spekter izomerů fluormethkatinonů i

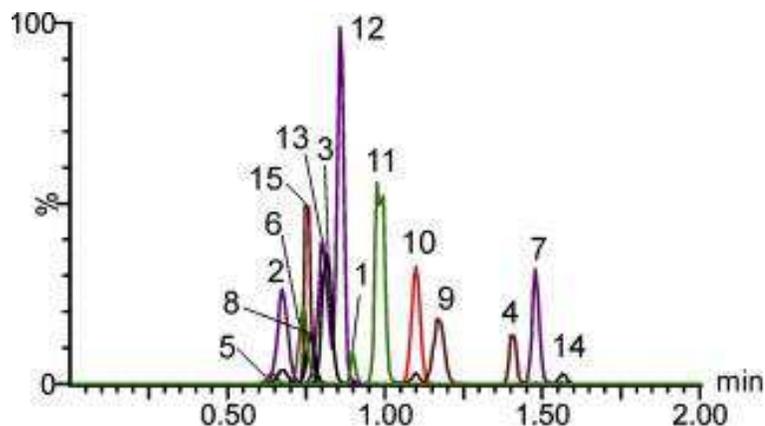
fluoramfetaminů bývá obtížná a to z důvodu velké podobnosti spekter jednotlivých izomerů [102]. Určitých úspěchů bylo dosaženo při separaci izomerů N-alkylovaných kationů (ethylmethkationů a dimethylmethkationů) pomocí GC-EI-MS/MS. Strukturní izomery byly v tomto případě odlišeny na základě různé intenzity produktových iontů [103]. Jako nadějně se jeví spojení plynové chromatografie s vakuovou ultrafialovou spektroskopií (GC-VUV). Pomocí VUV absorpčních spekter je možné rozlišit řadu izomerů, včetně 3-fluormethkationu od 4-fluormethkationu, což bylo potvrzeno studií zabývající se analýzou 43 syntetických drog. Technika VUV poskytuje unikátní UV spektra, která v kombinaci s retenčními daty umožňují odlišit polohové izomery, avšak limity detekce této techniky v současné době nedosahují hodnot pro GC-MS [104]. Omezením v případě plynové chromatografie může být termální nestabilita některých NPS v nástřikovém prostoru a riziko strukturních změn těchto analytů za zvýšené teploty. Proto se pro tyto látky nabízí využití jiné chromatografické techniky, např. UHPLC, u které je eliminováno riziko termální degradace.

Existuje několik studií popisujících analýzu nových psychoaktivních látek pomocí UHPLC s UV případně ESI-MS detekcí. Jedná se o rychlou separační techniku, která ve většině případů analýz NPS nevyžaduje časově náročnou derivatizaci. Použitím měkké ionizační techniky elektrospreje je možné získat informaci o molekulové hmotnosti. *Li a kol.* ve studii zabývající se screeningem methylovaných a fluorovaných fenylethylaminů a kationů využili výhodnost spojení UHPLC s UV a MS detektory. Přestože kombinace účinné separace a dvojí detekce představuje velice efektivní analytickou techniku, tak v případě rozlišení polohových izomerů kationů nedostačovala. Zatímco izomery se substitucí v *ortho*-poloze se podařilo vždy rozlišit, izomery lišící se v *meta*- a *para*- poloze byly odseparovány pouze částečně [99]. Další studie zabývající se problematikou rozlišení izomerů NPS byla provedena *Takedou a kol.*, kteří při separaci izomerů testovali jak klasickou C18 kolonu, tak také kolonu s naftylethyl stacionární fází (NAP) (Obr. 16). Druhá z uvedených kolon umožnila úspěšně odseparovat izomery uplatněním π - π interakcí mezi stacionární fází a analytem. Tento typ stacionární fáze se nabízí jako vhodný pro izomerní separaci různě substituovaných kationů a fenylethylaminů [105].



Obr. 16: Separace polohových izomerů 2-, 3-, 4-FMC na koloně NAP a C18. (převzato z cit. [105])

Další technikou s potenciálem rychle a účinně separovat psychoaktivní látky s podobnou či izomerní strukturou je UHPSFC. Tato technika byla použita pro separaci polárních syntetických kationů a silně bazických fenylethylaminů. Skupina 15 látek zahrnující rovněž 4 izomerní páry byla úspěšně separována na silikagelové koloně BEH v čase kratším než 3 minuty s rozlišením $R > 1$. Současným zvýšením průtoku a změnou strmosti gradientu mobilní fáze lze analýzu zkrátit až na 1,61 min tak, aby izomerní páry byly stále dostatečně rozlišeny (Obr. 17) [54].



Obr. 17: Separace 15 zástupců z řad syntetických kationů a fenylethylaminů v čase 1.61 min. 1) kation, 2) bufedron, 3) 3-MMC, 4) MDA, 5) 3-FMC, 6) 4-FMC (flefedron), 7) 2C-H, 8) 4-MEC, 9) BDB, 10) methedron, 11) methylon, 12) ethylon, 13) butylon, 14) 2C-B, 15) nafyron. (převzato z cit. [54])

Separační schopnosti relativně mladé UHPSFC techniky jsou často srovnávány už s dobře zavedenými GC a UHPLC technikami. V jedné ze studií, která porovnávala tyto tři chromatografické přístupy, byla řešena separace 31 syntetických kanabinoidů, přičemž 9 z nich byly polohové izomery, jejichž separace bývá problematická. UHPSFC separovala kanabinoid JWH-018 a všech jeho devět polohových izomerů s $R \geq 1$ v čase kratším než 7,5 min. V případě GC byly separovány jen čtyři tyto izomery v čase pod 21 min a UHPLC systém rozlišil pouze tři izomery v čase pod 10 min [106]. Srovnání těchto tří technik bylo také provedeno v další studii zabývající se separací 34 polohových izomerů syntetických katinonů. Dvěma nejslibnějšími systémy umožňujícími separovat největší počet izomerů byly UHPSFC a UHPLC v HILIC módu, které oddělily 28 respektive 27 katinonů. Pomocí GC s nepolární kolonou bylo separováno 22 izomerů a v případě UHPLC s C18 kolonou pouze 7. Z hlediska počtu separovaných polohových izomerů, ale také doby analýzy, se osvědčily techniky UHPSFC a UHPLC s HILIC kolonou, jejichž výstupy mohou být pro získání co nejspolehlivějších dat doplněny o informace poskytnuté technikou GC [107].

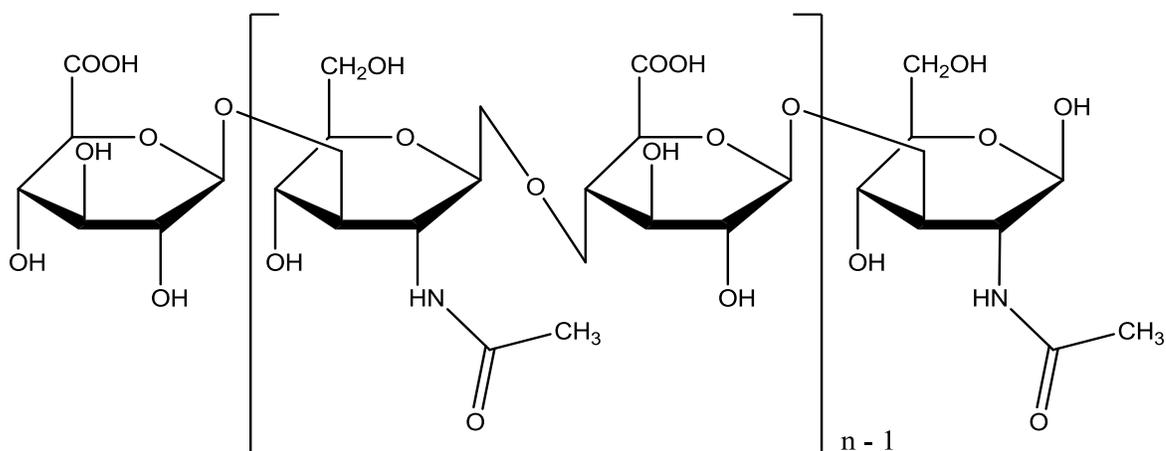
S narůstajícím počtem nových NPS vyskytujících se na trhu je nezbytné disponovat selektivními a časově nenáročnými metodami umožňujícími identifikovat jak čisté látky, tak pro toxikologické účely také látky přítomné v biologických vzorcích. Důležitým faktorem není jen vlastní analýza, ale rovněž náročnost zpracování vzorku, zvláště těch se složitější maticí. Součástí výsledků této práce je porovnání dvou rychlých chromatografických metod (UHPLC a UHPSFC) při analýze 15 NPS přítomných ve vzorcích moči. Obě metody byly úspěšně validovány a jsou aplikovatelné pro rutinní analýzy [108].

2.8. Iontově mobilní spektrometrie v analýze kyseliny hyaluronové

Sacharidy jsou skupinou látek zastávajících řadu důležitých rolí v živých organismech. Jsou využívány především jako zdroj energie, bývají základní stavební jednotkou mnoha buněk a také buňky chrání před působením různých vnějších vlivů. Jsou látkami biologicky aktivními, případně složkami biologicky aktivních látek (např. glykoproteiny, koenzymy, hormony aj.) [109]. Sacharidy se mohou vyskytovat jako samostatné cukry (*monosacharidy*) nebo jako stavební bloky oligomerních respektive polymerních struktur (*oligosacharidů a polysacharidů*). *Monosacharidy* jsou tvořeny jednou cukernou jednotkou, přičemž *oligosacharidy* se skládají

z 2 – 10 monosacharidových jednotek spojených vzájemně glykosidovými vazbami. Pro více než 10 monosacharidových jednotek se používá označení *polysacharidy* [109].

V rámci této disertační práce je řešena problematika překrývajících se mobilitních píků série oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové (HA). Je to přirozeně se vyskytující lineární polysacharid, který patří do skupiny glykosaminoglykanů (GAG), dříve známých pod označením kyselá mukopolysacharidy. Kyselina hyaluronová (HA) se od ostatních GAG liší tím, že je nesulfatovaná a nevytváří proteoglykany, jelikož se neváže na specifické proteiny. Tato látka je v živých organismech všudypřítomná. Je běžně syntetizována řadou buněk a je přirozenou součástí tělesných tekutin a tkání např. jako želatinová složka sklivce oka, složka tekutiny kloubů nebo hlavní komponenta placenty [110]. Bylo prokázáno, že tato látka je neimunogenní, netoxická a nepůsobí zánětlivě [111,112]. Ve své přirozené formě existuje HA jako polymer o vysoké molekulové hmotnosti $10^5 - 10^7$ Da, jelikož může obsahovat až desítky tisíc sacharidů navázaných za sebou. Molekula HA se skládá ze střídajících se jednotek disacharidů tvořených N-acetyl-D-glukosaminem (GlcNAc) a D-glukuronovou kyselinou (GlcA), které jsou dohromady spojeny střídajícími se $\beta 1 \rightarrow 4$ a $\beta 1 \rightarrow 3$ glykosidickými vazbami (Obr. 18).



Obr. 18: Struktura molekuly kyseliny hyaluronové.

Z analytického hlediska identifikace sacharidů může být značně komplikována izomerií (stereochemie monomerních jednotek, variability jejich vazby a potenciálního větvení řetězce). Obecně identifikace izomerů a izobarických sloučenin je možná prostřednictvím tandemové hmotnostní spektrometrie, která však může selhat v případě spektrální podobnosti látek nebo

při nedostupnosti příslušného standardu [113]. V této situaci se zásadním krokem stává separace. Kromě klasických chromatografických nebo elektroforetických technik se nabízí také iontově mobilní spektrometrie, která umožňuje rozlišení izomerů na základě tvaru jejich molekuly. Schopnosti této techniky byly využity, jak při analýze malých sacharidů, tak také při charakterizaci fragmentů polysacharidů. Jednalo se o objasnění struktury tetros a hexos ve formě sodných aduktů [114]. V další studii byly separovány izomerní disacharidy prostřednictvím TWIMS [115]. Při separaci těchto látek byl také studován vliv změny driftového plynu. Nahrazení N_2 oxidem uhličitým vedlo ke zlepšení rozlišení izomerů disacharidů [116]. Přesto ve všech těchto zmíněných případech nebylo dosaženo optimálního rozlišení a iontově mobilní píky se překrývaly.

Možný způsob řešení problematiky překrývajících se iontově mobilních píků byl představen ve studii zaměřené na analýzu izomerů derivátů HA prostřednictvím IM-MS kombinované s ionizací elektrosprejem. Pro rozlišení všech polohových izomerů bylo využito selektivní redukce příslušných oligosacharidů pomocí $NaBH_4$. V hmotnostních spektrech produktů redukce separovaných iontovou mobilitou byly identifikovány jedinečné fragmentové ionty umožňující rozlišení jednotlivých izomerů. Tvar mobilních píků izomerních deprotonovaných molekul byl určen na základě ATD produktového iontu, který je jedinečný pro každý izomer. Znalost tvaru mobilního píku umožnila určit poměry ploch izomerů, aniž by byla vyžadována identifikace pomocí standardů [89]. Jak je již uvedeno na konci kapitoly 2.6., problematika oligosacharidů kyseliny hyaluronové je řešena i v rámci výsledků experimentální části této práce.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tématem doktorské práce bylo studium, vývoj a aplikace rychlých separací ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Stanoveny byly dva cíle:

1. Studium chromatografického chování NPS ze skupiny kationů a fenylethylaminů, porovnání dvou technik (UHPLC a UHPSFC) s hmotnostní detekcí při analýze NPS v lidské moči. Kromě chromatografických separací bylo úkolem otestovat možnost iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií při identifikaci zmíněných látek.
2. Navrhnout postup pro odlišení nedostatečně separovaných iontově mobilních píků a otestovat je na analýze oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové.

Řešení obou cílů vedlo k publikačním výstupům:

1. **Borovcová L.**, Pauk V., Lemr K., *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800006
2. **Borovcová L.**, Hermannová M., Pauk V., Šimek M., Havlíček V., Lemr K., *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, Anal. Chim. Acta 981 (2017) 71–79.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Ultra-vysokoučinná chromatografie nových psychoaktivních látek

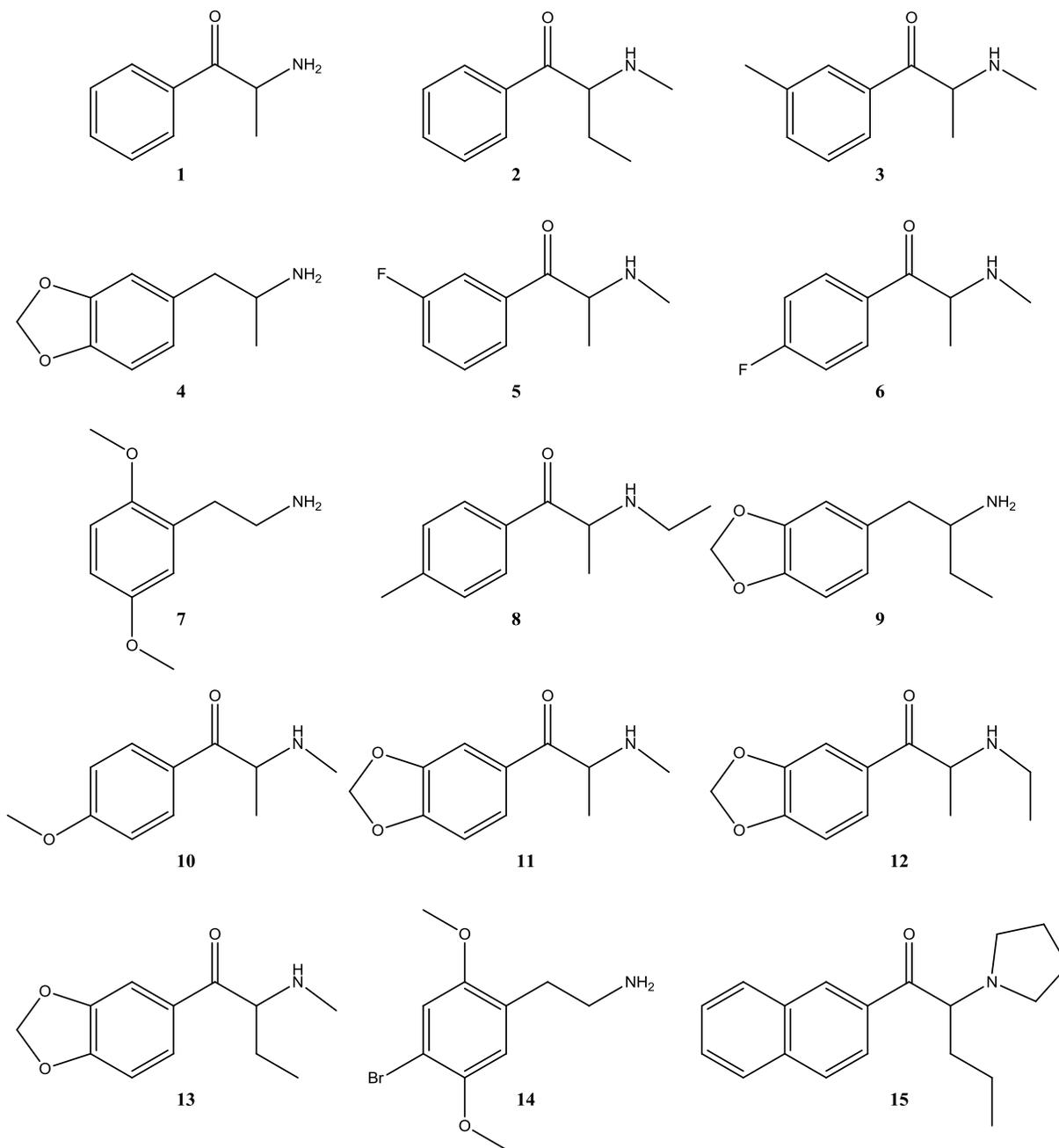
Materiály uvedené v této části byly publikovány v rámci prvoautorské publikace cit. [108].

Chemikálie a vzorky

Použity byly dále uvedené chemikálie: methanol (MeOH), acetonitril (ACN), aceton a propan-2-ol (i-PrOH) v HPLC čistotě, kyselina mravenčí ($\geq 95\%$) a mravenčan amonný ($\geq 99\%$) vše zakoupeno od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Voda byla přečištěna Milli-Q systémem (Millipore, Molsheim, Francie).

K analýze bylo použito 15 standardů (p.a.) nových psychoaktivních látek ve formě hydrochloridů. Struktury těchto látek jsou zobrazeny na Obr. 19. Standardy 3-fluoromethkatinonu (3-FMC) a 3-methylmethkatinonu (3-MMC) byly získány od společnosti Cayman Pharma (Neratovice, Česká Republika), zbylé byly zakoupeny od společnosti Lipomed AG (Arlesheim, Švýcarsko).

Vzorky moče byly získány od šesti dobrovolníků (třech žen a třech mužů) a jejich smícháním byl vytvořen jeden vzorek směsné moči.



Obr. 19: Struktury testovaných fenylethylaminů a katinonů. **1)** katinon; **2)** bufedron; **3)** 3-MMC; **4)** MDA; **5)** 3-FMC; **6)** 4-FMC (flefedron); **7)** 2C-H; **8)** 4-MEC; **9)** BDB; **10)** methedron; **11)** methylon; **12)** ethylon; **13)** butylon; **14)** 2C-B; **15)** NRG (nafyron).

Příprava standardních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky jednotlivých standardů drog byly připraveny ve směsi MeOH:H₂O (50:50 v/v) o koncentraci 1 mg/ml a skladovány při -18 °C. Tyto látky byly rozděleny do skupin dle jejich hmotnostně spektrometrické odezvy: LCI (NRG); LCII (methedron, methylon, ethylon, butylon, 2C-B); LCIII (bufedron, 3-FMC, 4-FMC, 2C-H, 4-MEC); LCIV (katinon, 3-MMC, MDA, BDB); SFCI (3-MMC, methylon, ethylon, butylon, NRG); SFCII (bufedron, 3-FMC, 4-FMC, 4-MEC, methedron); SFCIII (2C-H, 2C-B); SFCIV (katinon, MDA, BDB). Následně byly všechny analyty smíchány a zředěny MeOH k přípravě roztoků 1 až 9 dle Tab. II, jejichž přídavek sloužil k přípravě pracovních roztoků resp. modelových vzorků.

Tab. II. Koncentrace nových psychoaktivních látek v jednotlivých roztocích standardů.

Číslo roztoku	UH _{SFC} -MS, ng/mL				UH _{PLC} -MS, ng/mL			
	SFCI	SFCII	SFCIII	SFCIV	LCI	LCII	LCIII	LCIV
9	1000	10000	25000	100000	-	-	-	-
8	500	5000	12500	50000	200	2000	10000	20000
7	100	1000	2500	10000	100	1000	5000	10000
6	20	200	500	2000	20	200	1000	2000
5	4	40	100	400	4	40	200	400
4/5	2	20	50	200	-	-	-	-
4	0,8	8	20	80	0,8	8	40	80
3	0,4	4	10	40	0,4	4	20	40
2	0,2	2	5	20	0,2	2	10	20
1	0,1	1	2,5	10	0,1	1	5	10

Celkem byly připraveny tři kalibrační řady pro každou techniku. Jedna kalibrační řada látek v čistém rozpouštědle a dvě kalibrační řady pro moč s přídavkem standardů (přídavek před resp. po úpravě vzorků). Vždy bylo smícháno 200 µl vody nebo moči s 10 µl roztoku standardu o vhodné koncentraci (Tab. II) a dále bylo přidáno 790 µl MeOH (UH_{PLC}) nebo i-PrOH (UH_{SFC}). Vzorky byly ponechány v ultrazvuku po dobu 1 minuty a filtrovány přes nylonové stříkačkové filtry o průměru 13 mm s velikostí pórů 0,22 µm (Labicom, Olomouc, Česká Republika). V případě přípravy kalibrační řady pro moč s přídavkem po úpravě byla nejprve

smíchána moč s MeOH (UHPLC) nebo i-PrOH (UHPSFC) v poměru 2:8. Směs byla protřepána, ultrazvukována po dobu 1 minuty a zfiltrována. Ze směsi bylo odebráno 990 µl, ke kterým bylo následně přidáno 10 µl roztoku standardu o dané koncentraci (Tab. II). Slepým vzorkem byla směs moči a daného rozpouštědla v poměru 2:8. Všechny tři kalibrační série byly uchovávány v autosampleru při 10 °C a analyzovány během 24 hodin.

Přístrojové vybavení

K vlastnímu měření vzorků nových psychoaktivních látek byly použity *Acquity UPC²* a *I-Class Acquity UPLC* systémy ve spojení s *hmotnostním spektrometrem Xevo TQS* s iontovým zdrojem *elektrosprejem Z-spray* (vše Waters, Manchester, Velká Británie). Přístroje byly ovládány a data byla sbírána softwarem Waters MassLynx 4.1. K integraci chromatografických píků byl použit software TargetLynx (vše Waters, Manchester, Velká Británie). Výpočet Log D při 25 °C byl proveden pomocí softwaru Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) verze 11.02.

Hmotnostní detekce

Látky byly analyzovány v kladném módu, přičemž parametry elektrospreje byly nastaveny na tyto hodnoty:

- napětí na sprejovací kapiláře: +2,8 kV
- teplota zdroje: 150 °C
- průtok plynu (N₂) kónusem: 150 l/h
- napětí (offset) zdroje: 50 V
- zmlžovací plyn (N₂): 5 / 3 bar pro UHPLC-MS / UHPSFC-MS
- desolvatační plyn: 1000 l/h / 700 l/h pro UHPLC-MS / UHPSFC-MS
- desolvatační teplota: 500 °C / 300 °C pro UHPLC-MS / UHPSFC-MS

Pomocnou kapalinou v elektrospreji při UHPSFC-MS byl MeOH. Jeho průtok 0,4 ml/min byl zajištěn izokratickým vysokotlakým čerpadlem Isocratic Solvent Manager (Waters, Manchester, Velká Británie).

Pro každou látku byly vybrány dvě fragmentační cesty (dva SRM přechody, selected reaction monitoring, sledování vybrané reakce) na základě poměru signálu k šumu. Průtok kolizního plynu (Ar) byl nastaven na 0,2 ml/min. Napětí na kónusu a kolizní energie byly optimalizovány pro každý přechod SRM zvlášť. Doba prodlevy (dwell time) byla nastavena na 0,005 s, zpoždění při přepínání mezi přechody (inter-channel delay) na 0,003 s. Přehled zvolených SRM přechodů, použité napětí na kónusu a kolizní energie jsou uvedeny v Tab. III.

Tab. III. Zkoumané NPS a jejich SRM přechody.

#	Látka	Sumární vzorec	Prekurzorový ion	Napětí na kónusu, V	Fragmentové ionty	Kolizní energie, V
1	katinon	C ₉ H ₁₁ NO	150	30	117	18
					132	12
2	bufedron	C ₁₁ H ₁₅ NO	178	28	131	20
				20	147	12
3	3-MMC	C ₁₁ H ₁₅ NO	178	10	145*	20
				20	147	12
4	MDA	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	163	40	103	25
					105	17
5	3-FMC	C ₁₀ H ₁₂ NOF	182	32	103	27
					148	
6	4-FMC flefedron	C ₁₀ H ₁₂ NOF	182	32	103	27
					148	
7	2C-H	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	165	45	135	25
			182	30		
8	4-MEC	C ₁₂ H ₁₇ NO	192	30	144	28
				10	145	18
9	BDB	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	177	40	135	17
			194	20		
10	methedron	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	194	28	146	26
					161	12
11	methylon	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	208	10	132	24
					160	16

12	ethylon	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	222	32	146	26
					174,1	18
13	butylon	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	222	32	146	26
					174,1	18
14	2C-B	C ₁₀ H ₁₄ NO ₂ Br	260	30	212,9	30
			262		214,9	
15	NRG	C ₁₉ H ₂₃ NO	282	40	141	22
	nafyron				211	18

- tučně vypsané ionty byly použity ke kvantifikaci pro obě techniky, pouze v případě odlišností jsou ionty použité pro kvantifikaci pro UHPSFC-MS označeny *

Chromatografické podmínky

a) UHPLC-MS

Nejlepší separace bylo dosaženo při použití kolony Acquity UPLC Phenyl (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) s in-line filtrem. Mobilní fáze byla složena z H₂O (A) a MeOH (B), přičemž obě složky byly s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Program gradientové eluce byl následující: 0 min – 95 % A; 3 min – 5 % A; 3.1 – 5 min – 95 % A. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,45 ml/min a teplota kolony na 35 °C. Dávkováno bylo 5 μl vzorku a oplach dávkovací jehly byl proveden 800 μl směsi H₂O:MeOH 9:1 (v/v).

b) UHPSFC-MS

UHPSFC metoda byla přejata z předchozí publikace [54] a upravena tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího kompromisu mezi rozlišením izomerů a rychlostí analýzy. K analýzám byla použita kolona Acquity BEH (100 × 3,0 mm, 1,7 μm) s in-line filtrem při 40 °C. Mobilní fázi tvořil oxid uhličitý s modifikátorem (methanol s 20 mmol/l mravenčanu amonného). Gradient modifikátoru byl nastaven následovně: 0 min – 6 %; 3 min – 25 %; 3.1 – 5.5 min – 6 %. Průtok mobilní fáze byl 2,0 ml/min. Automatický regulátor tlakového odporu byl nastaven na 2000 psi (138 barů). Dávkováno bylo 5 μl vzorku. K oplachu dávkovací jehly bylo využito směsi H₂O:MeOH 1:1 (v/v) s 0,1 % kyseliny mravenčí (1000 μl) a následně směsi MeOH:i-PrOH 3:1 (v/v) s 0,1 % kyseliny mravenčí (1000 μl).

Výpočet rozlišení

Rozlišení bylo vypočítáno ze vzorce:

$$R = 1,176 \left(\frac{t_{RB} - t_{RA}}{w_{1/2A} + w_{1/2B}} \right)$$

kde t_{RA} , t_{RB} – jsou retenční časy látek A a B a $w_{1/2A}$, $w_{1/2B}$ – šířka píků v polovině výšky látky A a B.

Parametry validace metody

Veškeré vzorky byly na každé koncentrační úrovni analyzovány 6-krát.

- Preciznost byla vypočítána jako relativní směrodatná odchylka (RSD) z ploch píků.
- Kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislosti koncentrace na průměrné hodnotě plochy píků pomocí softwaru OriginPro 2015 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Pro jednotlivé body byla stanovena podmínka preciznosti pod 15 % (pod 20 % na úrovni LOQ). Kalibrační křivky byly konstruovány pomocí vážené lineární regrese $1/x^2$ [117], v posuzovaném rozsahu byly lineární (koeficient determinace R^2 byl vyšší než 0,990).
- Přesnost byla určena porovnáním hodnot získaných z kalibračních závislostí a pravých hodnot (obsah standardu v připravovaném vzorku).
- Limity detekce a kvantifikace byly vypočítány jako $3,3 \times \sigma/S$ respektive $10 \times \sigma/S$, kde σ představuje směrodatnou odchylku úseku na ose y a S hodnotu směrnice kalibrační závislosti.
- Výtěžnost (RE, %) byla vypočítána jako poměr ploch píků $A1/A2$, kde A1 je plocha píku daného standardu přidaného do vzorku moče před jeho úpravou, A2 plocha píku daného standardu přidaného do vzorku moče po jeho úpravě.
- Matriční efekt (ME, %) byl určen jako poměr $A2/A3$, kde A3 je plocha daného standardu získaná analýzou jeho roztoku v čistém rozpouštědle.
- Ke stanovení případného přenosu analytu do následných analýz (carryover) byl po analýze vzorku o nejvyšší koncentraci (horní hranice kvantifikace ULOQ) nastříknut vzorek moče bez přídavku sledovaných látek (slepý pokus). Poměr plochy píku zjištěné pro slepý pokus a vypočtené hodnoty plochy píku odpovídající LOQ byl vyjádřen v %.

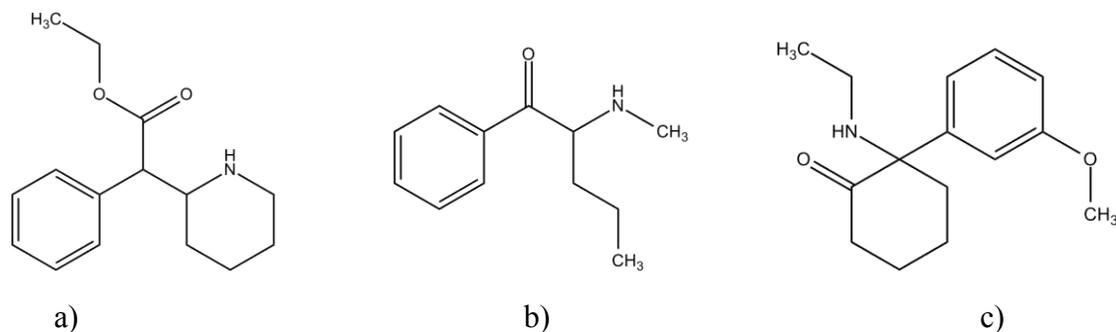
4.2. Analýza nových psychoaktivních látek pomocí spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií

Materiály uvedené v této části jsou součástí diplomových prací Sandry Benické s názvem „Iontová pohyblivost s hmotnostní spektrometrií ve forenzní analýze“ a Jany Ondruchové s názvem „Účinný srážkový průřez při identifikaci drog spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií“, některé části byly rovněž prezentovány na workshopech, přednáškách a formou plakátových sdělení. U obou zmíněných diplomových prací byla autorka disertační práce konzultantkou a podílela se na měření, vyhodnocování a korekturách textů. Podílela se taktéž na přípravě výše zmíněných prezentací.

Chemikálie a vzorky

Pro přípravu roztoků byly použity methanol a acetonitril (HPLC čistota; VWR International S.A.S.), kyselina mravenčí ($\geq 95\%$; Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika) a voda upravená Milli-Q systémem (Millipore, Molsheim, Francie).

Analyzováno bylo 15 standardů nových psychoaktivních látek (viz kap. 4.1. Chemikálie a vzorky a Obr. 19) a navíc ethylfenidát (EPH), pentedron a methoxetamin (MXE) (Obr. 20), které byly poskytnuty Celní správou ČR. Pro určení hodnot CCS byly jako kalibrační standardy použity DL-polyalanin (Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika) a směs nízkomolekulárních látek: N-ethylanilin (98%), acetaminofen ($\geq 99\%$), alprenolol hydrochlorid ($\geq 98\%$), ondansetron, clozapin-N-oxid, kolchicin ($\geq 95\%$ HPLC), verapamil hydrochlorid ($\geq 99\%$) a reserpin ($\geq 99\%$ HPLC) (vše Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika).



Obř. 20: Struktury drog poskytnuté Celní správou ČR a) ethylfenidát (EPH, $M_r = 247,1572$ g/mol), b) pentedron ($M_r = 191,1310$ g/mol) a c) methoxetamin (MXE, $M_r = 247,1572$ g/mol).

Připřava roztoků drog a kalibrantů

Zásobní roztoky jednotlivých standardů drog byly připřaveny o koncentraci 1 mg/ml ve směsi MeOH:H₂O (50:50 v/v). Postupným ředěním byly následně přichystány pracovní roztoky o koncentraci 1 µg/ml.

Zásobní roztok kalibrantu polyalaninu byl připřaven o koncentraci 1 mg/ml ve směsi ACN:H₂O (50:50 v/v). Poté bylo nachystáno 10 ml pracovního roztoku o koncentraci 2 µg/ml polyalaninu, jenž obsahoval 20 µl zásobního roztoku polyalaninu, 1 µl 0,1% HCOOH a odměrná baňka byla nakonec doplněna po rysku směsí ACN:H₂O (50:50 v/v).

Druhý kalibrant tvořený směsí látek se připřavoval obdobným způsobem. Prvně byly připřaveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml všech šesti látek (acetaminofen, alprenolol, N-ethylanilin, clozapin-N-oxid, kolchicin, ondansetron, reserpin a verapamil). Z nich byl připřaven směsný pracovní roztok o výsledné koncentraci 2 µg/ml obsahující zmíněné látky.

Přístroje, nastavení parametrů a průběh měření

Všechny vzorky nových psychoaktivních látek byly měřeny na přístroji *Synapt G2-S* spojující iontovou mobilitu s hmotnostní spektrometrií. Vybaven byl *elektrosprejem Z-spray*. Ovládání a sběr dat byly zajištěny prostřednictvím softwaru Waters MassLynx 4.1. (vše Waters, Manchester, Velká Británie). Roztoky standardů nových psychoaktivních látek o koncentraci 1 µg/ml byly dávkovány do iontového zdroje přímou infuzí průtokem 10 µl/min.

Látky byly analyzovány v kladném módu, přičemž parametry elektrospreje byly nastaveny na tyto hodnoty:

- napětí na sprejovací kapiláře: +1,25 kV
- teplota zdroje: 100 °C
- průtok plynu (N₂) kónusem: 100 l/h
- napětí (offset) zdroje: 80 V
- napětí na kónusu: 30 V
- zmlžovací plyn (N₂): 6 bar
- desolvatační plyn: 600 l/h
- desolvatační teplota: 400 °C

Při testování driftového plynu byly parametry iontové mobility nastaveny s ohledem na použitý plyn (změnu účinného srážkového průřezu) a riziko fragmentace analytů v mobilitní cele (nastavení RF napětí) podle Tab. IV.

Tab. IV. Parametry iontové mobility.

	N₂	CO₂	Ar
Rychlost vlny (m/s):	2200	1100	1100
RF napětí (V):	250	150	150
Výška vlny (V):	40	40	40
Průtok driftového plynu (ml/min):	90	90	90

V případě určování účinných srážkových průřezů probíhalo měření pouze v driftovém plynu dusíku při rychlosti vlny 700 m/s. Ostatní parametry byly zachovány. Důvody změny rychlosti vlny jsou vysvětleny v kap. 5.2.2. Měření jednotlivých nových psychoaktivních látek

a kalibrantu (polyalanin respektive směs nízkomolekulárních látek) neprobíhalo jednotlivě, ale v návaznosti za sebou. Nejprve byl proměřen kalibrant (I), poté proběhlo šest měření dané drogy a na závěr byl opět proměřen tentýž kalibrant (II). Označení I a II značí pořadí měření, nikoli konkrétní kalibrační směs. Získaná data byla zpracována v programu DriftScope (Waters, Manchester, Velká Británie).

4.3. Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků

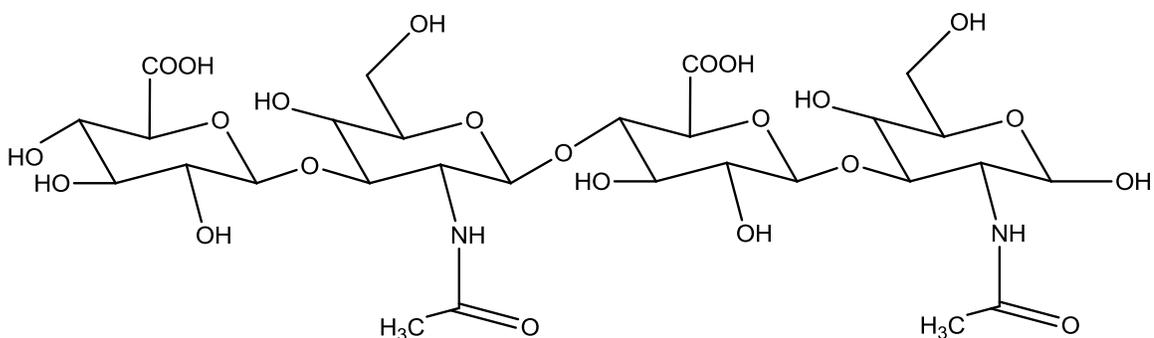
Materiály uvedené v této části byly publikovány v rámci prvoautorské publikace cit. [91].

Chemikálie a vzorky

Navržený postup byl testován pomocí oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové (HA), které byly dodány společností Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika) a jsou uvedeny v této práci jako oligosacharidy Δ HA2AN, HA2AN, HA3NN, HA4AN, HA4NA, HA6AN, HA6NA, HA6ANdeac. Celé číslo představuje počet stavebních bloků (GlcA – D-glukuronová kyselina a GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin), Δ značí dvojnou vazbu mezi C4 a C5 GlcA a *deac* představuje deacetylaci jedné stavební jednotky GlcNAc. Symboly AN, NA, NN popisují stavební bloky na koncích oligosacharidových řetězců. Například v případě HA4AN (Obr. 21) byla GlcA přítomna na neredukujícím se konci, GlcNAc byl na konci, kde může probíhat redukce, přičemž u HA4NA tomu bylo naopak. U HA3NN byl GlcNAc přítomen na obou koncích. Zásobní roztoky oligosacharidů byly připraveny ve směsi MeOH:H₂O (50:50 v/v) o koncentraci 1 mg/ml. Tyto zásobní roztoky byly zředěny stejnou směsí rozpouštědel na pracovní roztoky o koncentracích 1 μ g/ml (pro HA2 a HA3), 5 μ g/ml (pro HA4 a HA6).

Methanol (MeOH) a propan-2-ol (i-PrOH) (LC-MS Chromasolv čistota), kyselina octová (ACS reagent grade, $\geq 99,7\%$), kyselina mravenčí (eluční přísada pro LC-MS), borodeuterid sodný ($\geq 98\%$ atom D) a hydroxid sodný (p.a.) byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Voda (vodivost $< 0,3 \mu\text{S cm}^{-1}$) byla přečištěna systémem Elix 35 Water (Merck Millipore, Praha, Česká Republika).

Redukované izomery oligosacharidů (10 mg/ml ve vodě) byly připraveny redukcí oligosacharidů pomocí šesti ekvivalentů NaBD₄. Reakce probíhala 30 minut při 20 °C. Poté byla přidána kyselina octová v množství 15 ekvivalentů tak, aby byl rozložen veškerý zbývající sodno-boranový komplex.



Obr. 21: Struktura oligosacharidu HA4AN odvozeného od kyseliny hyaluronové.

Přístrojové vybavení

Experimenty byly provedeny na *Synaptu G2-Si* (iontová mobilita s hmotnostním spektrometrem) s iontovým zdrojem *elektrosprejem Z-spray* (vše Waters, Manchester, Velká Británie).

Látky byly analyzovány v negativním módu, přičemž parametry elektrospreje byly nastaveny na tyto hodnoty:

- napětí na sprejovací kapiláře: -2,7 kV
- teplota zdroje: 100 °C
- průtok plynu (N₂) kónusem: 0 l/h
- napětí (offset) zdroje: 80 V
- napětí na kónusu: 60 V pro ΔHA2AN, HA2AN a 140 V pro ostatní
- zmlžovací plyn (N₂): 6 bar
- desolvatační plyn: 600 l/h
- desolvatační teplota: 250 °C

Parametry iontové mobility:

- průtok driftového plynu (N₂): 90 ml/min
- výška vlny: 40 V
- rychlost vlny: 360 m/s pro směsi obsahující HA6, 600 m/s pro směsi obsahující HA4 a 1300 m/s pro směsi obsahující HA2

Kolizí indukovaná disociace (CID) izomerů oligosacharidů byla provedena v kolizní cele před mobilní celou (transfer) s kolizní energií odpovídající napětí 50 V za vzniku jedinečných fragmentových iontů m/z 554,133 (HA4ANred) a 557,159 (HA4NAred) nebo 65 V za vzniku jedinečných iontů m/z 602,246 (HA6ANred) a 575,197 (HA6NAred). Průtok kolizního plynu (Ar) byl 2 ml/min.

Pracovní roztok byl zaváděn přímou infúzí do elektrospreje průtokem 5 μ l/min. Binární směsi oligosacharidů (Δ HA2AN (m/z 378,081) : HA2AN (m/z 396,096), HA3NN (m/z 599,164) : HA4NA (m/z 775,182), HA6ANdeac (m/z 1112,302) : HA6AN (m/z 1154,316), HA6ANred (m/z 1157,405) : HA6NAred (m/z 1157,405) a HA4ANred (m/z 778,249) : HA4NAred (m/z 778,249)) byly připraveny v různých poměrech a analyzovány ve třech opakováních. Pro ovládání přístroje a následné zpracování dat byl použit software MassLynx 4.1. (Waters, Manchester, Velká Británie).

Pro prvotní testování navrhovaného postupu byly vybrány binární směsi oligosacharidů Δ HA2AN : HA2AN a HA3NN : HA4NA. Pro specifické hodnoty $m/z \pm 0,01$ jednotlivých složek byly extrahovány mobilogramy a následně exportovány do tabulky. V dalším kroku byla data manuálně posunuta o určitý počet binů tak, aby byly vytvořeny různé příklady separace složek ve směsi. Celý rozsah osy driftového času (13,78 ms) odpovídá 200 binů.

Fitování mobilních píků pomocí Gaussovských funkcí

K fitování mobilních píků (jinak také ATD profilů) byl použit nástroj „peak analyzer wizard“ (OriginPro 2015, OriginLab, Northampton, USA) s následným výběrem možnosti „FitPeaks“ a nastavením režimu základní linie (baseline) na „žádná“. Prvně byla vytvořena ATD funkce (F_{ATD}). Naměřené ATD profily standardů případně jedinečných fragmentových iontů jednotlivých složek byly popsány Gaussovskými funkcemi. Určení počátečního počtu Gaussovských funkcí a jejich maxim bylo založeno na hledání skrytých píků v ATD profilech pomocí druhé derivace a filtrováním výšky píků s prahovou hodnotou 1 %. Fitování bylo provedeno s iterační tolerancí 1×10^{-10} a následujícím nastavením: plocha píku ≥ 0 , vrchol píku (center) $\pm 0,1$ ms, šířka píku v polovině výšky (FWHM) $\pm 0,01$ ms. FWHM největšího píku byla odhadnuta pomocí nástroje „Peak analyzer“, přičemž šířky ostatních píků byly vypočítány na základě vztahu: $FWHM_n = FWHM_h * (center_n / center_h)^{1/2}$, kde h je symbolem pro nejvyšší pík a n je symbol pro ostatní píky. Při tomto postupu se vycházelo z předpokladu, že píky se rozšiřují

v důsledku difúze iontů, tzn. při kratším driftovém času by měl být pík užší. Při fitování bylo vyžadováno, aby koeficient determinace (R^2) dosahoval přinejmenším hodnoty 0,999. V případě, že byl koeficient determinace (R^2) nižší než tato hodnota, byla přidána další Gaussovská funkce s cílem lépe popsat ATD profil. Ta byla umístěna buď do největší mezery mezi sousedními Gaussovskými funkcemi (píky), nebo na základě vizuální kontroly tak, aby došlo ke zlepšení hodnoty R^2 . Výsledné Gaussovské funkce (G , G_1 , G_2 a další) byly spojeny za vytvoření výsledné ATD funkce (F_{ATD}):

$$G = A / (FWHM \times \left(\frac{\pi}{4 \times \ln(2)} \right)^{\frac{1}{2}} \times \exp(-4 \times \ln(2) \times \frac{(t - c)^2}{FWHM^2})$$

$$G_n = kA_n \times A / (kw_n \times FWHM \times \left(\frac{\pi}{4 \times \ln(2)} \right)^{\frac{1}{2}} \times \exp(-4 \times \ln(2) \times \frac{(t - (c - kc_n))^2}{(kw_n \times FWHM)^2})$$

$$F_{ATD} = y_0 + G + G_1 + G_2 + G_3 \dots$$

kde t je čas v milisekundách (ms), y_0 je generováno při fitování a představuje základní linii (baseline), kA_n je konstanta určující poměr plochy píku n ku ploše nejvyššího píku A . Podobně tak kw_n je poměr pro FWHM a kc_n představuje posun mezi vrcholem píku n a vrcholem nejvyššího píku c .

F_{ATD} byla generována samostatně pro každou složku ve směsi. Hodnoty kA_n , kw_n , kc_n , c a $FWHM$ byly stanoveny jako průměry tří opakování. Tato opakování také poskytla rozdíly D_c a D_{FWHM} mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou vrcholu a šířky píku.

Analyzovány byly binární směsi, tudíž vždy byly generovány dvě ATD funkce, které byly následně použity k naitování ATD profilů směsí, přičemž byly nastaveny následující parametry: vrchol píku $c \pm D_c$ (ms), FWHM (šířka píku v polovině výšky) $FWHM \pm D_{FWHM}$ (ms) a plocha píku ≥ 0 .

Vzhledem k tomu, že získané ATD profily jedinečných fragmentů a prekurzorových iontů byly mírně posunuty, tak také vrcholy píků ATD funkcí získaných z dat fragmentových iontů byly zarovnány s profily vzorku. Výstupem popsaného postupu byly plochy píků jednotlivých složek ve vzorku.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro srovnávací určení plochy píků izomerních oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové byl použit chromatografický systém *Acquity UPLC I-Class* ve spojení s hmotnostním spektrometrem *Synapt G2-Si* s iontovým zdrojem *elektrosprejem Z-spray* (vše Waters, Manchester, Velká Británie). Separace byla provedena na koloně Jupiter 4 μm Proteo 90 Å ($4,6 \times 250$ mm, Phenomenex, Torrance, USA) za laboratorní teploty. Mobilní fáze se skládala z H_2O (A) a MeOH (B), přičemž obě složky byly obohaceny o 0,1 % kyseliny mravenčí. Program gradientové eluce byl následující: 0 – 3 min – 100% A; 33 min – 70% A; 34 min – 20% A; 36 min – 20% A; 37 min – 100% A; 45 min – 100% A. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Dávkováno bylo 5 μl vzorku. Izomerní směsi byly připraveny o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ v $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1, v/v).

Izomery byly analyzovány v negativním módu, přičemž přístrojové parametry byly nastaveny na tyto hodnoty:

- napětí na sprejovací kapiláře: -2,7 kV
- teplota zdroje: 100 °C
- průtok plynu (N_2) kónusem: 50 l/h
- napětí (offset) zdroje: 80 V
- napětí na kónusu: 60 V
- zmlžovací plyn (N_2): 6 bar
- desolvatační plyn: 800 l/h
- desolvatační teplota: 500 °C

Parametry iontové mobility:

- průtok driftového plynu (N_2): 90 ml/min
- výška vlny: 40 V
- rychlost vlny: 600 m/s

Pro ovládání přístroje a následné zpracování dat byl použit software MassLynx 4.1. (Waters, Manchester, Velká Británie).

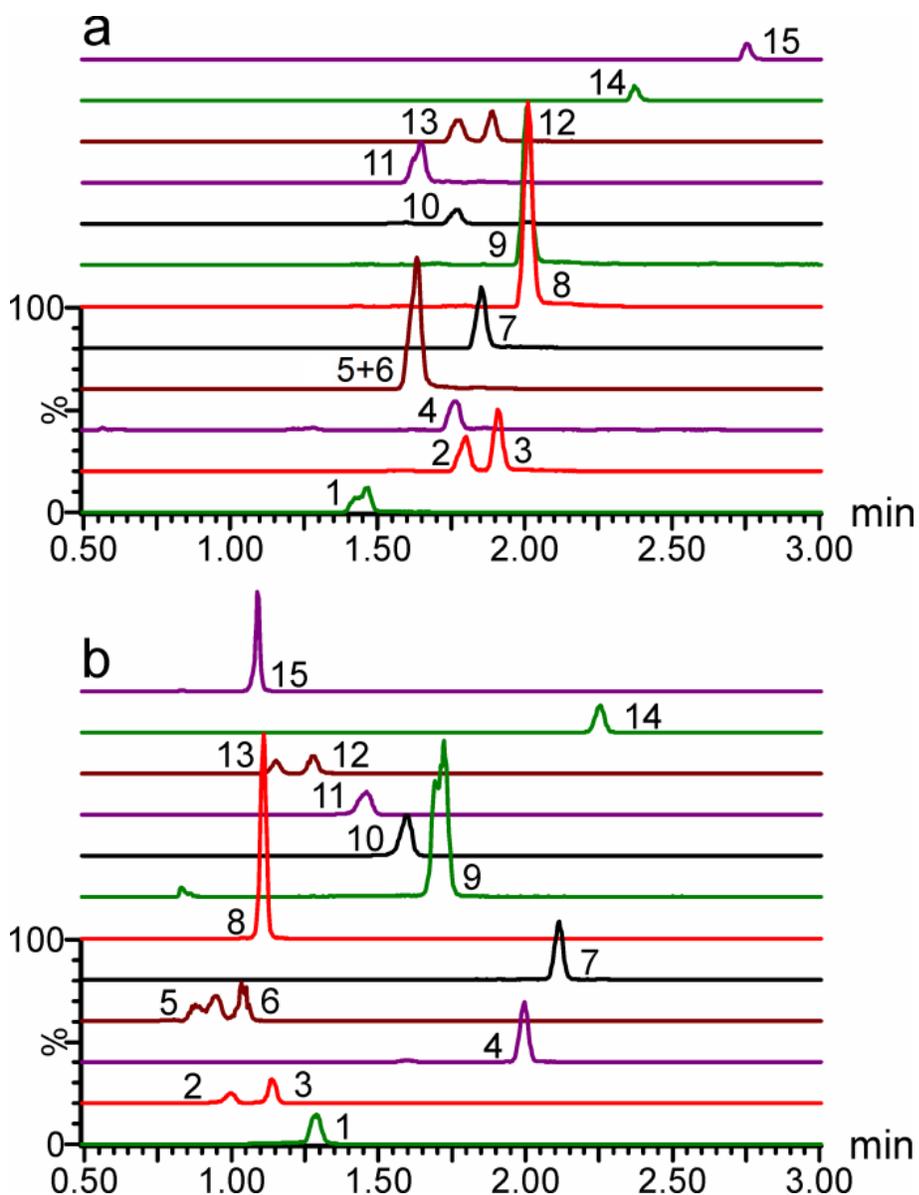
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Ultra-vysokoúčinná chromatografie nových psychoaktivních látek

Materiály uvedené v této části byly publikovány v: L. Borovcová, V. Pauk, K. Lemr, *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) v tisku [108]

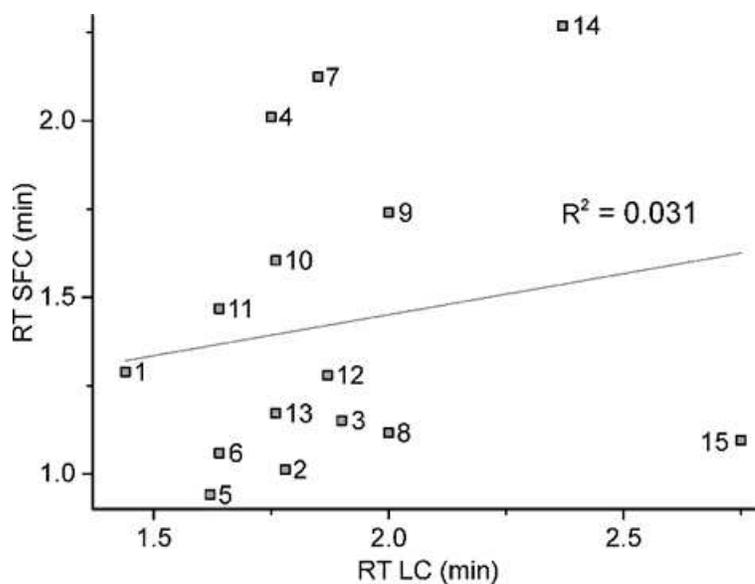
5.1.1. Chromatografická separace

V rámci UHPLC experimentů byly pro separaci 15 NPS testovány tři kolony Waters ACQUITY UPLC BEH Phenyl, BEH Shield RP18 a BEH C8 (všechny o rozměrech 100 × 2,1 mm, plněné částicemi 1,7 μm) s různými kombinacemi gradientů vodně organické mobilní fáze (MeOH, ACN). Nejlepší výsledky z hlediska separace, tvaru píků a doby analýzy poskytla kolona BEH Phenyl s mobilní fází obsahující vodu, methanol a 0,1 % kyseliny mravenčí (Obr. 22 a). Technika UHPSFC pro separaci stejných 15 NPS byla studována a popsána v naší předchozí publikaci [54] z roku 2015. Vyvinutá separace byla částečně modifikována. Analýzy byly provedeny na koloně BEH s mobilní fází sestávající se z oxidu uhličitého a methanolu s přidavkem mravenčanu amonného. Gradient byl upraven tak, aby bylo dosaženo kratší doby analýzy, aniž by došlo ke zhoršení separace prvních eluovaných látek (Obr. 22 b). Obě metody byly porovnány s ohledem na separaci látek a validační parametry.



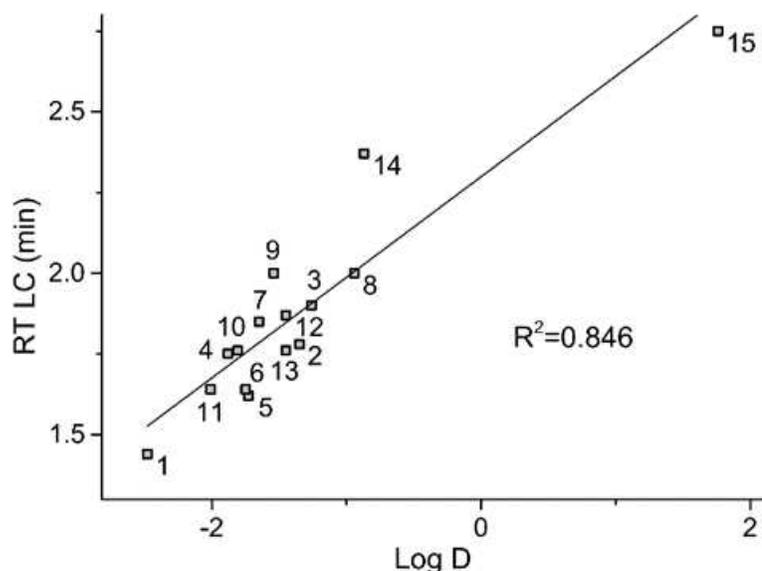
Obr. 22: Chromatogramy vzorků moče s přidavkem NPS a) UHPLC-MS, b) UHPSFC-MS. **1)** katinon; **2)** bufedron; **3)** 3-MMC; **4)** MDA; **5)** 3-FMC; **6)** 4-FMC (flefedron); **7)** 2C-H; **8)** 4-MEC; **9)** BDB; **10)** methedron; **11)** methylon; **12)** ethylon; **13)** butylon; **14)** 2C-B; **15)** NRG (nafyron), (struktury NPS viz Obr. 19, str. 34).

Při srovnání retencí studovaných NPS se obě techniky jeví jako ortogonální (Obr. 23).



Obr. 23: Ortogonalita retenčních časů UHPLC a UHPSFC (RT – retenční čas).
1) katinon; **2)** bufedron; **3)** 3-MMC; **4)** MDA; **5)** 3-FMC; **6)** 4-FMC (flefedron); **7)** 2C-H;
8) 4-MEC; **9)** BDB; **10)** methedron; **11)** methylon; **12)** ethylon; **13)** butylon; **14)** 2C-B; **15)** NRG
 (nafyron), (struktury NPS viz Obr. 19, str. 34).

Retence látek v UHPLC systému s kyselou mobilní fází korelovala poměrně dobře s Log D (logaritmem distribučního koeficientu pro systém oktanol/voda při pH 4,6), jelikož méně polární analyty s vyšší hodnotou Log D byly více zadržovány ($R^2 = 0,846$ Obr. 24). Pozorování je v souladu s chováním látek v systému obrácených fází a lze předpokládat, že významnou roli má hydrofobní efekt.



Obr. 24: Korelace retenčních časů a logaritmu distribučního koeficientu Log D (pH 4,6) v UHPLC pro NPS. **1)** katinon; **2)** bufedron; **3)** 3-MMC; **4)** MDA; **5)** 3-FMC; **6)** 4-FMC (flefedron); **7)** 2C-H; **8)** 4-MEC; **9)** BDB; **10)** methedron; **11)** methylon; **12)** ethylon; **13)** butylon; **14)** 2C-B; **15)** NRG (nafyron), (struktury NPS viz Obr. 19, str. 34).

V použitém separačním systému UHPSFC naopak významnou roli hrála adsorpce a polární interakce analytu se stacionární fází, což je výrazně odlišný mechanismus od způsobu dělení látek v systému oktanol/voda (mezi retencí v UHPSFC a log D nebyla zjištěna korelace). Polární interakce však mohou významně přispívat k separaci izomerních látek.

Pro jednotlivé izomerní páry byly zjištěny následující hodnoty rozlišení (první hodnota je pro UHPLC, druhá pro UHPSFC): $R_{2,3} = 1,86$ a $2,20$; $R_{5,6} = <0,5$ a $1,34$; $R_{9,10} = 5,00$ a $1,87$; $R_{12,13} = 1,85$ a $1,92$ struktury viz Obr. 19 str. 34. V systému UHPLC bylo dosaženo největšího rozlišení u izomerů BDB a methedronu ($R_{9,10} = 5,00$), které se významně liší svými strukturami a lze u nich očekávat větší rozdíl v hydrofobním efektu. U ostatních izomerních párů s podobnějšími strukturami lze předpokládat menší rozdíly v hydrofobních efektech a v důsledku jejich menší separaci v systému obrácených fází. Separace v UHPSFC s uplatněním polárních interakcí izomerů se stacionární fází poskytla lepší rozlišení. Úspěšné separace izomerního páru 3-FMC a 4-FMC bylo dosaženo pouze v UHPSFC ($R_{5,6} = <0,5$ a $1,34$ UHPLC a UHPSFC). Opakovatelnost retenčních časů látek na úrovni LOD byla lepší než 1 %

pro všechny NPS, s výjimkou 3-FMC a 4-FMC v systému UHPSFC (hodnoty RSD retenčních časů jsou v Tab. V str. 54).

5.1.2. Příprava vzorků a volba rozpouštědla

Ke zpracování vzorků byl volen jednoduchý a rychlý postup „zředit-zfiltrovat-analyzovat“ („dilute-filter-and-shoot“), což přispělo k rychlé analýze zahrnující i zpracování vzorků. K eliminaci vysokého obsahu solí a dalších složek (např. kreatinin, kreatin, močovina, kyselina močová), jakožto možných rušivých látek při hmotnostně spektrometrické detekci, byla testována řada organických rozpouštědel s cílem vysrážet alespoň jejich část. V případě UHPLC byl pro úpravu vzorků vybrán MeOH, který oproti rozpouštědlu s vyšší eluční silou (i-PrOH) výrazněji nedeformoval tvar píků. V případě UHPSFC byl testován aceton, ACN a i-PrOH. Se všemi těmito rozpouštědly byla dosažena přijatelná separace NPS i při nástřiku 5 μ l. Avšak u acetonu docházelo k jeho rychlému odpařování, ačkoli byly vzorky uchovávány v automatickém dávkovači při teplotě 10 °C. Rovněž použití ACN se neosvědčilo, a to z důvodu nízkých výtěžností (<40 %) pro většinu látek. Navíc po dvou až třech dnech bylo ve vialce pozorováno oddělování fází, pravděpodobně z důvodu vysolování. Pro zpracování vzorků byl nakonec zvolen i-PrOH, přestože docházelo ke štěpení píku 3-FMC. Štěpení lze eliminovat snížením nastříkovaného objemu na méně než 2 μ l, což ovšem vede ke zhoršení LOD. Stejně tak snížení nastříkovaného objemu vedlo ke zlepšení tvaru píku katinonu a methylonu při UHPLC analýze. Vliv matrice na štěpení píku byl pozorován u analytu BDB v systému UHPSFC (nedocházelo k němu při analýze standardu v čistém rozpouštědle).

5.1.3. Limit detekce

Limity detekce byly určeny pro NPS v moči. Obě chromatografické techniky byly spojeny se stejným hmotnostním spektrometrem, ale různé hodnoty průtoku i složení mobilních fází v UHPLC a v UHPSFC mohly ovlivnit odlišně ionizační účinnost i signál pozadí. Ve většině případů UHPLC poskytla srovnatelné nebo větší plochy píků pro stejné SRM přechody daných analytů na stejných koncentračních úrovních v čistém rozpouštědle i v moči. Pozorována byla 2-4 krát větší plocha u látek s primární aminoskupinou (katinon, MDA, BDB, 2C-H a 2C-B). Pro tyto látky je typická vysoká hodnota pKa, okyselená mobilní fáze v UHPLC metodě podporovala jejich ionizaci. Jejich protonace v UHPSFC může být méně účinná kvůli

menší dostupnosti protonů v použité superkritické mobilní fázi. S výjimkou 2C-B měly tyto látky LOD v UHPSFC nad 1 ng/ml. Nejlepších limitů detekce v UHPSFC systému bylo dosaženo pro látky NRG, butylon, ethylon, methylon, 4-MEC a 3-MMC, jejichž hodnoty se pohybovaly v setinách ng/ml. Oproti UHPLC bylo technikou UHPSFC dosaženo až $10 \times$ nižších limitů detekce pro sloučeniny 3-MMC a ethylon, $2-3 \times$ nižší limity pro 4-MEC a methylon, přičemž v pěti případech byly obě techniky srovnatelné. Naopak u šesti NPS bylo dosaženo lepších limitů detekce pomocí UHPLC. Vůbec nejnižší limit detekce byl získán technikou UHPLC pro látku NRG (0,01 ng/ml) (Tab. V). Hodnoty LOD byly ovlivněny jak odezvou analytu, tak šumem pozadí, matričním efektem a výtěžností.

Tab. V. Retenčních časy, LOD a LOQ studovaných NPS v moči. Instrumentální hodnoty LOD a LOQ byly $5 \times$ nižší.

Číslo	Látka	UHPSFC-MS			UHPLC-MS		
		RT (min) (RSD*, %) (n=6)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	RT (min) (RSD*, %) (n=6)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1	katinon	1,289 (0,35)	5,15	15,61	1,451 (0,66)	0,50	1,51
2	bufedron	1,012 (0,81)	0,26	0,78	1,781 (0,55)	0,09	0,26
3	3-MMC	1,151 (0,73)	0,07	0,20	1,902 (0,36)	1,04	3,16
4	MDA	2,011 (0,54)	2,23	6,74	1,734 (0,87)	1,39	4,22
5	3-FMC	0,941 (2,25)	0,37	1,11	1,625 (0,40)	0,06	0,19
6	4-FMC	1,059 (1,67)	0,22	0,67	1,648 (0,18)	0,31	0,94
7	2C-H	2,124 (0,30)	1,85	5,61	1,844 (0,22)	0,40	1,21
8	4-MEC	1,117 (0,50)	0,04	0,13	2,006 (0,17)	0,08	0,23
9	BDB	1,739 (0,47)	1,61	4,87	2,001 (0,21)	1,35	4,10
10	methedron	1,604 (0,87)	0,19	0,58	1,771 (0,79)	0,33	1,00
11	methylon	1,468 (0,89)	0,03	0,09	1,638 (0,46)	0,11	0,32

12	ethylon	1,279 (0,58)	0,03	0,09	1,876 (0,40)	0,25	0,76
13	butylon	1,171 (0,87)	0,02	0,07	1,772 (0,89)	0,03	0,08
14	2C-B	2,269 (0,33)	0,41	1,23	2,371 (0,08)	0,10	0,31
15	NRG	1,095 (0,45)	0,04	0,11	2,741 (0,06)	0,01	0,02

* RSD retenčních časů byly spočteny pro analýzy na LOD úrovni

5.1.4. Preciznost, lineární rozsah a přesnost

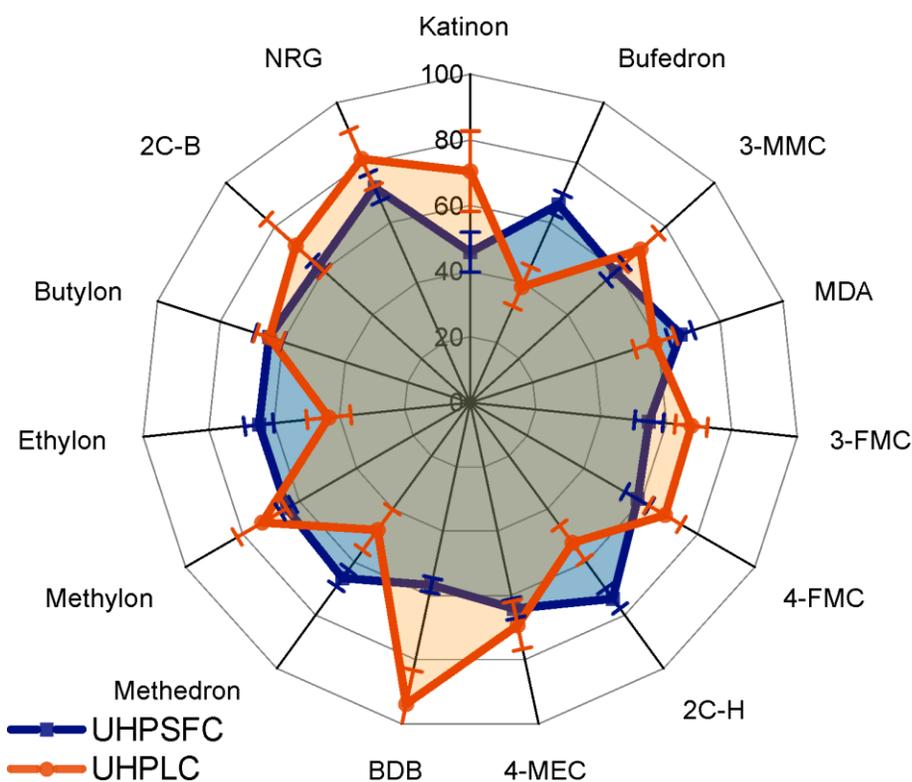
Z hlediska preciznosti byly obě studované techniky srovnatelné. Na úrovni LOQ u obou metod nepřesáhla hodnota RSD naměřených ploch 20 % a na vyšších koncentračních úrovních byla nižší než 15 % s výjimkou jednoho kalibračního bodu v UHPLC pro analyt bufedron – 20,5 % na úrovni LOQ a butylon – 15,2 % na vyšší koncentrační hladině (Tab. AI v příloze).

Koeficient determinace R^2 byl vždy vyšší než 0,990 v případě obou technik s výjimkou 3-MMC a ethylonu v UHPLC (Tab. AIII v příloze). Lineární koncentrační rozsah byl pro obě metody v rozsahu dvou až tří koncentračních řádů. Horní limit kvantifikace (ULOQ) byl omezen nelineárním průběhem kalibrační křivky u plochy píků větší než dva milióny.

Vážená lineární regrese ($1/x^2$) poskytla pro většinu sloučenin dostatečnou přesnost ± 15 % [117], s výjimkou jediného koncentračního bodu v UHPLC pro katinon – 81,2 %, 3-MMC – 124,1 % a ethylon – 119,4 % (Tab. AI v příloze).

5.1.5. Matriční efekt

Jednoduché zpracování vzorku neumožnilo odstranit matriční efekt (ME) potlačující iontový signál všech analytů v UHPSFC i UHPLC (Obr. 25; Tab. AI a Tab. AII v příloze). Průměrný matriční efekt byl pro obě techniky téměř stejný (62 % UHPLC a 65 % UHPSFC). V případě UHPSFC byl matriční efekt pro různé sloučeniny v rozsahu od 47 % do 73 % s průměrným RSD určeným z matričních efektů pro všechny analyty na všech koncentračních úrovních okolo 6,3 %. U druhé z technik se matriční efekty pro jednotlivé NPS pohybovaly v širším rozmezí 39 % – 94 % a průměrná hodnota RSD byla 12,3 % (Tab. AII v příloze). Z důvodu nedostupnosti standardů NPS značených stabilními izotopy, lze považovat za výhodu vyrovnanější matriční efekty v UHPSFC. Při volbě jedné z látek jako vnitřní standard bude v UHPSFC její chování bližší ostatním stanovovaným látkám.

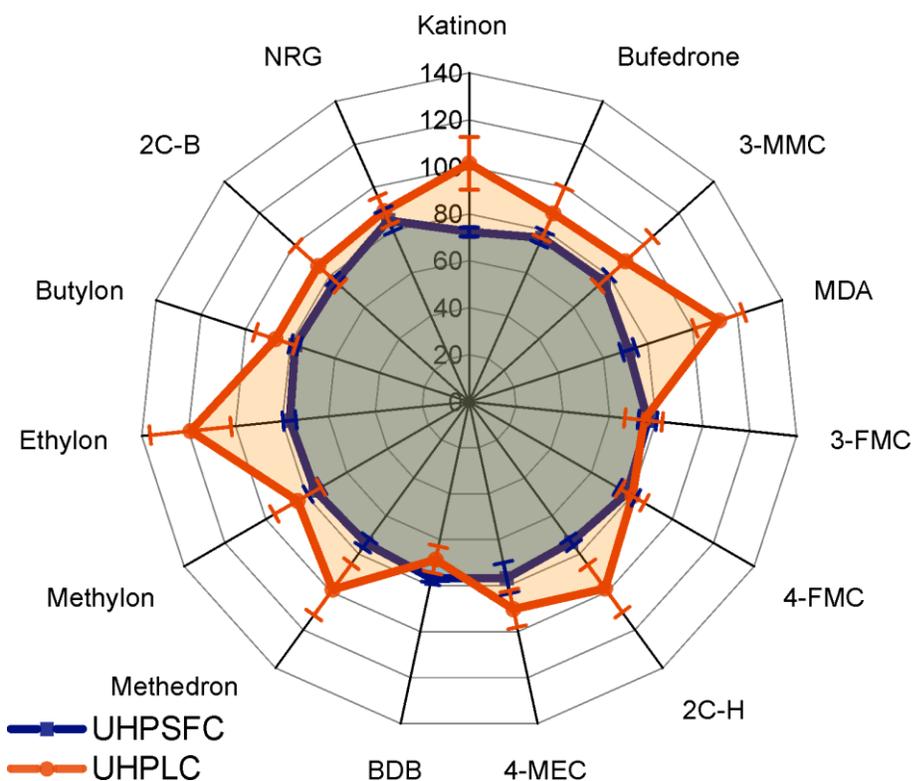


Obr. 25: Matriční efekty u techniky UHPSFC-MS a UHPLC-MS. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce matričního efektu pro danou látku a všechny její koncentrační hladiny.

5.1.6. Výtěžnost

Stejně jako u matričního efektu, tak i u výtěžnosti UHPSFC poskytovala bližší hodnoty pro různé látky. Průměrná výtěžnost (RE) byla 76 % a celkově se pro UHPSFC techniku pohybovala v rozmezí 71 až 85 % (Obr. 26, Tab. AI a Tab. AII v příloze). Nebyly pozorovány žádné významnější změny výtěžnosti v závislosti na koncentraci, jak dokládají malé chybové úsečky v grafu na Obr. 26. Průměrná hodnota RSD výtěžnosti pro všechny analyty a všechny koncentrační úrovně byla 4,1 %. U UHPLC byla většinou dosažena vyšší výtěžnost než u UHPSFC (v průměru 91 %), avšak v širším intervalu od 69 % do 119 % (Obr. 26, Tab. AI a Tab. AII v příloze). U většiny sloučenin (katinon, 2C-H, bufedron, 3-MMC, 3-FMC, 4-MEC, methedron, methylon, bytylon) výtěžnost klesala se zvyšující se koncentrací. Rozdíly ve výtěžnosti mezi nejnižšími a nejvyššími body kalibrační závislosti byly u uvedených

sloučenin vyšší než 20 %. Tato závislost RE na koncentraci může negativně ovlivnit kvantifikaci NPS. Průměrná hodnota RSD výtěžnosti byla pro veškeré analyty a všechny koncentrační úrovně 11,6 %, což je téměř trojnásobně vyšší hodnota než v případě techniky UHPSFC. Rozdíly ve výtěžnosti mezi technikami UHPSFC a UHPLC zjevně souvisely s použitím rozdílného rozpouštědla při zpracování vzorků. Stejně jako u matričního efektu, tak i v případě výtěžnosti jsou kompaktnější výsledky získané technikou UHPSFC příznivější pro použití neznačeného vnitřního standardu.



Obr. 26: Výtěžnost pro UHPSFC-MS a UHPLC-MS. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce výtěžností pro danou látku a všechny její koncentrační hladiny.

5.1.7. Přenos analytu do následných analýz (carryover)

Přenos analytu do následné analýzy byl v případě UHPLC vždy nižší než LOD. V UHPSFC byl pro katinon a 2C-B přibližně 120 % LOQ a 45-80 % LOQ pro MDA, 2C-H, methedron a methylon (Tab. AIII v příloze). Při druhém nástřiku slepého vzorku byl přenos pod LOD u všech analytů i u UHPSFC. Méně účinný oplach systému superkritické fluidní

chromatografie může být způsoben slabší eluční silou mobilní fáze. Přesto i nejvyšší přenos pozorovaný u katinonu odpovídá méně než 0,4 % nastříkovaného množství (ULOQ bylo 5000 ng/ml, nástřik 5 μ l). K minimalizování přenosu je vhodné analyzovat vzorky od nejnižší po nejvyšší koncentraci nebo proložit sekvenci analyzovaných vzorků nástřikem slepých vzorků, to však prodlužuje celkovou dobu analýzy.

5.1.8. Závěr

Pro stanovení patnácti nových psychoaktivních látek v moči byly navrženy a validovány dvě jednoduché a rychlé metody, UHPLC a UHPSFC. Přestože pro úpravu vzorků moči byl použit jednoduchý postup „zředit-zfiltrovat-analyzovat“, validační parametry výtěžnost i matriční efekt se pohybovaly v akceptovatelném rozmezí. Metoda založená na UHPSFC poskytovala z hlediska těchto dvou parametrů kompaktnější výsledky, zatímco u UHPLC metody byly pozorovány větší odchylky pro různé látky a koncentrační úrovně. V případě UHPSFC docházelo na vyšších koncentračních hladinách k pozorovatelnému přenosu analytu do následné analýzy, čemuž lze zamezit proložením sekvence nástřikem slepého pokusu.

Separace izomerů byla úspěšnější při použití UHPSFC, kde se uplatňují polární interakce ve stacionární fázi, což přispělo k izomerní selektivitě ve srovnání s nepolární stacionární fází v UHPLC. Systém UHPSFC se v tomto kontextu více podobá kapalinové chromatografii na normálních fázích, přičemž je však přídatkem pomocné kapaliny dosaženo lepší kompatibility s ionizací elektrosprejem.

S ohledem na omezenou dostupnost či přímo nedostupnost standardů NPS značených stabilními izotopy se jako vhodnější jeví metoda založená na UHPSFC, která poskytla podobné matriční efekty a zejména výtěžnosti pro různé NPS. Jedna ze studovaných látek (např. methylon) může být zvolena jako interní standard pro stanovení ostatních studovaných NPS.

5.2. Analýza nových psychoaktivních látek pomocí spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií

Materiály uvedené v této části jsou součástí diplomových prací Sandry Benické s názvem „Iontová pohyblivost s hmotnostní spektrometrií ve forenzní analýze“ a Jany Ondruchové s názvem „Účinný srážkový průřez při identifikaci drog spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií“, některé části byly rovněž prezentovány na workshopech, přednáškách a formou plakátových sdělení. U obou zmíněných diplomových prací byla autorka disertační práce konzultantkou a podílela se na měření, vyhodnocování a korekturách textů. Podílela se taktéž na přípravě výše zmíněných prezentací.

5.2.1. Vliv volby driftového plynu na iontově mobilní separaci vybraných nových psychoaktivních látek

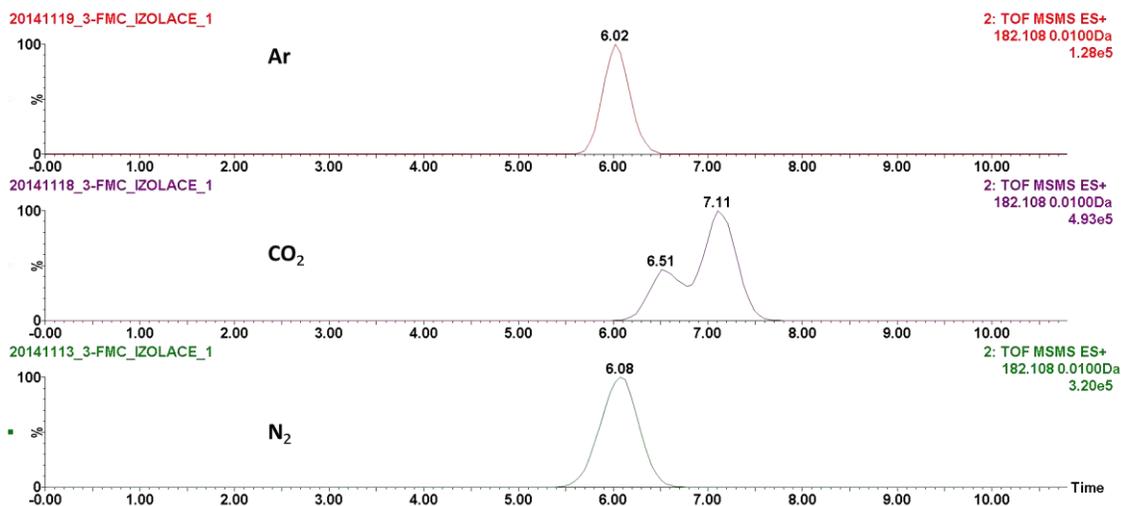
Spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IM-MS) bylo využito při analýze 18 NPS, jejichž struktury jsou uvedeny na Obr. 19 a 20. Pozornost byla věnována především izobarickým a izomerním směsím těchto látek. Sledován byl vliv změny driftového plynu (N_2 , Ar a CO_2) na selektivitu separace NPS. V Tab. VI jsou shrnuty zjištěné driftové časy. Přestože se driftové časy pro jednotlivé izomerní látky a jejich směsi mírně liší, zlepšení rozlišení změnou driftového plynu často není dostačující a látky nelze ve směsi odseparovat. Největší rozdíl v driftovém čase (nejlepší rozlišení) vůči izobarickým látkám (3-FMC a 4-FMC) lze pozorovat pro 2C-H v N_2 .

Tab. VI. Driftové časy izomerních a izobarických NPS ve třech plynech.

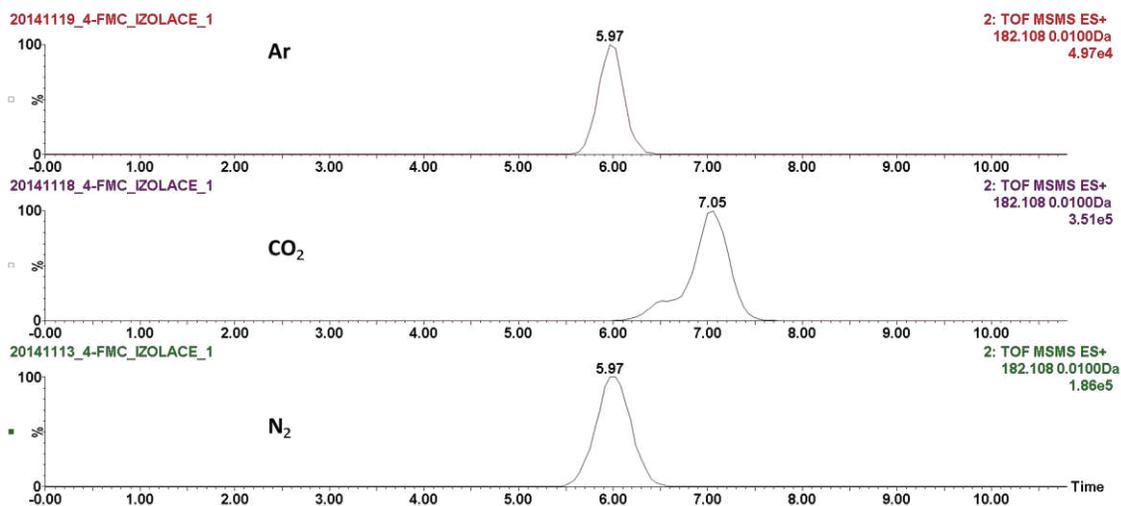
Látka	Driftový čas v N_2	Driftový čas v Ar	Driftový čas v CO_2
butylon	7,32	7,38	8,03
ethylon	7,38	7,43	7,92
3-MMC	6,35	6,35	7,11
bufedron	6,13	6,13	6,78
3-FMC	6,08	6,02	7,11
4-FMC	6,02	5,97	7,05
2C-H	6,51	N/A	7,27
BDB	6,78	N/A	7,65
methedron	6,67	6,56	7,43

Při srovnání mobilitních profilů daných látek v různých driftových plynech (např. izomery 3-FMC a 4-FMC Obr. 27 A, B) lze v případě CO₂ pozorovat štěpení píků, které lze přisoudit různým konformerům případně protomerům dané látky. Dusík poskytoval širší píky než Ar, což při srovnatelném driftovém čase rovněž naznačuje přítomnost více konformerů nebo protomerů.

A)



B)



Obr. 27: Mobilitní profily v různých driftových plynech A) 3-FMC a B) 4-FMC.

5.2.2. Určování účinného srážkového průřezu

Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií byla dále použita ke zjišťování charakteristické veličiny – účinného srážkového průřezu (neboli collision cross section; CCS). Účinný srážkový průřez nových psychoaktivních látek byl určován na přístroji s mobilitní celou TWIMS (iontová mobilita s využitím putující vlny), která vyžaduje kalibraci.

Kalibrace přístroje byla provedena na dva typy kalibrantů – polyalanin a směs nízkomolekulárních látek [77]. Polyalanin poskytuje jednonásobně nabitě oligomery, které pokrývají rozsah m/z 231 – 799 a rozsah CCS 150 – 464 Å². Je vhodný pro pozitivní i negativní mód. Druhým testovaným kalibrantem byla směs nízkomolekulárních látek obsahující acetaminofen, alprenolol, N-ethylanilín, clozapin-N-oxid, kolchicin, ondasetron, reserpin a verapamil, jejichž rozsah m/z 122 – 609 dobře pokrývá rozsah m/z testovaných psychoaktivních látek. Účinný srážkový průřez (CCS) této směsi je v rozmezí 124,5 – 254,2 Å².

V případě obou kalibrantů je důležité nastavení rychlosti vlny tak, aby se celý rozsah mobilitních píků (celá obálka) kalibrantu nacházel v jednom mobilitním okně. Při špatném nastavení rychlosti vlny přecházejí mobilitní píky kalibrantu do dalšího mobilitního okna, což vede k chybným výsledkům. U obou kalibrantů byla zvolena rychlost vlny 700 m/s. Vždy byl změřen kalibrant (měření I), následně vzorek v 6-ti opakováních a znovu kalibrant (měření II). CCS byla vyhodnocována na obě kalibrační měření. Výsledky byly využity pro srovnání vhodnosti kalibračních směsí, testování přidávání automaticky nedetekovaných signálů kalibrantu (důvodem byla nízká intenzita) a korelace mezi těmito dvěma kalibranty. Data byla vyhodnocována v programu DriftScope. V případě obou kalibrantů získané hodnoty spolu dobře korelovaly. Přidání píků o nízké intenzitě hrálo větší roli při použití směsi nízkomolekulárních látek jakožto kalibrantu. Je vhodné přidat vždy všechny kalibrační body, které jsou k dispozici, aby byl kalibrantem co nejlépe pokryt interval měřených hodnot CCS kalibrantem.

Postup byl následně aplikován k zjištění hodnot CCS, které mohou být vhodnou dodatečnou charakteristikou látky doplňující informace získané z hmotnostního spektra. V Tab. VII jsou shrnuty výsledky pro modelovou směs. Hodnoty CCS získané při analýze jednotlivých psychoaktivních látek (modelové standardy) jsou prakticky shodné s hodnotami získanými pro danou látku ve směsi (modelové vzorky), byť byly měřeny s časovým odstupem 16 dnů. Podobně lze očekávat shodu mezi standardy a reálnými vzorky.

Tab. VII. Hodnoty CCS pro nové psychoaktivní látky v modelové směsi měřené na kalibrant Polyalanin.

	analyzovaná látka	CCS (Å²) pro standardy	CCS (Å²) Zjištěné při analýze ve směsi Kalibrant I	R²	CCS (Å²) Zjištěné při analýze ve směsi Kalibrant II	R²
směs 5-ti látek	3-FMC	141,40	140,01±0,02	0,9985	138,83±0,02	0,9906
	butylon	153,17	151,89±0,03		150,79±0,03	
	katinon	133,90	134,26±0,12		133,03±0,12	
	NRG	177,17	177,81±0,12		176,98±0,12	
	EPH	161,50	161,62±0,08		160,63±0,08	

5.2.3. Závěr

Byl testován vliv druhu driftového plynu pro iontově mobilní separaci izobarických a izomerních látek. Driftové časy se pro jednotlivé izomerní látky a jejich směsi lišily pouze mírně a nebylo dosaženo potřebného rozlišení vrcholů překrývajících se píků. Iontově mobilní separací se nepodařilo látky ve směsi rozlišit. Vzhledem k dobré opakovatelnosti/stabilitě profilů mobilních píků byl navržen nový postup zabývající se rozlišením překrývajících se mobilních píků. O této problematice pojednává kap. 5.3., kde je testován nový postup na modelových směsích oligosacharidů kyseliny hyaluronové.

Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní detekcí byla použita k určování účinného srážkového průřezu na přístroji s mobilní celou TWIMS. Významným parametrem nastavení byla rychlost vlny, jelikož při jejím špatném nastavení dochází k přechodu mobilních píků kalibrantu do dalšího mobilního okna, což vede k chybným výsledkům. Byl testován druh kalibrantu, přidávání automaticky nedetekovaných signálů kalibrantu a korelace mezi těmito dvěma kalibranty. Následně byl postup aplikován na modelovou směs pěti látek, pro kterou byly zjištěny hodnoty CCS. Hodnoty CCS pro jednotlivé standardy látek se dobře shodovaly s hodnotami získanými při analýze směsi, což ukazuje na potenciál CCS při identifikaci látek, kdy je možné porovnávat CCS neznámé látky se standardem.

5.3. Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků

Materiály uvedené v této části byly zveřejněny v publikaci: L. Borovcová, M. Hermannová, V. Pauk, M. Šimek, V. Havlíček, K. Lemr, *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, *Anal. Chim. Acta* 981 (2017) 71–79. [91]

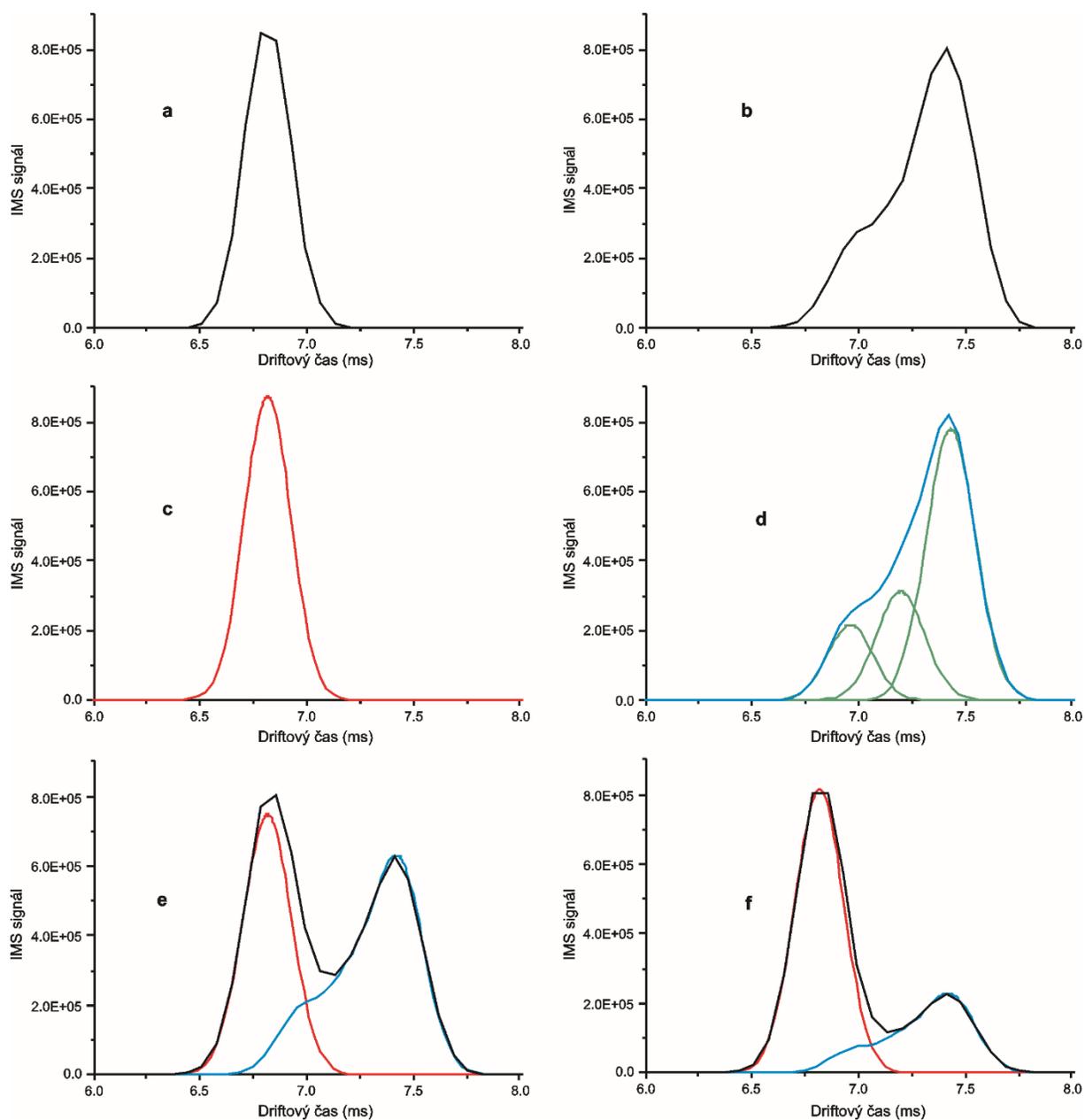
5.3.1. Opakovatelnost driftových časů

Prokázaná dobrá opakovatelnost driftového času a tvaru ATD profilů (mobilitních píků) byla potřebným předpokladem pro námi nově navržený postup umožňující rozlišit analyty nedostatečně separované iontovou mobilitou. Stabilita iontové mobilitní separace byla prokázána/testována na třech oligosacharidech (např. HA4AN Obr. B1 v příloze) při použití stejného přístroje a instrumentálního nastavení v pěti různých dnech. Relativní směrodatná odchylka (RSD) hodnot driftových časů byla $\leq 0,9$ %. ATD profily se překrývají a jsou dobře opakovatelné. Podobně stabilita driftových časů byla demonstrována na analýze sta pesticidů [118].

5.3.2. Postup zpracování dat, tvorba ATD funkce

Gaussovský ATD profil je možné získat pro sloučeniny poskytující ionty s pouze jedním geometrickým uspořádáním. Rozšířené a asymetrické ATD profily příslušející jedné sloučenině jsou známkou přítomnosti iontů lišících se v jejich geometrickém uspořádání. Každé z těchto uspořádání přispívá k vytvoření ATD profilu, který je možné popsat lineární kombinací Gaussovských funkcí. V ideálním případě se počet funkcí rovná počtu uspořádání.

Uváděný postup je vhodný ke zpracování mobilitních dat naměřených pro binární směsi, u nichž počet geometrických uspořádání nebyl znám. Postup zahrnoval celkem tři kroky: **1)** získání mobilogramů standardů (jejichž hmotnostní spektra mohou být shodná) nebo mobilogramů vykreslených pro jedinečné fragmentové ionty dané látky, čímž se obdrží ATD profil jednotlivých sloučenin (Obr. 28 a, b); **2)** každý profil je popsán jednou (Obr. 28 c) nebo několika Gaussovskými funkcemi (Obr. 28 d), Gaussovská funkce nebo kombinace těchto funkcí vytváří pro každou sloučeninu ATD funkci (F_{ATD}) (červená a modrá křivka na Obr. 28 c, d); **3)** získané ATD funkce jsou aplikovány na mobilogramy vzorků k určení plochy píku jednotlivých sloučenin v binární směsi (Obr. 28 e, f).

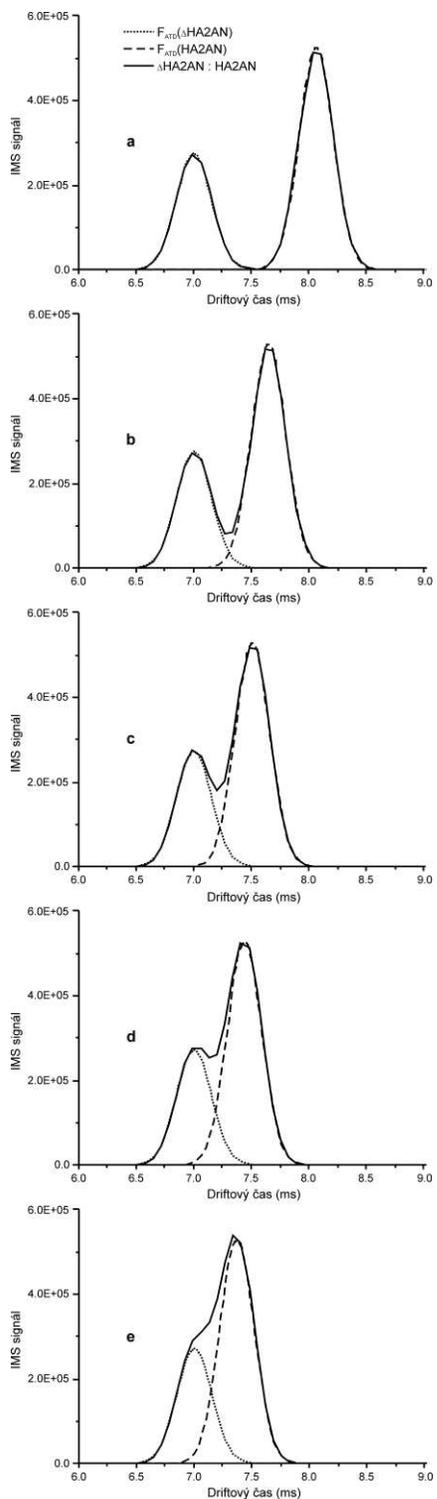


Obr. 28: Schéma zpracování dat: a), b) experimentální ATD profily (mobilogramy) měřené pro jednotlivé sloučeniny; c), d) popsání jednotlivých profilů jednou (c) nebo několika (v tomto případě třemi – zelená křivka) (d) Gaussovskými funkcemi a vytvořené ATD funkce (červená a modrá křivka); e), f) použití vytvořené ATD funkce na experimentální mobilogramy odpovídající dvěma binárním směsím o různých poměrech sloučenin.

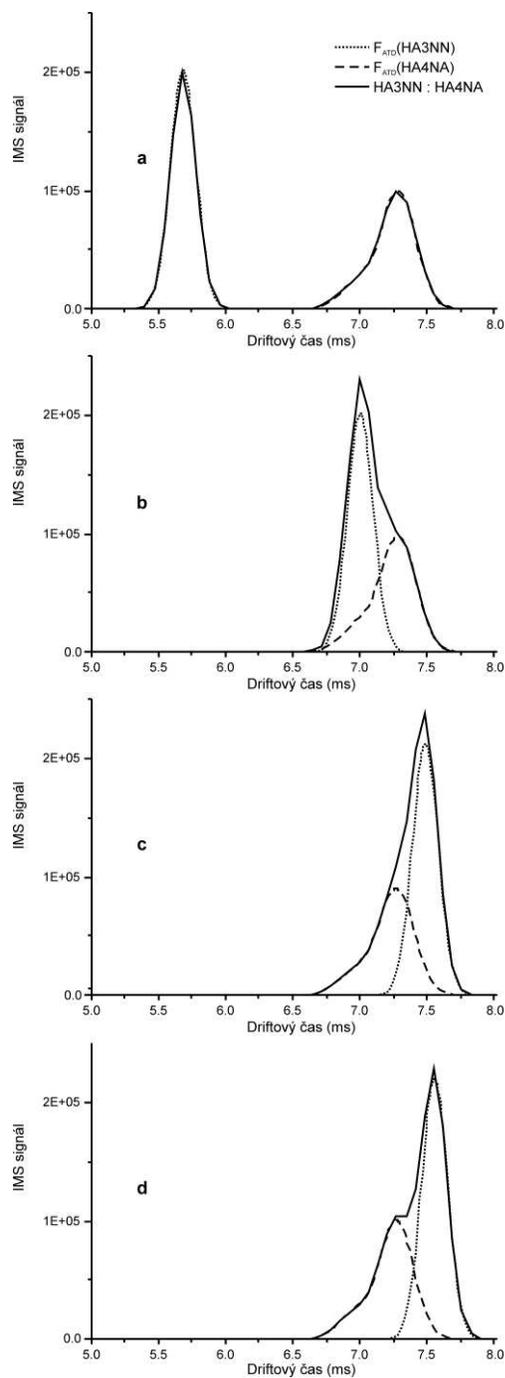
5.3.3. Aplikace ATD funkce na modelové směsi

Výše uvedený postup byl testován na modelových směsích (Δ HA2AN : HA2AN a HA3NN : HA4NA) s manuálním posunem/překryvem vrcholů píků (viz experimentální část). Při tomto testování byly použity směsi látek, které se lišily hodnotami m/z. Jejich mobilogramy tak mohly být extrahovány/vykresleny a nezávisle integrovány, čímž byla získána plocha píku pro každý oligosacharid ve směsi. Plochy pak byly porovnány s hodnotami získanými aplikací ATD funkcí. Složky Δ HA2AN a HA2AN vykazovaly symetrické ATD profily. Oba z těchto profilů byly dobře popsány pouze jednou Gaussovskou funkcí, která v těchto případech byla rovněž jejich ATD funkcí (Obr. 29). ATD funkce byly aplikovány na binární modelovou směs obsahující Δ HA2AN a HA2AN, přičemž byla modelována různá míra separace výše zmíněným posunem dat (Obr. 29 a-e). Aplikací testované metody se podařilo prokázat přítomnost obou oligosacharidů i v případě mobilogramu s jedním maximem (Obr. 29 e, stejně tak Obr. 30 b, c). Popisovaným postupem bylo dosaženo dobrých výsledků pro různě se překrývající píky oligosacharidů. Ve všech stupních separace bylo docíleno dobré korelace mezi plochami získanými na základě fitování a hodnotami získanými integrací mobilitních píků ($R^2 \geq 0.9995$, směrnice~1) (Obr. B2 v příloze).

Druhá modelová směs se skládala z oligosacharidů HA3NN a HA4NA (Obr. 30). Symetrický profil HA3NN byl popsán jednou Gaussovskou funkcí a asymetrický profil HA4NA dvěma Gaussovskými funkcemi, které vytvořili jednu výslednou ATD funkci $F_{ATD}(HA4NA)$. Opět pro všechny modelované separace bylo dosaženo dobré korelace mezi plochami získanými na základě fitování a hodnotami získanými integrací mobilitních píků ($R^2 \geq 0.9985$, směrnice~1) (Obr. B3 v příloze). Z hlediska separace se jednalo o podobné případy jako u směsi Δ HA2AN : HA2AN. Jak však lze vidět z Obr. 29 e, 30 b vlivem (a)symetrie ATD profilů se překryvy pro studované látky lišily. Např. na Obr. 30 b lze pozorovat vliv frontování profilu HA4NA, který více zasahuje do profilu druhé složky směsi oproti překryvu symetrických Gaussovských profilů v případě první testované směsi Δ HA2AN : HA2AN.

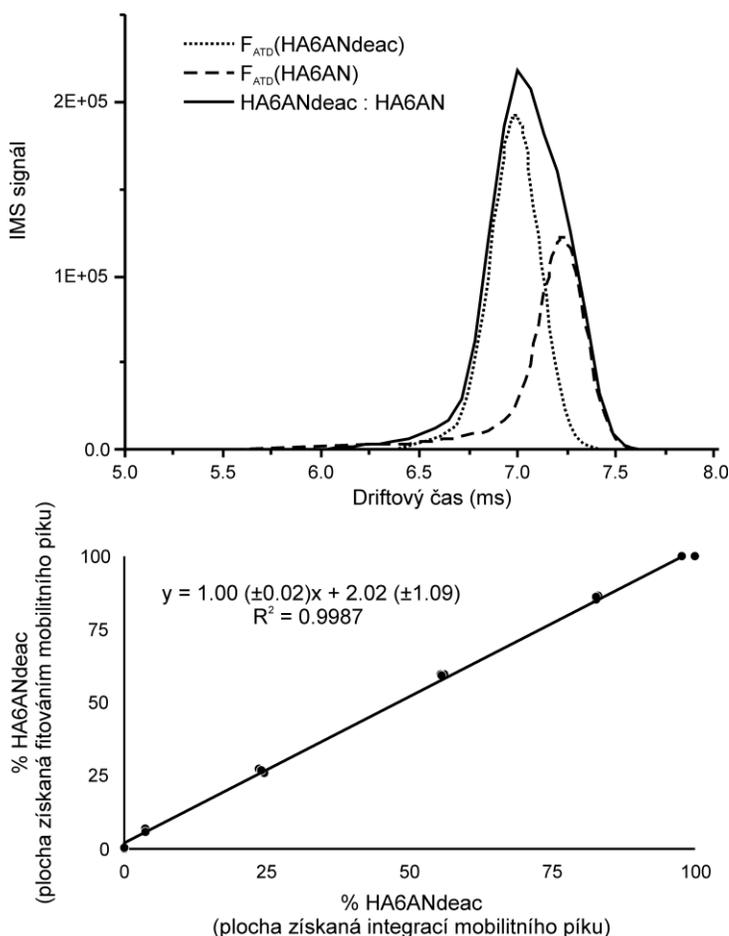


Obr. 29: Modelové iontově mobilitní separace směsi Δ HA2AN : HA2AN (50:50, w/w). Aplikován byl posun mobilogramu HA2AN (v binech) a) 11, b) 5, c) 3, d) 2, e) 1. ATD funkce byly získány pomocí standardů Δ HA2AN (m/z 378,081) a HA2AN (m/z 396,096).



Obr. 30: Modelové iontově mobilitní separace směsi HA3NN : HA4NA (50:50, w/w). Aplikován byl posun HA3NN (v binech) a) 0, b) 19, c) 26, d) 27. ATD funkce byly získány pomocí standardů HA3NN (m/z 599,164) a HA4NA (m/z 775,182).

Dalším příkladem je směs obsahující oligosacharidy HA6ANdeac a HA6AN, která poskytovala pouze jeden mírně deformovaný pík (Obr. 31). K popsání ATD profilů jednotlivých složek (měření standardů) bylo využito dvou respektive pěti Gaussovských funkcí. Aplikace ATD funkcí $F_{ATD}(HA6ANdeac)$ a $F_{ATD}(HA6AN)$ umožnila odhalit příspěvek obou oligosacharidů tomuto jednomu píku. Podobně jako v obou předchozích případech se ionty oligosacharidů lišily hodnotou m/z , což umožnilo nezávisle integrovat jejich mobilogramy. Výsledky získané integrací a fitováním dobře korelovaly ($R^2 = 0.9987$, směrnice ~ 1 , Obr. 31).

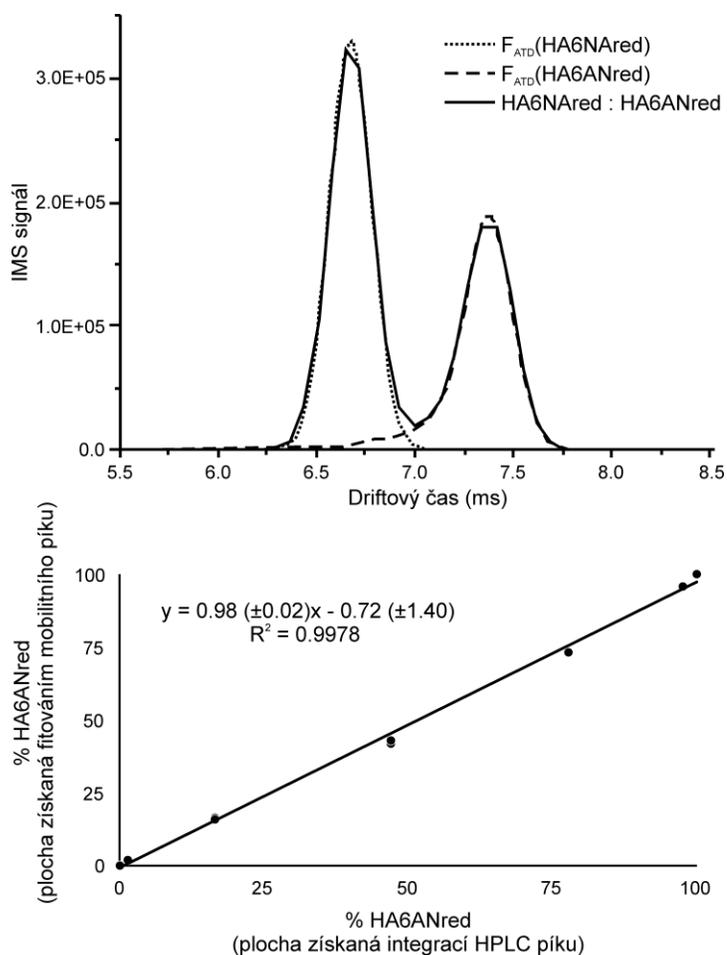


Obr. 31: Mobilogram směsi HA6ANdeac (m/z 1112,302) : HA6AN (m/z 1154,316) (50:50, w/w). Lineární korelace poměrů plochy píku HA6ANdeac ku celkové ploše. Poměry byly vypočteny z dat získaných fitováním a integrací. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.

Jak je již uvedeno u výše popsaných příkladů, výsledné ATD funkce složek binárních směsí byly aplikovány na vzorky s různým zastoupením složek (0:100, 5:95, 25:75, 50:50, 75:25, 95:5 a 100:0). V případě nízkého obsahu minoritní složky ($\leq 5\%$) nacházející se v hůře separované binární směsi dochází ke zhoršení její detekovatelnosti i korelace mezi plochou této složky získanou pomocí fitování a integrací mobilních píků. Pro vyšší plochy minoritní složky zjištěné plochy vzájemně dobře korelovaly u všech tří směsí (Δ HA2AN : HA2AN; HA3NN : HA4NA; HA6ANdeac : HA6AN, viz Obr. 31 a Obr. B2, B3, Tab. BI v příloze). Zjištěné plochy složek může rovněž ovlivnit tvar ATD profilů. Například na Obr. 30 d (posun o 27 binů) nebyla fitováním při nízkém obsahu detekována složka HA4NA (Tab. BI v příloze). Zatímco při posunu o 19 binů (Obr. 30 b) se tuto složku i při jejím nízkém obsahu podařilo detekovat. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben lepším rozpoznáním překryvu frontující části než sestupné části píku HA4NA s píkem HA3NN. Vlivy jako nízký obsah složky, horší separace a také tvar ATD profilu vedou k obtížnější detekci a mohou způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky. Přesto se minoritní složku podařilo v řadě vzorků detekovat (Tab. BI v příloze).

5.3.4. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi

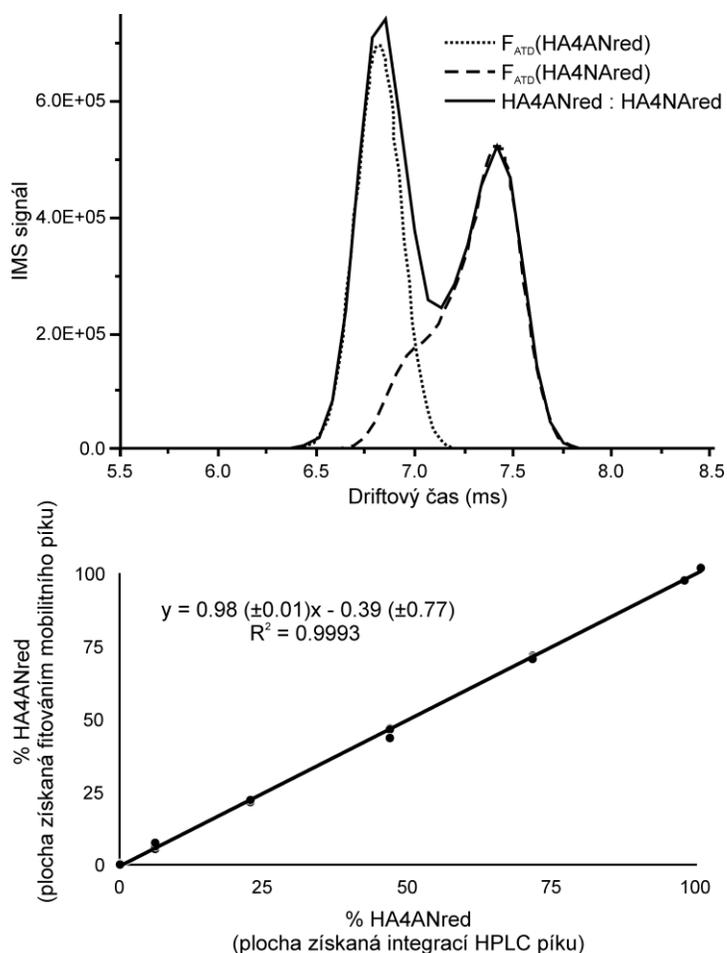
Po provedení testů na modelových směsích byl výše popsaný postup aplikován také na analýzu směsí izomerů oligosacharidů. První izomerní směs tvořily oligosacharidy HA6NAred : HA6ANred, které byly mobilně poměrně dobře separovány (Obr. 32). Profil HA6NAred byl popsán jednou Gaussovskou funkcí a profil HA6ANred pěti funkcemi. Plochy píků složek získané fitováním byly srovnány s hodnotami z integrací mobilních i HPLC dat. V případě integrace mobilních dat (aplikována integrace ke kolmici) byla plocha HA6NAred nadhodnocena v důsledku frontování druhého píku (HA6ANred). Nadhodnocení lze doložit srovnáním poměrů ploch složek. HPLC data poskytla poměr ploch izomerů 22,2 : 77,8. Integrací mobilogramu byl získán poměr 31,8 : 68,2 a testovaným postupem 26,9 : 73,1. Z výsledků je patrné, že poměr získaný námi navrženým postupem byl bližší HPLC separaci, kdy jsou izomery zcela separovány. Výsledky získané na základě fitování dobře korelovaly s výstupy z HPLC ($R^2 = 0.9978$, Obr. 32).



Obr. 32: Mobilogram izomerní směsi (HA6NAred : HA6ANred, 50:50 w/w) pro $m/z=1157,405$. Lineární korelace poměrů plochy píku HA6ANred ku celkové ploše směsi. Poměry byly vypočteny z dat získaných fitováním a HPLC. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.

Separace druhé testované směsi obsahující izomery HA4ANred a HA4NAred již nebyla úplná (Obr. 33). Profil první složky (HA4ANred) byl popsán jednou Gaussovskou funkcí a profil druhé (HA4NAred) třemi. Stejně jako v případě první izomerní směsi i zde bylo dosaženo větší shody mezi poměry ploch jednotlivých izomerů ve směsi získanými HPLC separací 22,5 : 77,5 a fitováním 21,2 : 78,8. Integrace mobilogramu poskytla poměr 33,3 : 66,7. Důvodem vyšší shody je lepší rozlišení překrytých píků při použití fitování. Integrace mobilních dat je negativně ovlivněna nesouměrným profilem druhé složky (Obr. 33). HPLC separace izomerů na základní linii (chromatografické rozlišení 1,9 a vyšší) překonala metodu fitování zvláště v případě významně odlišných ploch jednotlivých složek. Analýza směsí

izomerních oligosacharidů však prokázala aplikovatelnost fitování i při významném překryvu mobilních píků (Tab. BII v příloze).



Obr. 33: Mobilogram izomerní směsi (HA4ANred : HA4NAred, 50:50 w/w) pro $m/z = 778,249$. Lineární korelace poměrů plochy píku HA4ANred ku celkové ploše směsi. Poměry byly vypočteny z dat získaných fitováním a HPLC. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.

5.3.5. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi při využití jedinečných fragmentových iontů

V předchozích kapitolách byly pro fitování využity ATD funkce generované na základě naměřených dat pro standardy. Vytvoření ATD funkcí je také možné pomocí mobilogramů vykreslených pro jedinečné fragmentové ionty příslušného izomeru. Postup vyžadoval dvě analýzy izomerní směsi: i) CID (kolizí indukovaná disociace) byla aplikována po mobilní

separaci s následným vykreslením ATD profilů pro hodnoty m/z jedinečných fragmentových iontů (podmínkou je dostatečná intenzita jejich signálu). Následným fitováním ATD profilů byly získány výsledné ATD funkce pro oba izomery. ii) Vytvořené ATD funkce byly poté použity na data stejného vzorku naměřeného bez CID. Takový postup umožňuje odlišit ATD profily a určit plochy pro izomery, u kterých nejsou k dispozici standardy.

Oba přístupy, jak tvorba ATD funkcí na standardech, tak pomocí jedinečných fragmentových iontů, byly testovány na dvou binárních izomerních směsích o třech různých poměrech (Tab. VIII). Získané výsledky vykazují dobrou shodu.

Tab. VIII: Poměry ploch píků stanovené HPLC a dvěma přístupy fitování mobilních píků pro různé poměry izomerů.

Izomerní směs	HPLC ^a	Fitování (standardů) ^{a,b}	Fitování (jedinečných fragmentových iontů) ^{a,c}
HA4ANred : HA4NAred	27,1 : 72,9 (0,2)	25,6 : 74,4 (0,4)	25,3 : 74,7 (0,6)
HA4ANred : HA4NAred	69,2 : 30,8 (0,1)	67,9 : 32,1 (0,2)	67,5 : 32,5 (0,2)
HA4ANred : HA4NAred	97,5 : 2,5 (0,1)	96,5 : 3,5 (0,2)	96,4 : 3,6 (0,1)
HA6ANred : HA6NAred	76,5 : 23,5 (0,5)	78,9 : 21,1 (0,3)	78,0 : 22,0 (0,3)
HA6ANred : HA6NAred	27,3 : 72,7 (0,6)	32,3 : 67,7 (0,2)	30,0 : 70,0 (0,2)
HA6ANred : HA6NAred	2,0 : 98,0 (0,1)	3,7 : 96,3 (0,1)	2,4 : 97,6 (0,1)

^a V závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky.

^b ATD funkce získaná pomocí standardů.

^c ATD funkce získaná pomocí jedinečných fragmentových iontů.

5.3.6. Závěr

Navržený jednoduchý postup pro určování plochy překrytých mobilních píků vychází z dobré opakovatelnosti driftového času a tvaru mobilního píku (ATD profilu). Tvar píku je popsán jednou nebo vícero Gaussovskými funkcemi a je získána tzv. ATD funkce pro jednotlivé složky v binárních směsích např. izomerů. K vyhodnocení byl použit program OriginPro 2015, avšak může být aplikován i jiný software umožňující stejnou analýzu píků. Fitování a tvorba

ATD funkce pomocí standardů dovoluže analyzovat směsi látek s identickými hmotnostními spektry. Identifikace a kvantifikace látek se stejným elementárním složením je příkladem aplikace, která je obtížná i pro hmotnostní spektrometry s velmi vysokou rozlišovací schopností. V případě nedostupnosti standardů lze tento postup použít, pokud složky ve směsi poskytují odlišné fragmentové ionty. Navržený postup, který byl aplikován na oligosacharidy odvozené od kyseliny hyaluronové, umožňuje prokázat minoritní složky ve směsi již od jejího zastoupení okolo 5 %. Lze jej uplatnit nejen při analýze oligosacharidů, ale také u dalších analytů špatně separovaných iontovou mobilitou.

6. ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byly v rámci předložené práce studovány a validovány dvě jednoduché a rychlé chromatografické metody, UHPLC a UHPSFC, pro stanovení 15 NPS v moči. K přípravě vzorků byl zvolen jednoduchý postup „zředit-zfiltrvat-analyzovat“. Metoda UHPSFC poskytovala kompaktnější výsledky v matričních efektech a výtěžnosti oproti UHPLC, avšak na vyšších koncentračních hladinách docházelo k přenosu analytu do následné analýzy. Všechny dvojice izomerů psychoaktivních látek se podařilo úspěšně separovat jen technikou UHPSF. Pomocí UHPLC se nepodařilo rozlišit izomery 3-FMC a 4-FMC. Z důvodu nedostupnosti standardů NPS značených stabilními izotopy se UHPSFC jeví jako vhodnější technika, a to díky podobnějším matričním efektům a výtěžnostem pro různé NPS.

Rovněž byla studována separace NPS pomocí iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií, včetně určování hodnot CCS pro tyto látky. Testován byl vliv druhu driftového plynu k rozlišení izomerních látek. Driftové časy těchto párů byly ve všech plynech velice podobné a nepodařilo se látky dostatečně odseparovat. Ukázána však byla možnost využít CCS jako charakteristiku dané látky.

Dobrá opakovatelnost iontové mobilitních profilů dovolila navrhnout nový postup k určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků. Studovaný postup byl testován na oligosacharidech odvozených od kyseliny hyaluronové. Podařilo se prokázat jeho aplikovatelnost na nedostatečně separované binární směsi. Obecně jej lze uplatnit i na jiné látky než oligosacharidy.

Jedním z hlavních hledisek při vývoji analytických metod je jejich časová náročnost. Důraz kladený na rychlou identifikaci neznámé látky bývá podstatný zejména při určování intoxikace. Výše uvedené výsledky poukazují na možnosti rychlých separací především v oblasti analýzy toxikologicky nebo biologicky zajímavých látek.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] L. Nováková, A. G. -G. Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. I: Investigation of mobile phase and MS conditions*, Anal. Chim. Acta 853 (2015) 637–646.
- [2] L. Nováková, M. Rentsch, A. G. -G. Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples*, Anal. Chim. Acta 853 (2015) 647–659.
- [3] A. G. -G. Perrenoud, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds*, J. Chromatogr. A, 1266 (2012) 158–167.
- [4] S. Fekete, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice*, J. Chromatogr. A, 1408 (2015) 1–14.
- [5] Ch. Gourmel, A. G. -G. Perrenoud, L. Waller, E. Reginato, J. Verne, B. Dulery, J. -L. Veuthey, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillarme, *Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest*, J. Chromatogr. A, 1282 (2013) 172–177.
- [6] K. Plachká, L. Chrenková, M. Douša, L. Nováková, *Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities*, J. Pharm. Biomed. Anal. 125 (2016) 376–384.
- [7] V. Desfontaine, L. Nováková, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Liquid chromatography and supercritical fluid chromatography as alternative techniques to gas chromatography for the rapid screening of anabolic agents in urine*, J. Chromatogr. A, 1451 (2016) 145–155.

- [8] A. C. O. Costa, J. L. da Costa, F. G. Tonin, M. F. M. Tavares, G. A. Micke, *Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples*, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 140–143.
- [9] V. M. Rizelio, L. Tenfen, R. da Silveira, L. V. Gonzaga, A. C. O. Costa, R. Fett, *Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples*, Talanta 93 (2012) 62–66.
- [10] Y. Jiang, Y. Ma, *A Fast Capillary Electrophoresis Method for Separation and Quantification of Modified Nucleosides in Urinary Samples*, Anal. Chem. 81 (2009) 6474–6480.
- [11] J. F. Banks Jr., T. Dresch, *Detection of Fast Capillary Electrophoresis Peptide and Protein Separations Using Electrospray Ionization With a Time-of-Flight Mass Spectrometer*, Anal. Chem. 68 (1996) 1480–1485.
- [12] A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill Jr., *Ion mobility–mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 1–22.
- [13] M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications*, J. Chromatogr. A 1292 (2013) 2–18.
- [14] In the news, Trends Anal. Chem. 61 (2014) iv–x.
- [15] D. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure*, J. Sep. Sci 29 (2006) 1836–1848.
- [16] A. de Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gélébart, F. David, P. Sandra, *Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations*, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 60–69.
- [17] T. Farkas, G. Zhong, G. Guiochon, *Validity of Darcy's law at low flow-rates in liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 849 (1999) 35–43.
- [18] N. Wu, A. M. Clausen, *Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations*, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1167–1182.
- [19] G. Guiochon, *The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1126 (2006) 6–49.

- [20] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, *Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles*, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 57–71.
- [21] N. Tanaka, *Core-Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography*, Anal. Chem. 88 (2016) 279–298.
- [22] S. Deridder, G. Desmet, *Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part II: Numerical verification and quantitative effect of solid core on expected B-term band broadening*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 46–56.
- [23] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, *Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C₁₈-bonded silica materials*, J. Chromatogr. A, 1157 (2007) 289–303.
- [24] S. Fekete, J. Fekete, K. Ganzler, *Shell and small particles; Evaluation of new column technology*, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 64–71.
- [25] J. Ruta, D. Zurlino, C. Grivel, S. Heinisch, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest*, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 221–231.
- [26] G. Guiochon, F. Gritti, *Shell particles, trials, tribulations and triumphs*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 1915–1938.
- [27] F. Švec, J. M. J. Frechet, *Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media*, Anal. Chem. 64 (1992) 820–822.
- [28] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Anal. Chem. 68 (1996) 3498–3501.
- [29] D. K. Roper, E. N. Lightfoot, *Separation of biomolecules using adsorptive membranes*, J. Chromatogr. A, 702 (1995) 3–26.
- [30] S. Eeltink, B. Wouters, G. Desmet, M. Ursem, D. Blinco, G. D. Kemp, A. Treumann, *High-resolution separations of protein isoforms with liquid chromatography time-of-flight mass*

spectrometry using polymer monolithic capillary columns, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 5504– 5511.

[31] F. Detobel, K. Broeckhoven, J. Wellens, B. Wouters, R. Swart, M. Ursem, G. Desmet, S. Eeltink, *Parameters affecting the separation of intact proteins in gradient-elution reversed-phase chromatography using poly(styrene-codivinylbenzene) monolithic capillary columns*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3085–3090.

[32] K. Hormann, T. Müllner, S. Bruns, A. Höltzel, U. Tallarek, *Morphology and separation efficiency of a new generation of analytical silica monoliths*, J. Chromatogr. A 1222 (2012) 46–58.

[33] Onyx brochure, Phenomenex, staženo 5. ledna 2018

<https://www.brexbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/zhonyx.pdf>

[34] N. Wu, J. Dempsey, P. M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvrat, *Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using Monolithic Columns*, Anal. Chim. Acta, 2004, 523, 149–156.

[35] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, *Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1357 (2014) 36–52.

[36] J. P. Grinias, R. T. Kennedy, *Advances in and prospects of microchip liquid chromatography*, Trends Anal. Chem. 81 (2016) 110–117.

[37] M. F. Wahab, R. M. Wimalasinghe, Y. Wang, Ch. L. Barhate, D. C. Patel, D. W. Armstrong, *Salient Sub-Second Separations*, Anal. Chem. 2016, 88, 8821–8826.

[38] H. Chen, Cs. Horvath, *Rapid separation of proteins by RP-HPLC at elevated temperatures*, Anal. Methods Instrum. 1 (1993) 213–222.

[39] F. D. Antia, Cs. Horvath, *High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for the rapid separation of large molecules*, J. Chromatogr. 435 (1988) 1–15.

- [40] R. M. Smith, *Superheated water chromatography – A green technology for the future*, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 441–455.
- [41] S. Fekete, A. G. -G. Perrenoud, D. Guillarme, *Evolution and current trends in liquid and supercritical fluid chromatography*, Curr. Chromatogr. 1 (2014) 15–40.
- [42] D. R. Gere, *Supercritical fluid chromatography*, Science 222 (1983) 253–259.
- [43] A. G. -G. Perrenoud, J. Boccard, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: Attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility*, J. Chromatogr. A 1262 (2012) 205– 213.
- [44] Fast GC Brochure, staženo 5. ledna 2018
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t407096.pdf
- [45] C. Brunelli, C. Bicchi, A. Di Stilo, A. Salomone, M. Vincenti, *High-speed gas chromatography in doping control: Fast-GC and fast-GC/MS determination of b-adrenoceptor ligands and diuretics*, J. Sep. Sci. 29 (2006) 2765 – 2771.
- [46] S. Fekete, J. Schappler, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Current and future trends in UHPLC*, Trends Anal. Chem. 63 (2014) 2–13.
- [47] D. Guillarme, J. Schappler, S. Rudaz, J. -L. Veuthey, *Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry*, Trends Anal. Chem., 29 (2010) 15–27.
- [48] D. P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal, P. Singhal, P. S. Shrivastav, *Highly sensitive and rapid ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of nifedipine in human plasma and its application to a bioequivalence study*, Biomed. Chromatogr. 26 (2012) 1509–1518.
- [49] R. S. Plumb, W. B. Potts III, P. D. Rainville, P. G. Alden, D. H. Shave, G. Baynham, J. R. Mazzeo, *Addressing the analytical throughput challenges in ADME screening using rapid ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry methodologies*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 (2008) 2139–2152.
- [50] O. Lacina, P. Hradková, J. Pulkrabová, J. Hajšlová, *Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated*

alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 4312–4321.

[51] J. L. Martínez Vidal, A. G. Frenich, M. M. Aguilera-Luiz, R. Romero-González, *Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 2777–2790.

[52] M. E. Lame, E. E. Chambers, M. Blatnik, *Quantitation of amyloid beta peptides $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$, and $A\beta_{1-42}$ in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, Anal. Biochem. 419 (2011) 133–139.

[53] L. Nováková, V. Desfontaine, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Fast and sensitive supercritical fluid chromatography e tandem mass spectrometry multi-class screening method for the determination of doping agents in urine*, Anal. Chim. Acta 915 (2016) 102–110.

[54] V. Pauk, V. Žihlová, L. Borovcová, V. Havlíček, K. Schug, K. Lemr, *Fast separation of selected cathinones and phenylethylamines by supercritical fluid chromatography*, J. Chromatogr. A 1423 (2015) 169–176.

[55] Y. Zhou, Z. Du, Y. Zhang, *Simultaneous determination of 17 disperse dyes in textile by ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with tandem mass spectrometry*, Talanta 127 (2014) 108–115.

[56] H. H. Hill Jr., W. F. Siems, R. H. St. Louis, *Ion mobility spectrometry*, Anal. Chem. 62 (1990) 1201–1209.

[57] Ion Mobility Training brochure: 1. Overview, Waters (2012).

[58] F. Lanucara, S. W. Holman, Ch. J. Gray, C. E. Eyers, *The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics*, Nat. Chem. 6 (2014) 281–294.

[59] M. J. Cohen, F. W. Karasek, *Plasma Chromatography™—A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, J. Chromatogr. Sci. 8 (1970) 330–337.

- [60] R. Cumeras, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach, I. Gràcia, *Review on Ion Mobility Spectrometry. Part I: current instrumentation*, *Analyst* 140 (2015) 1376–1390.
- [61] C. Laphorn, F. Pullen, B. Z. Chowdhry, *Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry (IMS-MS) of Small Molecules: Separating and Assigning Structures to ions*, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013) 43–71.
- [62] Ch. Uetrecht, R. J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen, A. J. R. Heck, *Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies*, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1633–1655.
- [63] D. R. Hernandez, J. D. DeBord, M. E. Ridgeway, D. A. Kaplan, M. A. Park, F. Fernandez-Lima, *Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer*, *Analyst* 139 (2014) 1913–1921.
- [64] F. Fernandez-Lima, D. A. Kaplan, J. Suetering, M. A. Park, *Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer*, *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 14 (2011) 93–98.
- [65] K. Michelmann, J. A. Silveira, M. E. Ridgeway, M. A. Park, *Fundamentals of Trapped Ion Mobility Spectrometry*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 14–24.
- [66] R. Cumerasa, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach, I. Gràcia, *Review on Ion Mobility Spectrometry. Part I: Current Instrumentation*, *Analyst* 5 (2015)1376–1390.
- [67] <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004749en.pdf>, staženo 5. ledna 2018.
- [68] A. Karimi, N. Alizadeh, *Rapid analysis of captopril in human plasma and pharmaceutical preparations by headspace solid phase microextraction based on polypyrrole film coupled to ion mobility spektrometry*, *Talanta* 79 (2009) 479–485.
- [69] R. M. O'Donnell, X. Sun, P. de B. Harrington, *Pharmaceutical applications of ion mobility spektrometry*, *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 44–53.
- [70] M. D. Likar, G. Cheng, N. Mahajan, Z. Zhang, *Rapid identification and absence of drug tests for AG-013736 in 1 mg Axitinib tablets by ion mobility spectrometry and DARTTM mass spectrometry*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 569–573.
- [71] M. T. Jafari, *Determination and identification of malathion, ethion and dichlorovos using ion mobility spectrometry*, *Talanta* 69 (2006) 1054–1058.

- [72] T. Keller, A. Keller, E. Tutsch-Bauer, F. Monticelli, *Application of ion mobility spectrometry in cases of forensic interest*, *Forensic Sci. Int.* 161 (2006) 130–140.
- [73] M. T. Jafari, T. Khayamian, V. Shaer, N. Zarei, *Determination of veterinary drug residues in chicken meat using corona discharge ion mobility spectrometry*, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 147–153.
- [74] G. J. Dear, J. Munoz-Muriedas, C. Beaumont, A. Roberts, J. Kirk, J. P. Williams, I. Campuzano, *Sites of metabolic substitution: investigating metabolite structures utilising ion mobility and molecular modelling*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010; 24: 3157–3162.
- [75] F. Cuyckens, C. Wassvik, R. J. Mortishire-Smith, G. Treadern, I. Campuzano, J. Claereboudt, *Product ion mobility as a promising tool for assignment of positional isomers of drug metabolites*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25, 3497–3503.
- [76] P. Dwivedi, Ch. Wu, L. M. Matz, B. H. Clowers, W. F. Siems, H. H. Hill Jr., *Gas-Phase Chiral Separations by Ion Mobility Spectrometry*, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8200–8206.
- [77] I. Campuzano, M. F. Bush, C. V. Robinson, C. Beaumont, K. Richardson, H. Kim, H. I. Kim, *Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry: Comparison of Theoretical and Experimentally Derived Nitrogen Collision Cross Sections*, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1026–1033.
- [78] A. Mie, M. Jörntén-Karlsson, B. -O. Axelsson, A. Ray, C. T. Reimann, *Enantiomer Separation of Amino Acids by Complexation with Chiral Reference Compounds and High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry: Preliminary Results and Possible Limitations*, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2850–2858.
- [79] S. N. Jackson, M. Ugarov, T. Egan, J. D. Post, D. Langlais, J. A. Schultz, A. S. Woods, *MALDI-ion mobility-TOF MS imaging of lipids in rat brain tissue*, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1093–1098.
- [80] E. L. Harry, A. W. T. Bristow, I. D. Wilsonc, C. S. Creaser, *Real-time reaction monitoring using ion mobility-mass spectrometry*, *Analyst* 136 (2011) 1728–1732.

- [81] M. D. Howdle, Ch. Eckers, A. M. -F. Laures, C. S. Creaser, *The effect of drift gas on the separation of active pharmaceutical ingredients and impurities by ion mobility–mass spectrometry*, *Int. J. Mass Spectrom* 298 (2010) 72–77.
- [82] solidstatenmr.com/analysis.php, staženo 5. ledna 2018
- [83] W. Windig, J. Guilment, *Interactive self-modeling mixture analysis*, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425–1432.
- [84] P. de B. Harrington, E. S. Reese, P. J. Rauch, L. Hu, D. M. Davis, *Interactive selfmodeling mixture analysis of ion mobility spectra*, *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 808–816.
- [85] T. L. Buxton, P. de B. Harrington, *Rapid multivariate curve resolution applied to identification of explosives by ion mobility spectrometry*, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 269–282.
- [86] S. Lee, Z. Li, S. J. Valentine, S. M. Zucker, N. Webber, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *Extracted fragment ion mobility distributions: a new method for complex mixture analysis*, *Int. J. Mass Spectrom.* 309 (2012) 154–160.
- [87] F. Zhu, S. Lee, S. Valentine, J. Reilly, D. Clemmer, *Mannose7 glycan isomer characterization by IMS-MS/MS analysis*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 23 (2012) 2158–2166.
- [88] G. Vivó-Truyols, J. R. Torres-Lapasió, A. M. van Niderkassel, Y. Vander Heyden, D. L. Massart, *Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped chromatographic signals: Part II: Peak model and deconvolution algorithms*, *J. Chromatogr. A* 1096 (2005) 146–155.
- [89] M. Hermannová, A. -M. Iordache, K. Slováková, V. Havlíček, H. Pelantová, K. Lemr, *Arrival time distributions of product ions reveal isomeric ratio of deprotonated molecules in ion mobility mass spectrometry of hyaluronan derived oligosaccharides*, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 854–863.
- [90] C. Kune, J. Far, E. De Pauw, *Accurate drift time determination by traveling wave ion mobility spectrometry: the concept of the diffusion calibration*, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11639–11646.

- [91] L. Borovcová, M. Hermannová, V. Pauk, M. Šimek, V. Havlíček, K. Lemr, *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, *Anal. Chim. Acta* 981 (2017) 71–79.
- [92] J. P. Smith, O. B. Sutcliffe, C. E. Banks, *An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs)*. *Analyst* 140 (2015) 4932–4948.
- [93] World Drug Report 2017, staženo 5. ledna 2018
https://www.unodc.org/wdr2017/field/WDR_2017_presentation_launch_version.pdf
- [94] European Drug Report: *Trends and Developments*. Publications Office of the European Union, Luxembourg 2017, staženo 5. ledna 2018
<http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001ENN.pdf>
- [95] S. Karch, *Cathinone Neurotoxicity (“The “3Ms”)*, *Curr. Neuropharmacol.* 13 (2015) 21–25.
- [96] L. J. Marinetti, H. M. Antonides, *Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: Method development, drug distribution and interpretation of results*, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 135–146.
- [97] J. P. Kelly, *Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology*, *Drug Test. Anal.* 3 (2011) 439–453.
- [98] A. Namera, M. Kawamura, A. Nakamoto, T. Saito, M. Nagao, *Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones*, *Forensic Toxicol.* 33 (2015) 175–194.
- [99] L. Li, I. S. Lurie, *Screening of seized emerging drugs by ultra-high performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet and mass spectrometric detection*, *Forensic Sci. Int.* 237 (2014) 100–111.
- [100] L. Li, I. S. Lurie, *Regioisomeric and enantiomeric analyses of 24 designer cathinones and phenethylamines using ultra high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis with added cyclodextrins*, *Forensic Sci. Int.* 254 (2015) 148–157.
- [101] B. Waters, N. Ikematsu, K. Hara, H. Fujii, T. Tokuyasu, M. Takayama, A. Matsusue, M. Kashiwagi, S. ichi Kubo, S., *GC-PCI-MS/MS and LC-ESI-MS/MS databases for the detection*

of 104 psychotropic compounds (synthetic cannabinoids, synthetic cathinones, phenethylamine derivatives), *Leg. Med.* 20 (2016) 1–7.

[102] R. P. Archer, *Fluoromethcathinone, a new substance of abuse*, *Forensic Sci. Int.* 185 (2009) 10–20.

[103] K. Erina, T. Chikumoto, T. Hiroyuki, K. Kitaichi, T. Horiuchi, T. Ito, *Differentiation of the isomers of N-alkylated cathinones by GC-EI-MS-MS and LC-PDA*, *Anal. Sci.* 32 (2016) 831–837.

[104] L. Skultety, P. Fryčák, C. Qiu, J. Smuts, L. Shear-Laude, K. Lemr, J. X. Mao, P. Kroll, K. A. Schug, A. Szewczak, C. Vaught, I. Lurie, V. Havlíček, *Resolution of isomeric new designer stimulants using gas chromatography – Vacuum ultraviolet spectroscopy and theoretical computations*, *Anal. Chim. Acta* 971 (2017) 55–67.

[105] A. Takeda, T. Tagami, A. Asada, T. Doi, M. Kawaguchi, Y. Satsuki, Y. Sawabe, *Regioisomeric separation of ring-substituted cathinones by liquid chromatography–mass spectrometry with a naphthylethyl column*, *Forensic Toxicol.* 35 (2017) 399–407.

[106] S. Breitenbach, W. F. Rowe, B. McCord, I. S. Lurie, *Assessment of ultra high performance supercritical fluid chromatography as a separation technique for the analysis of seized drugs: Applicability to synthetic cannabinoids*, *J. Chromatogr. A* 1440 (2016) 201–211.

[107] S. Carnes, S. O'Brien, A. Szewczak, L. Tremeau-Cayel, W. F. Rowe, B. McCord, I. S. Lurie, *Comparison of ultra high performance supercritical fluid chromatography, ultra high performance liquid chromatography, and gas chromatography for the separation of synthetic cathinones*, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 3545–3556.

[108] L. Borovcová, V. Pauk, K. Lemr, *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, *J. Sep. Sci.* (2018) – v tisku DOI: 10.1002/jssc.201800006

[109] J. Velíšek, J. Hajšlová, *Chemie potravin I.*, OSSIS, Tábor, 2009.

[110] D. L. C. Nelson, M. M. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3th ed, Worth: New York, 2000 309.

- [111] W. S. Turner, E. Schmelzer, R. McClelland, E. Wauthier, W. Chen, L. M. Reid, *Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels*, *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 82 (2007) 156–168.
- [112] X. Jia, Y. Yeo, R. J. Clifton, T. Jiao, D. S. Kohane, J. B. Kobler, S. M. Zeitels, R. Langer, *Hyaluronic acid-based microgels and microgel networks for vocal fold regeneration*, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3336–3344.
- [113] M. Zhu, B. Bendiak, B. Clowers, H. H. Hill Jr., *Ion mobility-mass spectrometry analysis of isomeric carbohydrate precursor ions*, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1853–1867.
- [114] S. Lee, T. Wyttenbach, M. T. Bowers, *Gas phase structures of sodiated oligosaccharides by ion mobility/ion chromatography methods*, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* 167/168 (1997) 605–614.
- [115] H. Li, B. Bendiak, W. F. Siems, D. R. Gang, H. H. Hill, *Ion mobility mass spectrometry analysis of isomeric disaccharide precursor, product and cluster ions*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 2699–2709.
- [116] M. Fasciotti, G. B. Sanvido, V. G. Santos, P. M. Lalli, M. McCullagh, G. F. de Sá, R. J. Daroda, M. G. Peter, M. N. Eberlin. *Separation of isomeric disaccharides by traveling wave ion mobility mass spectrometry using CO₂ as drift gas*. *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 1643–1647.
- [117] H. Gu, G. Liu, J. Wang, A. -F. Aubry, M. E. Arnold, *Selecting the Correct Weighting Factors for Linear and Quadratic Calibration Curves with Least-Squares Regression Algorithm in Bioanalytical LC-MS/MS Assays and Impacts of Using Incorrect Weighting Factors on Curve Stability, Data Quality, and Assay Performance*, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8959–8966.
- [118] S. Gosciny, L. Joly, E. De Pauw, V. Hanot, G. Eppe, *Travelling-wave ion mobility time-of-flight mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables*, *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 85–93.

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

- ACN** – acetonitril
- ATD** – arrival time distribution
- BDB** – 1,3-benzodioxolyl-butanamin
- BEH** – ethylene bridged hybrid
- CCS** – collision cross section, účinný srážkový průřez
- 2C-B** – 4-brom-2,5-dimethoxyfenylethylamin
- 2C-H** – 2,5-dimethoxyfenethylamin
- CID** – collision induced dissociation, kolizí indukovaná disociace
- CO** – přenos analytu do následných analýz, carryover
- CO₂** – carbon dioxide, oxid uhličitý
- DTIMS** – drift-time ion mobility spectrometry, iontově mobilitní spektrometrie v driftové trubici
- EI** – electron ionization, ionizace elektronem
- EPH** – ethylfenidát
- ESI** – electrospray, elektrosprej
- FAIMS** – field-asymmetric ion mobility spectrometry, iontově mobilitní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnou
- 3-FMC** – 3-fluoromethkatinon
- 4-FMC** – 4-fluoromethkatinon
- FWHM** – full width at half of maximum, šířka píku v polovině výšky
- GAG** – glykosaminoglykany
- GC** – gas chromatography, plynová chromatografie
- GlcA** – D-glukuronová kyselina
- GlcNAc** – N-acetyl-D-glukosamin
- HA** – kyselina hyaluronová
- HILIC** – hydrophilic interaction liquid chromatography, hydrofilní interakční chromatografie
- HPLC** – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- i. d.** – internal diameter, vnitřní průměr
- i-PrOH** – propan-2-ol

IM – ion mobility, iontová mobilita

IMS – ion mobility spectrometry, iontově mobilitní spektrometrie

LLOQ – lower limit of quantification, dolní limit kvantifikace

LOD – limit of detection, limit detekce

Log D – logarithm of distribution coefficient, logaritmus distribučního koeficientu

LOQ – limit of quantitation, limit kvantifikace

MALDI – matrix assisted laser desorption ionization, ionizace a desorpce laserem za účasti matrice

MDA – 3,4-methylenedioxyamfetamin

ME – matrix effect, matriční efekt

4-MEC – 4-methylethkatinon

MeOH – methanol

3-MMC – 3-methylmethkatinon

MRM – multi-reaction monitoring, sledování více reakcí

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandem mass spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie

MXE – methoxetamin

NAP – naftylethyl stacionární fáze

NMR – nuclear magnetic resonance, nukleární magnetické resonance

NPS – new psychoactive substances, nové psychoaktivní látky

NRG – nafyron

PEEK – polyether ether ketone, polyéter éter keton

pK_a – disociační konstanta

QqQ – triple quadrupole, trojitý kvadrupól

Q-TOF – quadrupole-time of flight, kvadrupól s průletovým analyzátozem

QUEChERS – quick easy cheap effective rugged safe, rychlý jednoduchý levný efektivní robustní bezpečný

R – resolution, rozlišení

R² – determination coefficient, koeficient determinace

RE – recovery, výtěžnost

RSD – relativní směrodatná odchylka

RT příp. t_r – retention time, retenční čas
S – směrnice kalibrační závislosti
SD – směrodatná odchylka
 σ – směrodatnou odchylku úseku na ose y
SIMPLISMA – Simple-to-use Interactive Self-modelling Mixture Analysis
SFC – supercritical fluid chromatography, superkritická fluidní chromatografie
SPE – solid phase extraction, extrakce tuhou fází
SPP – superficially porous particles, povrchově porézní částice
SRM – single reaction monitoring, sledování jedné/vybrané reakce
TIMS trapped ion mobility spectrometry, iontově mobilní spektrometrie se zachycením iontů
TOF – time of flight, průletový analyzátor
TWIMS – travelling-wave ion mobility spectrometry, iontově mobilní spektrometrie s pohybující se vlnou
UFHTLC – ultra fast high temperature liquid chromatography, ultra rychlá kapalinová chromatografie za zvýšené teploty
UHPLC – ultra-high performance liquid chromatography, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPSFC – ultra-high performance supercritical fluid chromatography, ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie
ULOQ – upper limit of quantification, horní limit kvantifikace
VUV – vacuum ultraviolet spectroscopy, vakuová ultrafialová spektroskopie
XFIDTD – Extracted Fragment Ion Drift Time Distributions, extrakce signálu fragmentových iontů v závislosti na driftovém čase

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: Lucie Borovcová
Adresa: Opavská 13, 748 01 Hlučín
Email: lucie.borovcova@volny.cz

VZDĚLÁNÍ

- 09/2012 – současnost
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie
- 2010 – 06/2012
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.
diplomová práce: „Studium ionizace opiátů pro hmotnostně spektrometrickou analýzu vzorku moči“
V rámci tohoto studijního oboru získáno osvědčení o absolvování rozšiřujícího studijního modulu „**Analytická chemie ve forenzních vědách**“.
- 2007 – 2010
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.
bakalářská práce: „Nanomateriály a nanotechnologie v analytické chemii“

STÁŽE

- 7 - 9/2014
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o. Získání praktických zkušeností v laboratoři kapalinové chromatografie – validace metod.

- 3 - 5/2014
Vědeckovýzkumná stáž – University of Vienna, Institute of Analytical Chemistry.
Vedoucí: prof. Dr. Andreas Rizzi. Strukturní analýza oligosacharidů získaných z glykoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.
- 8/2011, 8/2012, 7/2013
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o. Získání praktických zkušeností v laboratoři kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
- 3 - 12/2011
Účast v projektu *Praktické aspekty ve výuce analytické chemie*. Řešení modelového úkolu na téma „Vypracování validačního protokolu pro stanovení doprovodných látek ve vybrané aktivní farmaceutické substanci metodou HPLC“ zpracovaného ve společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o.

PROJEKTY

- Člen týmu – Univerzita Palackého jako komplexní vzdělávací instituce CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002337
- Člen týmu – Efektivní zpracování vzorků se složkami matrice, IGA_PrF_2018_027
- Člen týmu – Multimodální zobrazování, GA ČR, 16-20229S
- Člen týmu – Vzorkování a účinnost desorpce/ionizace za atmosférického tlaku při hmotnostně spektrometrickém experimentu, GA ČR, GAP206/12/1150
- Člen týmu – Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu, IGA_PrF_2015_020
- Člen týmu – Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe, CZ.1.07/2.2.00/28.0029
- Člen týmu – Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu, IGA_PrF_2014_031
- Člen týmu – Nové separační postupy pro zpracování analytických vzorků a jejich aplikace při vývoji fytofarmak, TA ČR, TA03010458

- Člen týmu – Desorpční nanoelektrosprej: instrumentace, povrchová analýza a zobrazování, COST, LD13005
- Člen týmu – Úprava vzorku při analýze složitých matric, IGA_PrF_2013_030

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- LS 2017/2018 – ACH/PAC (Cvičení z pokročilé analytické chemie – 7 hod./týd.)
 - ACH/SOP (Seminář oborová praxe – 1 hod./týd.)
 - ACH/OP (Oborová praxe – zajištění praxe)
- LS 2016/2017 – ACH/PAC (Cvičení z pokročilé analytické chemie – 7 hod./týd.)
 - ACH/SOP (Seminář oborová praxe – 1 hod./týd.)
 - ACH/OP (Oborová praxe – zajištění praxe)
- LS 2014/2015 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)
- LS 2012/2013 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)
- *Konzultant diplomové práce* Bc. Jany Ondruchové na téma: „Účinný srážkový průřez při identifikaci drog spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií“ – obhájeno květen 2016.
- *Konzultant diplomové práce* Bc. Kláry Hejtmánkové na téma: „Chromatografická analýza fotoiniciátorů v obalových materiálech jako možných kontaminantů potravin“ – obhájeno květen 2016.
- *Konzultant diplomové práce* Bc. Sandry Benické na téma: „Iontová pohyblivost s hmotnostní spektrometrií ve forenzní analýze“ – úspěšně obhájeno květen 2015.
- *Vedoucí bakalářské práce* Jany Ondruchové na téma: „Izolace a analýza účinných látek v rostlinném materiálu“ – obhájeno květen 2014.

PUBLIKACE

- **Borovcová L., Pauk V., Lemr K.,** *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800006

- **Borovcová L.**, Hermannová M., Pauk V., Šimek M., Havlíček V., Lemr K., *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, Anal. Chim. Acta 981 (2017) 71-79.
- Skopalová J., Barták P., Bednář P., Tomková H., Ingr T., Lorencová I., Kučerová P., Papoušek R., **Borovcová L.**, Lemr K., *Carbon fiber brush electrode as a novel substrate for atmospheric solids analysis probe (ASAP) mass spectrometry: Electrochemical oxidation of brominated phenols*, Anal. Chim. Acta 999 (2018) 60–68.
- Táborský J., Švidrnoch M., Kurka O., **Borovcová L.**, Bednář P., Barták P., Skopalová J., *Electrochemical oxidation of zopiclone*, Monatsh. Chem. 147 (2016) 53–60.
- Pauk V., Žihlová V., **Borovcová L.**, Havlíček V., Schug K., Lemr K., *Fast separation of selected cathinones and phenylethylamines by supercritical fluid chromatography*, J. Chromatogr. A 1423 (2015) 169–176.

KONFERENCE

- **Borovcová L.**, Fryčák P., Havlíček V., Lemr K., *Influence of pressure drop on signal in desorption nanoelectrospray mass spectra: Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2018*, Olomouc, ČR, 29. 1. – 1. 2. 2018 poster, abstrakt str. 68 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Pauk V., Thacker J., Bai L., Schug K., Lemr K., *Comparison of ultra-high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography methods for analysis of photoinitiators as potential food contaminants: HPLC 2017*, Praha, ČR, 18. – 22. 6. 2017, poster.
- **Borovcová L.**, Hartmanová L., Matušů T., Lorencová I., Havlíček V., Lemr K., *Drug analysis by desorption nanoelectrospray: 35th Informal Meeting on Mass Spectrometry*, Aussois, Francie, 7. – 11. 5. 2017, poster – abstrakt ve sborníku str. 54.
- **Borovcová L.**, Pauk V., Lemr K., *Fast separation in new designer drugs screening: Účast na soutěži Cena Shimadzu*: Práce byla vybrána z celkového počtu 52 zaslaných do užšího výběru, které byly prezentovány v rámci 68. sjezdu chemických společností v Praze 4. – 7. 9. 2016 a je publikována v Czech Chem. Soc. Symp. Ser 14, 159-310 (2016).

- **Borovcová L.**, Hejtmánková K., Lemr K., *Chromatographic analysis of photoinitiators in packaging materials as potential contaminants of food: Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2016*, Olomouc, ČR, 6. – 9. 6. 2016 poster, abstrakt str. 83 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Kučera L., Barták P., Papoušek R., Behenský P., Lemr K., *GC/MS in development of herbal medicinal products: 20th International Conference „Analytical Methods and Human Health“*, Patince, SK, 15. – 18. 6. 2015 poster, abstrakt str. 139 ve Sborníku – 3. místo v posterové sekci.
- **Borovcová L.**, Pauk V., Benická S., Havlíček V., Lemr K., *Screening of new designer drugs: 4. Konference české společnosti pro hmotnostní spektrometrii*, Hradec Králové, ČR, 15. – 17. 4. 2015 poster, abstrakt str. 57 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Rizzi A., Michael C., *The structural analysis of oligosaccharides released from glycoproteins by means of high – resolution mass spectrometry: Konference projektu MOSYP CZ.1.07/2.2.00/28.0029*, Branná, ČR, 24. – 26. 9. 2014 přednáška, abstrakt str. 13 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Petreň M., Lemr K., *QuEChERS in new designer drugs screening: Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2014*, Olomouc, ČR, 10. – 14. 2. 2014 poster, abstrakt str. 97 ve Sborníku.

DALŠÍ AKTIVITY

- Funkční vzorek **FV02/ACH/2015** – *Laboratorní zařízení pro úpravu vzorků* – spoluautor (výstup projektu TAČR).
- Funkční vzorek **FV01/ACH/2013** – *Zlepšení reprodukovatelnosti desorpčního nanoelektrospreje pomocí teflonového nástavce* – spoluautor (výstup projektu COST).
- Smluvní výzkum pro společnost Waters, Teva.
- Asistenční činnost při organizaci exkurzí škol a popularizačních akcích.
- Recenzent bakalářských a diplomových prací.

PŘÍLOHY

Přílohy A: Ultra-vysokoučinná chromatografie nových psychoaktivních látek

Tab. AI: Srovnání matričního efektu (ME), výtěžnosti (RE), preciznosti a přesnosti pro techniky UHPSFC-MS a UHPLC-MS na různých koncentračních úrovních.

Látka	UHPSFC-MS					UHPLC-MS				
	Konc., ng/ml	ME, %	RE, %	Preciznost, %	Přesnost, %	Konc., ng/ml	ME, %	RE, %	Preciznost, %	Přesnost, %
katinon						4,0	88,7	115,5	13,5	100,1
	20,0	40,0	72,8	9,0	99,8	20,0	74,8	101,9	6,0	81,2
	100,0	41,2	69,6	4,3	99,3	100,0	59,3	106,6	2,0	105,9
	500,0	45,4	74,8	1,7	109,2	500,0	59,4	98,6	1,3	97,2
	2500,0	50,2	72,2	3,6	98,4	1000,0	70,2	84,9	3,7	100,1
	5000,0	56,1	72,1	4,2	93,3					
MDA	10,0	71,4	70,6	7,1	100,1	4,0			3,6	102,1
	20,0	69,6	67,3	7,3	98,6	20,0	62,5	106,8	3,3	87,6
	100,0	64,6	69,9	2,5	106,2	100,0	53,7	125,4	1,1	109,1
	500,0	60,3	75,4	2,9	102,5	500,0	53,6	115,0	1,1	100,0
	2500,0	66,7	73,4	2,8	92,7	1000,0	66,3	100,1	1,5	101,1
2C-H						2,0			13,2	100,5
	5,0	74,2	73,6	8,9	97,8	10,0	54,4	113,0	3,8	97,9
	25,0	76,7	73,3	4,7	109,7	50,0	46,3	103,5	3,4	97,9
	125,0	67,0	77,0	2,1	107,4	250,0	49,3	92,3	1,7	96,2
	625,0	70,9	72,0	3,7	94,7	500,0	61,2	84,5	4,3	107,5
	1250,0	73,8	73,6	2,1	90,4					
BDB	10,0	58,7	76,1	3,9	99,5	4,0			6,2	98,2
	20,0	58,4	75,3	4,9	100,3	20,0	102,1	60,9	4,1	107,7
	100,0	58,1	75,5	1,3	103,6	100,0	86,1	73,0	1,5	108,1
	500,0	54,0	80,3	1,7	102,4	500,0	83,4	73,1	1,9	91,6
	2500,0	59,3	77,6	1,6	94,3	1000,0	103,8	67,9	6,6	94,4
bufedron						0,50	32,2	100,9	20,5	103,1
	1,0	66,3	74,1	7,3	100,1	1,0	35,2	99,8	14,2	96,6
	2,0	61,5	76,3	4,2	98,7	2,0	36,0	89,1	7,9	94,3
	10,0	64,7	75,8	4,4	104,3	10,0				
	50,0	62,2	82,0	5,0	108,9	50,0	37,0	87,8	1,5	103,0
	250,0	66,1	76,4	5,7	97,9	250,0	40,2	79,6	1,5	98,6
	500,0	72,5	73,5	4,2	90,2	500,0	51,0	70,1	3,0	104,4
3-MMC						2,0	67,7	106,6	12,5	101,5
	0,2	56,8	80,9	5,1	98,2	4,0	61,2	91,0	9,7	92,3
	1,0	59,1	78,7	3,8	107,7	20,0	66,7	108,3	3,2	124,1
	5,0	57,9	77,9	2,7	107,4	100,0	68,7	82,8	2,3	100,5
	25,0	59,3	73,1	6,9	95,7	500,0	70,3	76,0	2,6	89,8

	50,0	63,5	74,1	2,5	91,0	1000,0	83,3	71,2	1,8	91,8
						0,50	61,0	83,8	16,8	100,6
3-FMC	1,0	49,7	83,2	7,8	98,7	1,0	69,4	84,8	6,4	101,4
	2,0	49,0	79,0	2,6	99,3	2,0	67,7	79,3	3,1	94,7
	10,0	53,9	74,7	4,7	102,6	10,0	69,9	70,6	2,1	101,7
	50,0	54,3	74,5	4,1	105,1	50,0	63,7	71,3	1,2	98,9
	250,0	57,0	73,3	4,2	98,5	250,0	65,6	69,5	1,8	98,3
	500,0	61,9	73,4	3,1	94,4	500,0	76,2	63,6	0,8	104,5
4-FMC	1,0	53,1	83,4	5,7	98,2					
	2,0	52,9	82,5	4,3	102,4	2,0	59,5	90,2	8,2	100,0
	10,0	57,3	76,9	7,8	105,5	10,0	75,6	76,0	2,9	100,2
	50,0	59,8	74,6	5,7	105,8	50,0	69,0	75,8	1,1	98,9
	250,0	60,7	72,5	10,2	95,3	250,0	68,2	81,0	2,7	105,3
	500,0	64,6	75,3	2,5	92,9	500,0	69,9	78,3	3,5	95,7
4-MEC	0,20	64,9	67,5	6,6	102,4					
	0,40	67,8	69,7	9,4	96,2	0,50	64,6	99,0	8,1	102,8
	1,0	62,7	72,7	4,7	97,0	1,0	69,7	93,3	10,0	95,3
	2,0	58,2	80,7	2,8	99,3	2,0	63,7	94,7	5,7	97,2
	10,0	65,3	83,2	1,0	108,4	10,0	66,8	94,6	2,1	105,2
	50,0	64,7	82,7	6,5	103,4	50,0	65,7	90,7	1,0	103,0
	250,0	65,4	80,8	4,6	93,2	250,0	69,1	83,1	1,2	95,9
						500,0	85,6	75,9	1,9	100,5
methedron	1,0	68,9	74,9	4,5	100,4					
	2,0	67,8	71,4	5,1	98,5	2,0	43,6	112,1	7,6	99,7
	10,0	64,3	72,0	6,4	102,7	10,0	43,4	106,8	3,8	102,1
	50,0	61,1	77,7	2,9	107,2	50,0	45,3	94,1	1,7	95,5
	250,0	62,3	74,7	3,4	97,6	100,0	59,5	82,0	3,2	102,7
	500,0	67,1	76,4	2,5	93,6					
methylon	0,10	63,0	81,0	8,9	95,9					
	0,20	64,0	78,3	9,1	99,1	0,40	84,9		4,1	99,2
	1,0	63,4	74,2	3,1	104,0	2,0	67,7	97,0	2,7	102,4
	5,0	62,2	73,1	4,4	102,8	10,0	65,8	89,6	6,7	108,5
	25,0	63,5	72,5	5,7	97,7	50,0	67,3	79,9	1,2	92,9
	50,0	68,5	74,7	1,7	96,4	100,0	80,0	70,4	1,2	96,9
butylon	0,10	65,0	79,5	9,7	100,4	0,10			14,0	104,9
	0,20	58,1	77,3	7,1	98,1	0,20	64,7	96,6	15,2	89,9
	1,0	59,7	78,0	5,0	104,2	0,40	61,8	94,8	7,4	98,9
	5,0	62,1	79,8	6,1	108,0	2,0	63,1	87,2	3,8	107,0
	25,0	63,3	74,6	5,7	94,3	10,0	60,7	88,2	1,6	107,4
	50,0	68,5	77,8	3,3	95,0	50,0	62,7	78,9	2,1	95,5
						100,0	72,1	73,5	2,1	96,5
ethylon	0,10	62,3	76,3	3,3	99,1					
	0,20	57,2	79,0	4,0	99,9					
	1,0	61,8	80,2	4,7	109,1	0,40	42,9	110,2	4,7	95,9
	5,0	65,8	77,4	4,0	106,8	2,0	37,4	126,9	2,5	119,4
	25,0	63,2	73,2	10,3	93,3	10,0	38,6	139,1	1,7	108,8
	50,0	71,6	74,0	5,1	91,9	50,0	42,8	100,1	1,6	85,4
2C-B						100,0	54,3		1,0	90,4
						0,40	91,4	71,0	6,7	86,6

	2,50	66,3	76,4	9,7	99,2	2,0	65,5	102,1	6,7	101,8
	5,0	60,1	77,3	11,9	100,8	10,0	62,8	96,2	4,9	95,3
	25,0	62,2	73,9	8,2	102,8	50,0	63,5	84,4	2,3	93,3
	125,0	58,2	78,8	3,0	105,1	100,0	73,9	78,4	2,4	107,0
	625,0	62,3	76,0	2,1	98,7					
	1250,0	62,9	76,3	3,8	93,4					
NRG	0,10	65,8	79,5	6,9	96,9	0,04	75,9	92,4	16,1	100,4
	0,20	65,8	86,0	4,2	104,0	0,20	96,5	80,5	7,4	97,7
	1,0	71,5	91,0	2,6	110,1	1,0	74,1	97,9	1,2	103,0
	5,0	69,4	88,9	6,2	107,1	5,0	75,7	86,3	2,7	93,8
	25,0	73,6	83,0	6,7	96,0	10,0	84,0	87,1	2,2	105,2
	50,0	78,9	78,4	7,3	85,9					

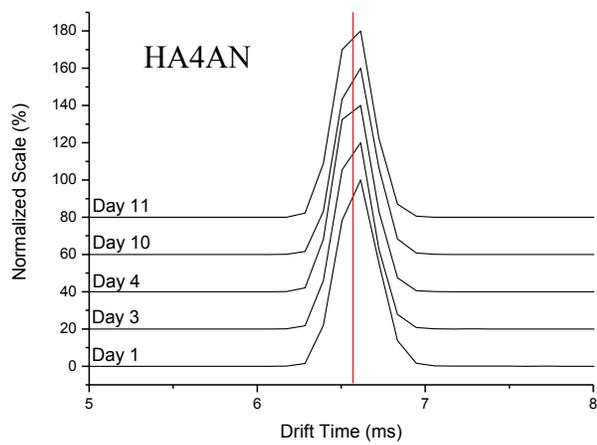
Tab. AII: Průměrné hodnoty matričních efektů a výtěžností.

#	Látka	UHPSFC-MS						UHPLC-MS					
		ME, %	ME, SD	ME RSD, %	RE, %	RE, SD	RE, RSD, %	ME, %	ME, SD	ME RSD, %	RE, %	RE, SD	RE RSD, %
1	katinon	46,6	6,7	14,3	72,3	1,9	2,6	70,5	12,2	17,4	101,5	11,2	11,1
2	bufedron	65,6	3,9	6,0	76,4	3,0	3,9	38,6	6,6	17,1	87,9	11,8	13,5
3	3-MMC	59,3	2,6	4,3	76,9	3,2	4,2	69,7	7,4	10,6	89,3	15,6	17,5
4	MDA	66,5	4,3	6,5	71,3	3,1	4,4	59,0	6,4	10,9	111,8	10,9	9,8
5	3-FMC	54,3	4,8	8,9	76,3	3,9	5,2	67,6	4,9	7,3	74,7	8,0	10,7
6	4-FMC	58,1	4,5	7,8	77,5	4,4	5,7	68,4	5,8	8,5	80,2	5,9	7,4
7	2C-H	72,5	3,7	5,1	73,9	1,8	2,5	52,8	6,5	12,3	98,3	12,5	12,7
8	4-MEC	64,1	3,0	4,7	76,8	6,6	8,6	69,3	7,5	10,8	90,2	8,0	8,9
9	BDB	57,7	2,1	3,6	77,0	2,1	2,7	93,9	10,6	11,3	68,7	5,8	8,4
10	methedron	65,2	3,2	4,8	74,5	2,4	3,3	47,9	7,7	16,1	98,8	13,5	13,7
11	methylon	64,1	2,2	3,5	75,7	3,3	4,4	73,1	8,7	11,9	84,2	11,5	13,7
12	ethylon	63,7	4,8	7,6	76,7	2,7	3,6	43,2	6,7	15,5	119,1	17,3	14,5
13	butylon	62,8	3,8	6,0	77,8	1,9	2,4	64,2	4,1	6,4	86,5	8,9	10,3
14	2C-B	62,0	2,7	4,4	76,5	1,6	2,1	71,4	12,0	16,8	86,4	12,7	14,7
15	NRG	70,8	5,0	7,1	84,5	5,1	6,0	81,2	9,4	11,6	88,8	6,6	7,4
	Průměr	62,2	3,8	6,3	76,3	3,1	4,1	64,7	7,8	12,3	91,1	10,7	11,6
	RSD, %	10,4			3,9			22,4			14,5		

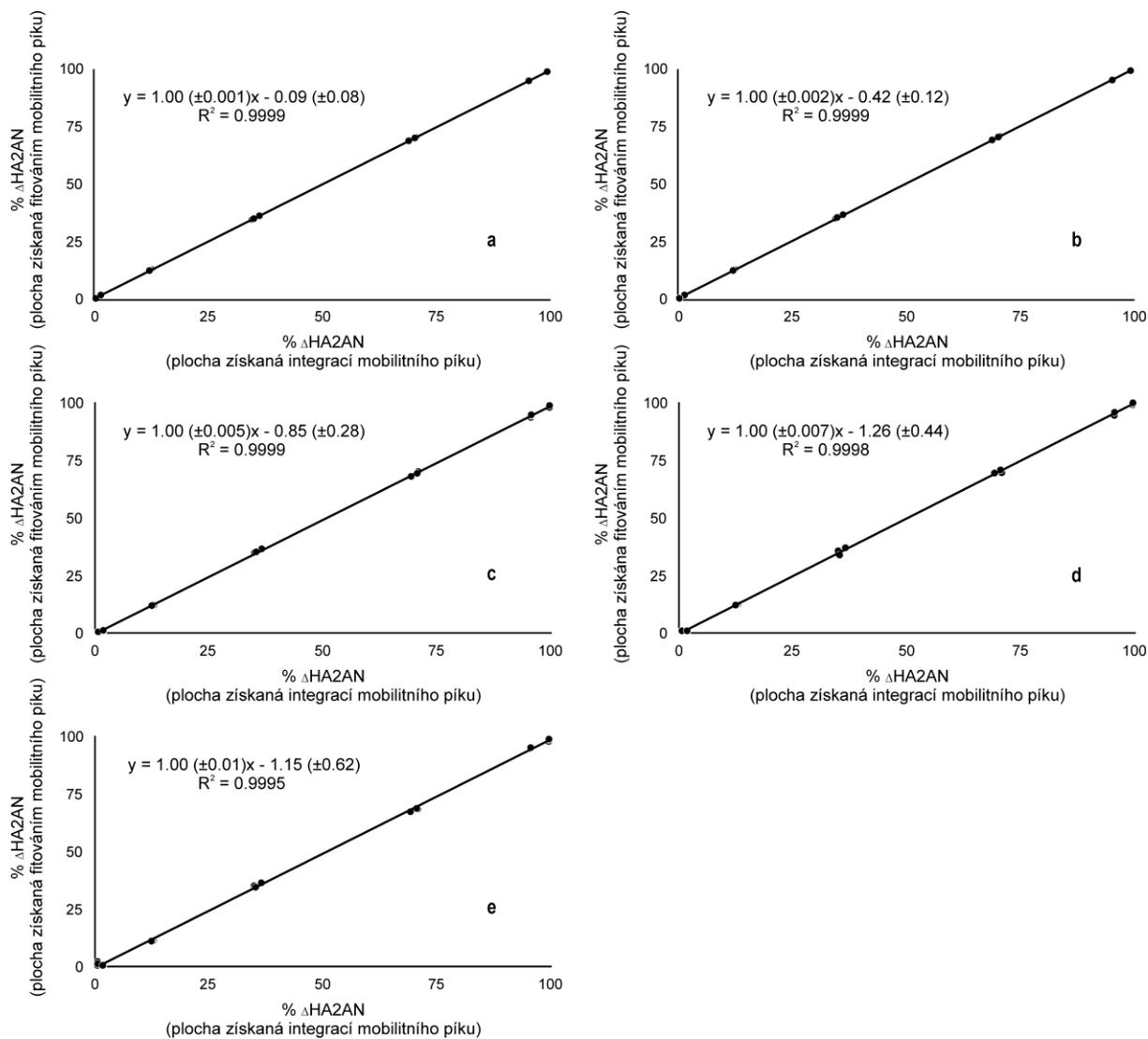
Tab. AIII: Kalibrační parametry ($y = P \cdot c + Q$), limity detekce (LOD), dolní a horní limit kvantifikace (LLOQ, ULOQ), přenos analytu do následných analýz (CO, carryover).

#	Látka	UHPSFC-MS								UHPLC-MS							
		R ²	Q	P	LOD ng/ml	LLOQ ng/ml	ULOQ ng/ml	CO 1, % LLOQ	CO 2, % LLOQ	R ²	Q	P	LOD ng/ml	LLOQ ng/ml	ULOQ ng/ml	CO 1, % LLOQ	
1	katinon	0,996	34	531	5,15	15,61	5000	119	<LOD	0,991	810	2702	0,50	1,51	1000	<LOD	
2	bufedron	0,995	234	13339	0,26	0,78	500	<LOD	<LOD	0,998	217	13372	0,09	0,26	500	<LOD	
3	3-MMC	0,994	120	28015	0,07	0,20	50	<LOD	<LOD	0,980	209	3416	1,04	3,16	1000	<LOD	
4	MDA	0,997	2182	4496	2,23	6,74	2500	67	<LOD	0,993	23658	17067	1,39	4,22	1000	<LOD	
5	3-FMC	0,998	235	6822	0,37	1,11	500	<LOD	<LOD	0,999	79	15357	0,06	0,19	500	<LOD	
6	4-FMC	0,996	268	5932	0,22	0,67	500	<LOD	<LOD	0,999	144	12710	0,31	0,94	500	<LOD	
7	2C-H	0,992	550	2976	1,85	5,61	1250	45	<LOD	0,998	1834	4640	0,40	1,21	500	<LOD	
8	4-MEC	0,996	-1	25014	0,04	0,13	250	≤LOD	<LOD	0,998	508	29928	0,08	0,23	500	<LOD	
9	BDB	0,998	1170	3742	1,61	4,87	2500	<LOD	<LOD	0,993	5753	11499	1,35	4,10	1000	<LOD	
10	methedron	0,997	361	12195	0,19	0,58	500	56	<LOD	0,999	302	11640	0,33	1,00	100	<LOD	
11	methylon	0,999	165	44716	0,03	0,09	50	80	<LOD	0,996	2965	51454	0,11	0,32	100	<LOD	
12	ethylon	0,994	230	77781	0,03	0,09	50	<LOD	<LOD	0,978	1131	54015	0,25	0,76	100	<LOD	
13	butylon	0,996	150	51427	0,02	0,07	50	<LOD	<LOD	0,994	599	44257	0,03	0,08	100	<LOD	
14	2C-B	0,998	51	1449	0,41	1,23	1250	121	<LOD	0,996	-37	7211	0,10	0,31	100	<LOD	
15	NRG	0,995	113	74264	0,04	0,11	50	<LOD	<LOD	0,998	519	87036	0,01	0,02	10	<LOD	

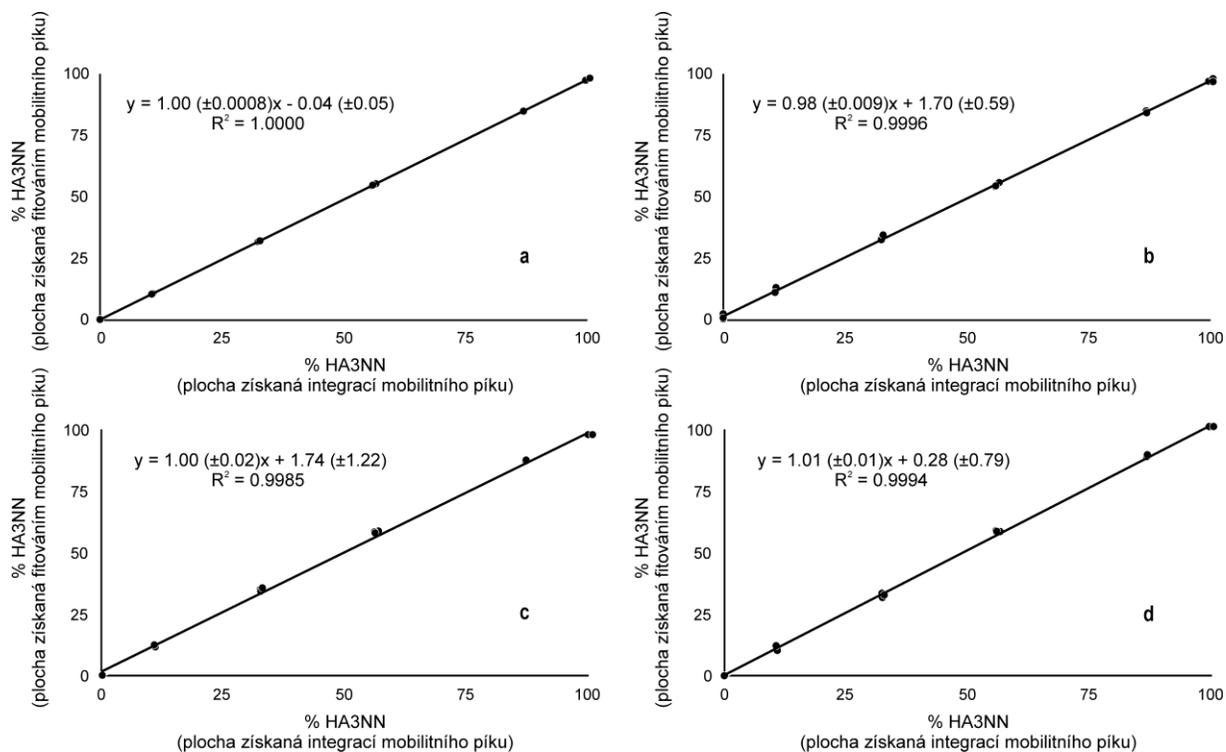
Přílohy B: Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků



Obr. B1: Ukázka opakovatelnosti ATD profilů.



Obr. B2: Lineární korelace poměrů plochy píku ΔHA2AN ku celkové ploše směsi ΔHA2AN : HA2AN. Poměry byly vypočteny pomocí fitování pro různé posuny (v binech): a) 11, b) 5, c) 3, d) 2, e) 1 a dat z HPLC. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.



Obr. B3: Lineární korelace poměrů plochy píku HA3NN ku celkové ploše směsi HA3NN : HA4NA. Poměry byly vypočteny pomocí fitování pro různé posuny (v binech): a) 0, b) 19, c) 26, d) 27 a dat z HPLC. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.

Tab. BI: Plochy píků (%) minoritních složek v binárních směsích (Δ HA2AN : HA2AN, HA3NN : HA4NA, HA6ANdeac : HA6AN). Mobilogramy jednotlivých složek byly z naměřených dat extrahovány pro specifické hodnoty m/z a integrovány. Mobilogramy směsí byly fitovány ATD funkcemi (Obr. 29-31).

Minoritní složky^a	Separační posun (bins)	Integrace mobilitního píku(%)	Fitování mobilitního píku (%)	Rozdíl (%)
Δ HA2AN	11	0.7	0.4	-0.3
Δ HA2AN	11	1.9	1.8	-0.1
HA2AN	11	1.0	1.1	0.1
HA2AN	11	5.0	5.1	0.1
Δ HA2AN	5	0.7	0.0	-0.7
Δ HA2AN	5	1.9	1.5	-0.4
HA2AN	5	1.0	1.5	0.5
HA2AN	5	5.0	5.5	0.5
Δ HA2AN	3	0.7	0.0	-0.7
Δ HA2AN	3	1.9	0.6	-1.3
HA2AN	3	1.0	2.2	1.2
HA2AN	3	5.0	6.2	1.2
Δ HA2AN	2	0.7	0.0	-0.7
Δ HA2AN	2	1.9	0.0	-1.9
HA2AN	2	1.0	2.2	1.2
HA2AN	2	5.0	6.3	1.3
Δ HA2AN	1	0.7	0.8	0.1
Δ HA2AN	1	1.9	0.0	-1.9
HA2AN	1	1.0	2.5	1.5
HA2AN	1	5.0	6.1	1.1
HA3NN	0	0.0	0.0	0.0
HA4NA	0	0.1	0.1	0.0
HA4NA	0	0.9	0.9	0.0
HA3NN	19	0.0	1.4	1.4
HA4NA	19	0.1	0.4	0.3
HA4NA	19	0.9	1.0	0.1
HA3NN	26	0.0	0.0	0.0
HA4NA	26	0.1	0.0	-0.1
HA4NA	26	0.9	0.0	-0.9
HA3NN	27	0.0	0.0	0.0
HA4NA	27	0.1	0.0	-0.1
HA4NA	27	0.9	0.0	-0.9
HA6ANdeac	0	0.0	0.3	0.3
HA6ANdeac	0	3.7	6.1	2.4

HA6AN	0	0.0	0.0	0.0
HA6AN	0	2.3	0.0	-2.3

^a byly vyhodnoceny směsi s minoritní složkou o ploše 5 % a méně.

Tab. BII: Plochy píků (%) minoritních složek v izomerních směsích (HA6ANred : HA6NAred; HA4ANred : HA4NAred).

Minoritní složka ^a	HPLC	Fitování	Rozdíl (%)
	integrace píků (%)	mobilitních píků (%)	
HA6ANred	0.1	0.0	-0.1
HA6ANred	1.5	1.9	0.4
HA6NAred	0.0	0.0	0.0
HA6NAred	2.4	4.4	2.0
HA4ANred	0.0	0.1	0.1
HA4ANred	6.1	6.3	0.2
HA4NAred	0.0	0.3	0.3
HA4NAred	2.8	4.6	1.8

^a byly vyhodnoceny směsi s minoritní složkou o ploše 6 % a méně.

Přílohy C: Publikační výstupy

1. **Borovcová L.**, Pauk V., Lemr K., *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800006
2. **Borovcová L.**, Hermannová M., Pauk V., Šimek M., Havlíček V., Lemr K., *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, Anal. Chim. Acta 981 (2017) 71–79.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Spojení rychlých separací s hmotnostní spektrometrií v analýze
oligosacharidů a nových syntetických drog**

AUTOREFERÁT

k disertační práci

Autor práce:

Mgr. Lucie Borovcová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2018

SOUHRN

Disertační práce se zabývá studiem rychlých separací ve spojení s hmotnostní spektrometrií se zaměřením na analýzu nových psychoaktivních látek a oligosacharidů. Teoretická část je věnována rychlým chromatografickým separacím a separacím iontovou mobilitou ve spojení s hmotnostní spektrometrií včetně jejich praktických aplikací. Jsou zde rovněž popsány postupy umožňující odlišení nedostatečně separovaných mobilních píků. Teoretickou část uzavírají kapitoly zabývající se novými psychoaktivními látkami (NPS) a kyselinou hyaluronovou.

Výsledky práce zahrnují studium a validaci chromatografické separace 15 NPS ze skupiny kationů a fenylethylaminů v moči pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) a ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC). K úpravě vzorků moče byl použit jednoduchý postup „zředit-zfiltrovat-analyzovat“. Z hlediska výtěžnosti i matričních efektů poskytovala UHPSFC kompaktnější výsledky, avšak na vyšších koncentračních hladinách docházelo k přenosu analytu do následující analýzy. Tento jev lze minimalizovat proložením analytické sekvence slepými vzorky. Při separaci izomerů NPS bylo dosaženo lepších výsledků technikou UHPSFC, která oproti UHPLC umožnila úspěšně rozlišit izomery 3-FMC a 4-FMC. Pro všech 15 NPS byly stanoveny limity detekce a kvantifikace, přičemž limity detekce se pohybovaly v rozmezí 0,01 až 5 ng/ml moče. Kromě chromatografické separace byly nové psychoaktivní látky analyzovány pomocí iontové mobility ve spojení s hmotnostní detekcí. Vedle testování vlivu druhu driftového plynu na iontově mobilní separaci byly vypočteny hodnoty CCS (účinného srážkového průřezu), které jsou další charakteristikou látky vhodnou pro potvrzení její identifikace.

V souvislosti s menší rozlišovací schopností iontové mobility byl vyvinut jednoduchý postup k určení ploch nedostatečně separovaných mobilních píků, který vychází z předpokladu dobré opakovatelnosti driftového času a tvaru mobilního píku (ATD profilu). Profil mobilního píku je popsán jednou nebo více Gaussovskými funkcemi, z nichž je pro jednotlivé složky v binárních směsích získána tzv. ATD funkce. Tyto ATD funkce byly aplikovány na iontově mobilní data modelových směsí oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové. Plochy píků jednotlivých složek získané fitováním dobře korelovaly s hodnotami, které byly získány integrací HPLC píků. Navržený postup se může uplatnit nejen při analýze oligosacharidů, ale také u dalších analytů špatně separovaných iontovou mobilitou.

Dosažené výsledky ukazují význam rychlých separací při analýze toxikologicky nebo biologicky zajímavých látek.

SUMMARY

The dissertation deals with rapid separations coupled to mass spectrometry with the focus on analysis of new psychoactive substances and oligosaccharides. The theoretical part is devoted to fast chromatographic separations and separations by ion mobility spectrometry coupled to mass spectrometry, including their practical applications. Procedures allowing for distinguishing poorly separated mobility peaks are also described. The theoretical part is concluded by the chapters dealing with new psychoactive substances (NPS) and hyaluronic acid.

The results include the development and validation of chromatographic separation of 15 NPS (cathinones and phenylethylamines) in urine based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) and ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC). A simple "dilute-filter-and-shoot" procedure was used to treat urine samples. UHPSFC provided more uniform results in terms of recovery and matrix effects, but carryover of certain analytes was observed at higher concentration levels. This phenomenon can be reduced sufficiently by inserting blank samples into the analytical sequence. Regarding the separation of NPS isomers, better results were obtained by the UHPSFC that allowed for successful differentiation of 3-FMC and 4-FMC isomers, as opposed to UHPLC. Limits of detection and quantification were determined and LOD in the range from 0.01 to 5 ng/mL urine was observed. Besides chromatographic separation, new psychoactive substances were analyzed using ion mobility coupled to mass detection. In addition to testing the influence of the drift gas on the ion mobility separation, the CCS (collision cross section) values were also measured. CCS represents another characteristic suitable for confirming the identity of the substance.

Due to the lower resolving power of ion mobility, a simple procedure has been developed to determine areas of insufficiently separated mobility peaks, based on the assumption of good repeatability of drift time and peak shape (ATD profile). The mobility peak profile is described by one or more Gaussian functions, from which ATD functions are obtained for the individual components of the binary mixtures. These ATD functions were applied to the ion mobility data of model mixtures of hyaluronic acid-derived oligosaccharides. The peak areas of the individual components obtained by fitting correlated well with the values got integrating HPLC peaks. ATD functions might be useful not only for analysis of oligosaccharides but also for other analytes poorly separated by ion mobility. The achieved

results demonstrate the importance of rapid separations for analysis of toxicologically or biologically relevant substances.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. RYCHLÉ SEPARACE.....	2
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	4
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	5
4.1. Ultra-vysokoučinná chromatografie nových psychoaktivních látek.....	5
4.1.1. Chromatografická separace	5
4.1.2. Příprava vzorků a volba rozpouštědla	6
4.1.3. Limit detekce	7
4.1.4. Preciznost, lineární rozsah a přesnost	8
4.1.5. Matriční efekt	9
4.1.6. Výťažnost.....	10
4.1.7. Přenos analytu do následných analýz (carryover)	10
4.1.8. Závěr.....	11
4.2. Analýza nových psychoaktivních látek pomocí spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií.....	12
4.2.1. Vliv volby driftového plynu na iontově mobilitní separaci vybraných nových psychoaktivních látek	12
4.2.2. Určování účinného srážkového průřezu	12
4.2.3. Závěr.....	14
4.3. Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků.....	15
4.3.2. Postup zpracování dat, tvorba ATD funkce.....	15
4.3.3. Aplikace ATD funkce na modelové směsi	17
4.3.4. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi.....	20
4.3.5. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi při využití jedinečných fragmentových iontů.....	21
4.3.6. Závěr.....	21
5. ZÁVĚR	23
POUŽITÁ LITERATURA.....	24
ŽIVOTOPIS	28

1. ÚVOD

Význam analytické chemie v dnešní době dokládá skutečnost, že se tento obor stává stále více nepostradatelnou součástí řady odvětví, mezi které patří farmacie, toxikologie, potravinářský průmysl, sledování životního prostředí, dopingové kontroly a mnoho dalších. Vysoké nároky na analýzu rozmanitých vzorků vedou k vývoji velmi citlivých a selektivních technik umožňujících analýzu širokého spektra analytů v matričně složitých vzorcích ve velice krátkých časech. Právě rychlost separace je jedním z hlavních parametrů, kterému je v této práci věnována pozornost.

Disertační práce je zaměřena na studium, vývoj a aplikaci rychlých separací ve spojení s citlivou hmotnostně spektrometrickou detekcí. Vyvíjeny a porovnány byly dvě chromatografické techniky (UHPLC a UHPSFC) v analýze patnácti nových psychoaktivních látek v lidské moči. Kromě chromatografické separace byla řešena také problematika iontové mobilitní separace těchto látek s cílem určení jejich účinného srážkového průřezu jako charakteristické veličiny přispívající k identifikaci. Pro odlišení špatně separovaných iontové mobilitních píků byl navržen postup, který byl testován na binárních směsích oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové.

2. RYCHLÉ SEPARACE

Z hlediska chromatografie lze za rychlé separace považovat analýzy, u kterých dochází k eluci složek vzorků v jednotkách minut příp. sekund. V případě iontové mobility lze výsledky měření získat v jednotkách až desítkách sekund. Narůstající zájem o oblast vývoje rychlých separací je způsoben především neustále se zvyšujícím počtem prováděných analýz a potřebou získat rychle výsledky a to i v případě matričně složitých a rozmanitých vzorků. Cílem je dospět k co nejrychlejší separaci dosahující potřebné účinnosti a rozlišení s následnou citlivou a selektivní detekcí. Rychlé separace nacházejí své uplatnění v mnoha oblastech, kde je kladen důraz především na čas. Například v toxikologii, klinické chemii, při dopingových kontrolách, ale i v proteomice a metabolomice, kde je potřebná účinná separace velmi komplexních vzorků obsahujících až stovky složek.

Na základě těchto požadavků je v posledních letech směřována pozornost na vývoj vysokotlakých technik poskytujících výsledky ve významně kratších časech ve srovnání s technikami konvenčními. Dnes je již běžně používaná ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) využívající pro zvýšení účinnosti separace stacionární fáze s plně porézními částicemi menšími než 2 μm [1,2]. Rychlých separací lze však dosáhnout i jinými cestami, než je zmenšování plně porézních částic, např. použitím monolitických kolon [3-7] nebo povrchově porézních částic [8-11]. Později na trh uvedená ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) není prozatím tak běžnou technikou, v mnoha případech se však osvědčila jako vhodná alternativa k UHPLC. Právě proto je možné nalézt řadu publikací, ve kterých jsou tyto dvě techniky vzájemně porovnávány [12-18]. Rovněž elektromigrační techniky je možné využít k rychlým separacím. To dokládá řada publikovaných aplikací, které v módu kapilární elektroforézy (CE) jsou schopny separací v řádu sekund až jednotek minut [19-22].

Dalším typem techniky umožňující rychlou separaci, které je taktéž věnována pozornost, je spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IM-MS) [23-26]. Tato technika je schopná poskytovat rychlé výsledky i bez nutnosti zařazení chromatografického systému, jelikož umožňuje separaci iontů přímo v mobilní cele integrované s hmotnostním spektrometrem. Spojení IM-MS přineslo nové možnosti v separaci a kvantifikaci izobarických/izomerních sloučenin. IM-MS rozšiřuje možnosti identifikace látek, ověřování struktur, ale také zlepšuje poměr signálu k šumu při kvantitativní analýze. K ověření a identifikaci látek se využívá charakteristické veličiny – účinného srážkového průřezu neboli

CCS (collision cross section), jehož hodnotu lze touto technikou určit [22]. Iontová mobilita s technologií TWIMS (iontově mobilitní spektrometrie s pohybující se vlnou) nebo DTIMS (iontově mobilitní spektrometrie v driftové trubici) disponuje rozlišovací schopností v rozsahu desítek až stovky, což nemusí být v mnoha případech dostatečné. Zároveň technika iontové mobility poskytuje velmi stabilní hodnoty driftového času, které nejsou ovlivněny maticí vzorku. Dobrá opakovatelnost driftového času a tvarů mobilitních píků (ATD profilů) umožňuje popsání těchto profilů superpozicí Gausovských funkcí. Každá vytvořená ATD funkce odpovídá jednomu analytu a může se skládat z jedné nebo více Gausovských funkcí. Tento přístup umožňující řešit problematiku integrace překrývajících se asymetrických píků byl aplikován při analýze izomerů oligosacharidů kyseliny hyaluronové [27], což byl jeden z cílů disertační práce.

Nové psychoaktivní látky (NPS) nazývané rovněž jako „nové syntetické drogy“ tvoří širokou skupinu zneužívaných látek. Tyto látky se získávají pozměněním chemické struktury zakázaných drog nebo syntézou látek s odlišnou strukturou, ale působící na stejné receptory jako klasické drogy. Mají obdobné účinky jako zakázané návykové drogy, avšak mohou být na trh uváděny jako jejich „legální“ náhrada, protože nejsou legislativním procesem dostatečně rychle zařazeny na seznam zakázaných látek [28,29]. Nebezpečnost NPS spočívá v neznalosti jejich fyziologických účinků, čímž představují velmi vážné riziko pro lidské zdraví [30-32]. S narůstajícím počtem nových NPS vyskytujících se na trhu je nezbytné disponovat selektivními a časově nenáročnými metodami umožňujícími identifikovat jak čisté látky, tak pro toxikologické účely také látky přítomné v biologických vzorcích. Důležitým faktorem není jen vlastní analýza, ale rovněž náročnost zpracování vzorku, zvláště těch se složitější maticí. Součástí výsledků této práce je porovnání dvou rychlých chromatografických metod (UHPLC) a UHPSFC) při analýze 15 NPS přítomných ve vzorcích moči [33].

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Tématem doktorské práce bylo studium, vývoj a aplikace rychlých separací ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Stanoveny byly dva cíle:

1. Studium chromatografického chování NPS ze skupiny kationů a fenylethylaminů, porovnání dvou technik (UHPLC a UHPSFC) s hmotnostní detekcí při analýze 15 NPS v lidské moči. Kromě chromatografických separací bylo úkolem otestovat možnost iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií při identifikaci zmíněných látek.

2. Navrhnout postup pro odlišení nedostatečně separovaných iontově mobilních píků a otestovat jej na analýze oligosacharidů odvozených od kyseliny hyaluronové.

Řešení obou cílů vedlo k publikačním výstupům:

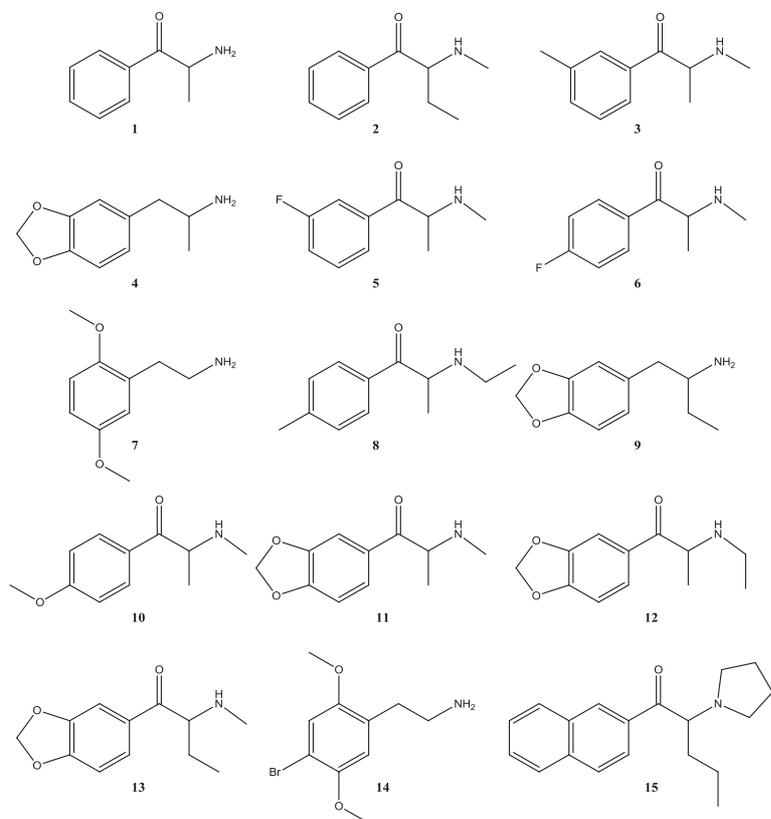
1. **Borovcová L.**, Pauk V., Lemr K., *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) – v tisku
DOI: 10.1002/jssc.201800006
2. **Borovcová L.**, Hermannová M., Pauk V., Šimek M., Havlíček V., Lemr K., *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, Anal. Chim. Acta 981 (2017) 71–79.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

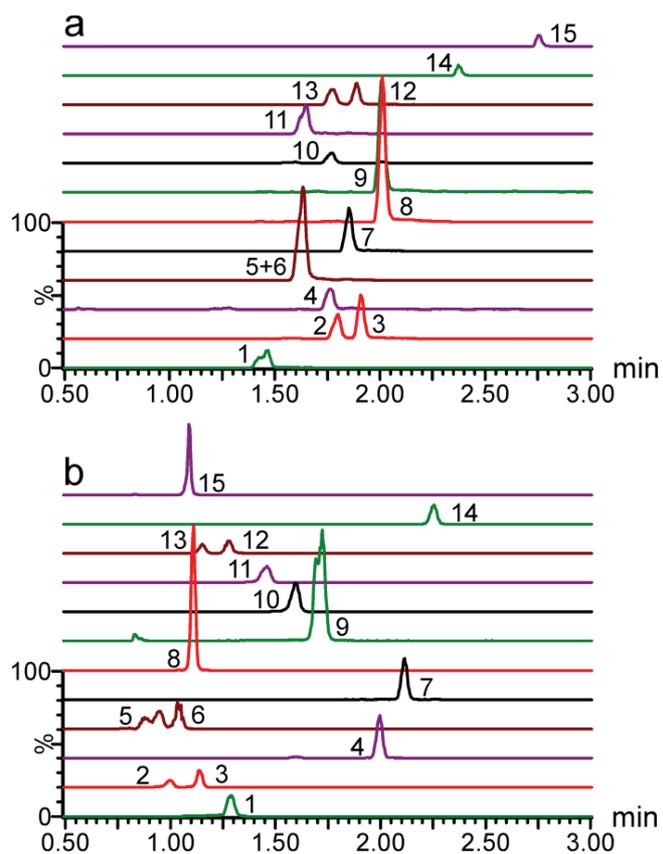
4.1. Ultra-vysokoúčinná chromatografie nových psychoaktivních látek

4.1.1. Chromatografická separace

V rámci UHPLC experimentů byly pro separaci 15 NPS (struktury viz Obr. 1) testovány tři kolony Waters ACQUITY UPLC BEH Phenyl, BEH Shield RP18 a BEH C8 (všechny o rozměrech $100 \times 2,1$ mm, plněné částicemi $1,7 \mu\text{m}$) s různými kombinacemi gradientů vodně organické mobilní fáze (MeOH, ACN). Nejlepší výsledky z hlediska separace, tvaru píků a doby analýzy poskytla kolona BEH Phenyl s mobilní fází obsahující vodu, methanol a 0,1 % kyseliny mravenčí (Obr. 2 a). Technika UHPSFC pro separaci stejných 15 NPS (struktury viz Obr. 1) byla studována a popsána v naší předchozí publikaci [34] z roku 2015. Vyvinutá separace byla částečně modifikována. Analýzy byly provedeny na koloně BEH s mobilní fází sestávající se z oxidu uhličitého a methanolu s přidavkem mravenčanu amonného. Gradient byl upraven tak, aby bylo dosaženo kratší doby analýzy, aniž by došlo ke zhoršení separace prvních eluovaných látek (Obr. 2 b). Obě metody byly porovnány s ohledem na separaci látek a validační parametry.



Obr. 1: Struktury testovaných fenylethylaminů a katinonů. **1)** katinon; **2)** bufedron; **3)** 3-MMC; **4)** MDA; **5)** 3-FMC; **6)** 4-FMC (flefedron); **7)** 2C-H; **8)** 4-MEC; **9)** BDB; **10)** methedron; **11)** methylon; **12)** ethylon; **13)** butylon; **14)** 2C-B; **15)** NRG (nafyron).



Obr. 2: Chromatogramy vzorků moče s přídavkem NPS a) UHPLC-MS, b) UHPSFC-MS. **1)** katinon; **2)** bufedron; **3)** 3-MMC; **4)** MDA; **5)** 3-FMC; **6)** 4-FMC (flefedron); **7)** 2C-H; **8)** 4-MEC; **9)** BDB; **10)** methedron; **11)** methylon; **12)** ethylon; **13)** butylon; **14)** 2C-B; **15)** NRG (nafyron).

Pro jednotlivé izomerní páry byly zjištěny následující hodnoty rozlišení (první hodnota je pro UHPLC, druhá pro UHPSFC): $R_{2,3} = 1,86$ a $2,20$; $R_{5,6} = <0,5$ a $1,34$; $R_{9,10} = 5,00$ a $1,87$; $R_{12,13} = 1,85$ a $1,92$, struktury viz Obr. 1. V systému UHPLC bylo dosaženo největšího rozlišení u izomerů BDB a methedronu ($R_{9,10} = 5,00$), které se významně liší svými strukturami a lze u nich očekávat větší rozdíl v hydrofobním efektu. U ostatních izomerních párů s podobnějšími strukturami lze předpokládat menší rozdíly v hydrofobních efektech a v důsledku jejich menší separaci v systému obrácených fází. Separace v UHPSFC s uplatněním polárních interakcí izomerů se stacionární fází poskytla lepší rozlišení. Úspěšné separace izomerního páru 3-FMC a 4-FMC bylo dosaženo pouze v UHPSFC ($R_{5,6} = <0,5$ a $1,34$ UHPLC a UHPSFC). Opakovatelnost retenčních časů látek na úrovni LOD byla lepší než 1 % pro všechny NPS, s výjimkou 3-FMC a 4-FMC v systému UHPSFC (hodnoty RSD retenčních časů jsou, v Tab. I).

4.1.2. Příprava vzorků a volba rozpouštědla

Ke zpracování vzorků byl volen jednoduchý a rychlý postup „zředit-zfiltrovat-analyzovat“ („dilute-filter-and-shoot“), což přispělo k rychlé analýze zahrnující i zpracování vzorků. K eliminaci vysokého obsahu solí a dalších složek (např. kreatinin, kreatin, močovina, kyselina močová), jakožto možných rušivých látek při hmotnostně spektrometrické detekci,

byla testována řada organických rozpouštědel s cílem vysrážet alespoň jejich část. V případě UHPLC byl pro úpravu vzorků vybrán MeOH, který oproti rozpouštědлу s vyšší eluční silou (i-PrOH) výrazněji nedeformoval tvar píků. V případě UHPSFC byl pro zpracování vzorků zvolen i-PrOH.

4.1.3. Limit detekce

Limity detekce byly určeny pro NPS v moči. Obě chromatografické techniky byly spojeny se stejným hmotnostním spektrometrem, ale různé hodnoty průtoku i složení mobilních fází v UHPLC a v UHPSFC mohly ovlivnit odlišně ionizační účinnost i signál pozadí. Ve většině případů UHPLC poskytla srovnatelné nebo větší plochy píků pro stejné SRM přechody daných analytů na stejných koncentračních úrovních v čistém rozpouštědle i v moči. Pozorována byla 2-4 krát větší plocha u látek s primární aminoskupinou (kation, MDA, BDB, 2C-H a 2C-B). Pro tyto látky je typická vysoká hodnota pKa, okyselená mobilní fáze v UHPLC metodě podporovala jejich ionizaci. Jejich protonace v UHPSFC může být méně účinná kvůli menší dostupnosti protonů v použité superkritické mobilní fázi. S výjimkou 2C-B měly tyto látky LOD v UHPSFC nad 1 ng/ml. Nejlepších limitů detekce v UHPSFC systému bylo dosaženo pro látky NRG, butylon, ethylon, methylon, 4-MEC a 3-MMC, jejichž hodnoty se pohybovaly v setinách ng/ml. Oproti UHPLC bylo technikou UHPSFC dosaženo až 10 × nižších limitů detekce pro sloučeniny 3-MMC a ethylon, 2-3 × nižší limity pro 4-MEC a methylon, přičemž v pěti případech byly obě techniky srovnatelné. Naopak u šesti NPS bylo dosaženo lepších limitů detekce pomocí UHPLC. Vůbec nejnižší limit detekce byl získán technikou UHPLC pro látku NRG (0,01 ng/ml) (Tab. I). Hodnoty LOD byly ovlivněny jak odezvou analytu, tak šumem pozadí, matričním efektem a výtěžností.

Tab. I. Retenčních časy, LOD a LOQ studovaných NPS v moči. Instrumentální hodnoty LOD a LOQ byly 5 × nižší.

Číslo	Látka	UHPSFC/MS			UHPLC/MS		
		RT (min) (RSD*, %) (n=6)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	RT (min) (RSD*, %) (n=6)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1	katinon	1,289 (0,35)	5,15	15,61	1,451 (0,66)	0,50	1,51
2	bufedron	1,012 (0,81)	0,26	0,78	1,781 (0,55)	0,09	0,26
3	3-MMC	1,151 (0,73)	0,07	0,20	1,902 (0,36)	1,04	3,16
4	MDA	2,011 (0,54)	2,23	6,74	1,734 (0,87)	1,39	4,22
5	3-FMC	0,941 (2,25)	0,37	1,11	1,625 (0,40)	0,06	0,19
6	4-FMC	1,059 (1,67)	0,22	0,67	1,648 (0,18)	0,31	0,94
7	2C-H	2,124 (0,30)	1,85	5,61	1,844 (0,22)	0,40	1,21
8	4-MEC	1,117 (0,50)	0,04	0,13	2,006 (0,17)	0,08	0,23
9	BDB	1,739 (0,47)	1,61	4,87	2,001 (0,21)	1,35	4,10
10	methedron	1,604 (0,87)	0,19	0,58	1,771 (0,79)	0,33	1,00
11	methylon	1,468 (0,89)	0,03	0,09	1,638 (0,46)	0,11	0,32
12	ethylon	1,279 (0,58)	0,03	0,09	1,876 (0,40)	0,25	0,76
13	butylon	1,171 (0,87)	0,02	0,07	1,772 (0,89)	0,03	0,08
14	2C-B	2,269 (0,33)	0,41	1,23	2,371 (0,08)	0,10	0,31
15	NRG	1,095 (0,45)	0,04	0,11	2,741 (0,06)	0,01	0,02

* RSD retenčních časů byly spočteny pro analýzy na LOD úrovni

4.1.4. Preciznost, lineární rozsah a přesnost

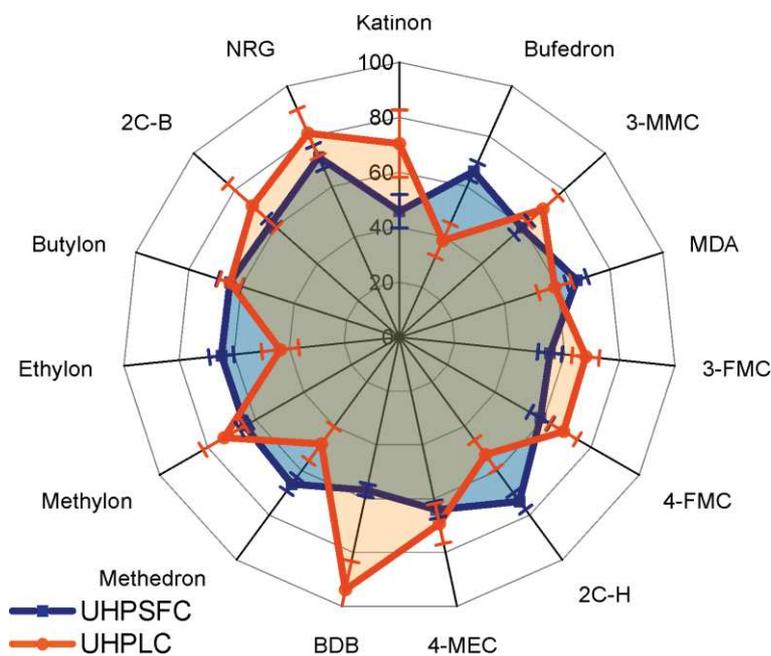
Z hlediska preciznosti byly obě studované techniky srovnatelné. Na úrovni LOQ u obou metod nepřesáhla hodnota RSD naměřených ploch 20 % a na vyšších koncentračních úrovních byla nižší než 15 % s výjimkou jednoho kalibračního bodu v UHPLC pro analyt bufedron – 20,5 % na úrovni LOQ a butylon – 15,2 % na vyšší koncentrační hladině.

Koeficient determinace R^2 byl vždy vyšší než 0,990 v případě obou technik s výjimkou 3-MMC a ethylonu v UHPLC. Lineární koncentrační rozsah byl pro obě metody v rozsahu dvou až tří koncentračních řádů. Horní limit kvantifikace (ULOQ) byl omezen nelineárním průběhem kalibrační křivky u plochy píků větší než dva milióny.

Vážená lineární regrese ($1/x^2$) poskytla pro většinu sloučenin dostatečnou přesnost $\pm 15\%$ [35], s výjimkou jediného koncentračního bodu v UHPLC pro katinon – 81,2 %, 3-MMC – 124,1 % a ethylon – 119,4 %.

4.1.5. Matriční efekt

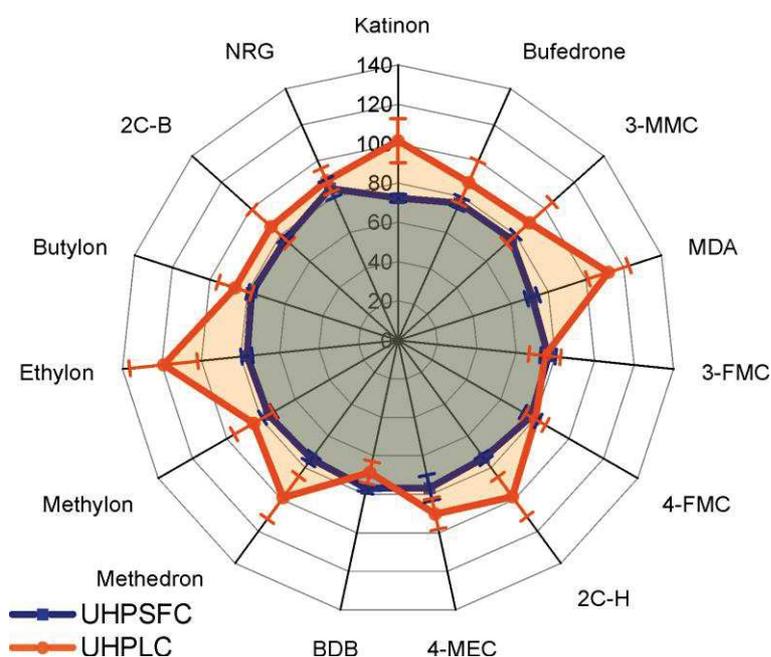
Jednoduché zpracování vzorku neumožnilo odstranit matriční efekt (ME) potlačující iontový signál všech analytů v UHPSFC i UHPLC (Obr. 3). Průměrný matriční efekt byl pro obě techniky téměř stejný (62 % UHPLC a 65 % UHPSFC). V případě UHPSFC byl matriční efekt pro různé sloučeniny v rozsahu od 47 % do 73 % s průměrným RSD určeným z matričních efektů pro všechny analyty na všech koncentračních úrovních okolo 6,3 %. U druhé z technik se matriční efekty pro jednotlivé NPS pohybovaly v širším rozmezí 39 % – 94 % a průměrná hodnota RSD byla 12,3 %. Z důvodu nedostupnosti standardů NPS značených stabilními izotopy, lze považovat za výhodu vyrovnanější matriční efekty v UHPSFC. Při volbě jedné z látek jako vnitřní standard bude v UHPSFC její chování bližší ostatním stanovovaným látkám.



Obr. 3: Matriční efekty u techniky UHPSFC-MS a UHPLC-MS. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce matričního efektu pro danou látku a všechny její koncentrační hladiny.

4.1.6. Výtěžnost

Stejně jako u matričního efektu, tak i u výtěžnosti UHPSFC poskytovala bližší hodnoty pro různé látky. Průměrná výtěžnost (RE) byla 76 % a celkově se pro UHPSFC techniku pohybovala v rozmezí 71 až 85 % (Obr. 4). Nebyly pozorovány žádné významnější změny výtěžnosti v závislosti na koncentraci, jak dokládají malé chybové úsečky v grafu na Obr. 4. Průměrná hodnota RSD výtěžnosti pro všechny analyty a všechny koncentrační úrovně byla 4,1 %. U UHPLC byla většinou dosažena vyšší výtěžnost než u UHPSFC (v průměru 91 %), avšak v širším intervalu od 69 % do 119 % (Obr. 4) U většiny sloučenin (katinon, 2C-H, bufedron, 3-MMC, 3-FMC, 4-MEC, methedron, methylon, bytylon) výtěžnost klesala se zvyšující se koncentrací. Rozdíly ve výtěžnosti mezi nejnižšími a nejvyššími body kalibrační závislosti byly u uvedených sloučenin vyšší než 20 %. Tato závislost RE na koncentraci může negativně ovlivnit kvantifikaci NPS. Průměrná hodnota RSD výtěžnosti byla pro veškeré analyty a všechny koncentrační úrovně 11,6 %, což je téměř trojnásobně vyšší hodnota než v případě techniky UHPSFC. Rozdíly ve výtěžnosti mezi technikami UHPSFC a UHPLC zjevně souvisely s použitím rozdílného rozpouštědla při zpracování vzorků. Stejně jako u matričního efektu, tak i v případě výtěžnosti jsou kompaktnější výsledky získané technikou UHPSFC příznivější pro použití neznačeného vnitřního standardu.



Obr. 4: Výtěžnost pro UHPSFC-MS a UHPLC-MS. Chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce výtěžností pro danou látku a všechny její koncentrační hladiny.

4.1.7. Přenos analytu do následných analýz (carryover)

Přenos analytu do následné analýzy byl v případě UHPLC vždy nižší než LOD. V UHPSFC byl pro katinon a 2C-B přibližně 120 % LOQ a 45-80 % LOQ pro MDA, 2C-H,

methedron a methylon. Při druhém nástřiku slepého vzorku byl přenos pod LOD u všech analytů i u UHPSFC. Méně účinný oplach systému superkritické fluidní chromatografie může být způsoben slabší eluční silou mobilní fáze. Přesto i nejvyšší přenos pozorovaný u kationu odpovídá méně než 0,4 % nástřikovaného množství (ULOQ bylo 5000 ng/ml, nástřik 5 μ l). K minimalizování přenosu je vhodné analyzovat vzorky od nejnižší po nejvyšší koncentraci nebo proložit sekvenci analyzovaných vzorků nástřikem slepých vzorků, to však prodlužuje celkovou dobu analýzy.

4.1.8. Závěr

Pro stanovení patnácti nových psychoaktivních látek v moči byly navrženy a validovány dvě jednoduché a rychlé metody, UHPLC a UHPSFC. Přestože pro úpravu vzorků moči byl použit jednoduchý postup „zředit-zfiltrvat-analyzovat“, validační parametry výtěžnost i matriční efekt se pohybovaly v akceptovatelném rozmezí. Metoda založená na UHPSFC poskytovala z hlediska těchto dvou parametrů kompaktnější výsledky, zatímco u UHPLC metody byly pozorovány větší odchylky pro různé látky a koncentrační úrovně. V případě UHPSFC docházelo na vyšších koncentračních hladinách k pozorovatelnému přenosu analytu do následné analýzy, čemuž lze zamezit proložením sekvence nástřikem slepého pokusu.

Separace izomerů byla úspěšnější při použití UHPSFC, kde se uplatňují polární interakce ve stacionární fázi, což přispělo k izomerní selektivě ve srovnání s nepolární stacionární fází v UHPLC. Systém UHPSFC se v tomto kontextu více podobá kapalinové chromatografii na normálních fázích, přičemž je však přidavkem pomocné kapaliny dosaženo lepší kompatibility s ionizací elektrospřejem.

S ohledem na omezenou dostupnost či přímo nedostupnost standardů NPS značených stabilními izotopy se jako vhodnější jeví metoda založená na UHPSFC, která poskytla podobné matriční efekty a zejména výtěžnosti pro různé NPS. Jedna ze studovaných látek (např. methylon) může být zvolena jako interní standard pro stanovení ostatních studovaných NPS.

4.2. Analýza nových psychoaktivních látek pomocí spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií

4.2.1. Vliv volby driftového plynu na iontově mobilní separaci vybraných nových psychoaktivních látek

Spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií (IM-MS) bylo využito při analýze 18 NPS. Pozornost byla věnována především izobarickým a izomerním směsím těchto látek. Sledován byl vliv změny driftového plynu (N_2 , Ar a CO_2) na selektivitu separace NPS. V Tab. II jsou shrnuty zjištěné driftové časy. Přestože se driftové časy pro jednotlivé izomerní látky a jejich směsi mírně liší, zlepšení rozlišení změnou driftového plynu často není dostačující a látky nelze ve směsi odseparovat. Největší rozdíl v driftovém čase (nejlepší rozlišení) vůči izobarickým látkám (3-FMC a 4-FMC) lze pozorovat pro 2C-H v N_2 .

Tab. II. Driftové časy izomerních a izobarických NPS ve třech plynech.

Látka	Driftový čas v N_2	Driftový čas v Ar	Driftový čas v CO_2
butylon	7,32	7,38	8,03
ethylon	7,38	7,43	7,92
3-MMC	6,35	6,35	7,11
bufedron	6,13	6,13	6,78
3-FMC	6,08	6,02	7,11
4-FMC	6,02	5,97	7,05
2C-H	6,51	N/A	7,27
BDB	6,78	N/A	7,65
methedron	6,67	6,56	7,43

4.2.2. Určování účinného srážkového průřezu

Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií byla dále použita ke zjišťování charakteristické veličiny – účinného srážkového průřezu (neboli collision cross section; CCS). Účinný srážkový průřez nových psychoaktivních látek byl určován na přístroji s mobilní celou TWIMS (iontová mobilita s využitím putující vlny), která vyžaduje kalibraci.

Kalibrace přístroje byla provedena na dva typy kalibrantů – polyalanin a směs nízkomolekulárních látek [36]. Polyalanin poskytuje jednonásobně nabitě oligomery, které pokrývají rozsah m/z 231 – 799 a rozsah CCS 150 – 464 Å². Je vhodný pro pozitivní i negativní mód. Druhým testovaným kalibrantem byla směs nízkomolekulárních látek obsahující acetaminofen, alprenolol, N-ethylanilín, clozapin-N-oxid, kolchicin, ondasetron, reserpin

a verapamil, jejichž rozsah m/z 122 – 609 dobře pokrývá rozsah m/z testovaných psychoaktivních látek. Účinný srážkový průřez (CCS) této směsi je v rozmezí 124,5 – 254,2 Å².

V případě obou kalibrantů je důležité nastavení rychlosti vlny tak, aby se celý rozsah mobilitních píků (celá obálka) kalibrantu nacházel v jednom mobilitním okně. Při špatném nastavení rychlosti vlny přecházejí mobilitní píky kalibrantu do dalšího mobilitního okna, což vede k chybným výsledkům. U obou kalibrantů byla zvolena rychlost vlny 700 m/s. Vždy byl změřen kalibrant (měření I), následně vzorek v 6-ti opakováních a znovu kalibrant (měření II). CCS byla vyhodnocována na obě kalibrační měření. Výsledky byly využity pro srovnání vhodnosti kalibračních směsí, testování přidávání automaticky nedetekovaných signálů kalibrantu (důvodem byla nízká intenzita) a korelace mezi těmito dvěma kalibranty. Data byla vyhodnocována v programu DriftScope. V případě obou kalibrantů získané hodnoty spolu dobře korelovaly. Přidání píků o nízké intenzitě hrálo větší roli při použití směsi nízkomolekulárních látek jakožto kalibrantu. Je vhodné přidat vždy všechny kalibrační body, které jsou k dispozici, aby byl kalibrantem co nejlépe pokryt interval měřených hodnot CCS kalibrantem.

Postup byl následně aplikován k zjištění hodnot CCS, které mohou být vhodnou dodatečnou charakteristikou látky doplňující informace získané z hmotnostního spektra. V Tab. III jsou shrnuty výsledky pro modelovou směs. Hodnoty CCS získané při analýze jednotlivých psychoaktivních látek (modelové standardy) jsou prakticky shodné s hodnotami získanými pro danou látku ve směsi (modelové vzorky), byť byly měřeny s časovým odstupem 16 dnů. Podobně lze očekávat shodu mezi standardy a reálnými vzorky.

Tab. III. Hodnoty CCS pro nové psychoaktivní látky v modelové směsi měřené na kalibrant Polyalanin.

	analyzovaná látka	CCS (Å²) pro standardy	CCS (Å²) Zjištěné při analýze ve směsi Kalibrant I	R²	CCS (Å²) Zjištěné při analýze ve směsi Kalibrant II	R²
směs 5-ti látek	3-FMC	141,40	140,01±0,02	0,9985	138,83±0,02	0,9906
	butylon	153,17	151,89±0,03		150,79±0,03	
	katinon	133,90	134,26±0,12		133,03±0,12	
	NRG	177,17	177,81±0,12		176,98±0,12	
	EPH	161,50	161,62±0,08		160,63±0,08	

4.2.3. Závěr

Byl testován vliv druhu driftového plynu pro iontově mobilitní separaci izobarických a izomerních látek. Driftové časy se pro jednotlivé izomerní látky a jejich směsi lišily pouze mírně a nebylo dosaženo potřebného rozlišení vrcholů překrývajících se píků. Iontově mobilitní separací se nepodařilo látky ve směsi rozlišit. Vzhledem k dobré opakovatelnosti/stabilitě profilů mobilitních píků byl navržen nový postup zabývající se rozlišením překrývajících se mobilitních píků. O této problematice pojednává kap. 4.3., kde je testován nový postup na modelových směsích oligosacharidů kyseliny hyaluronové.

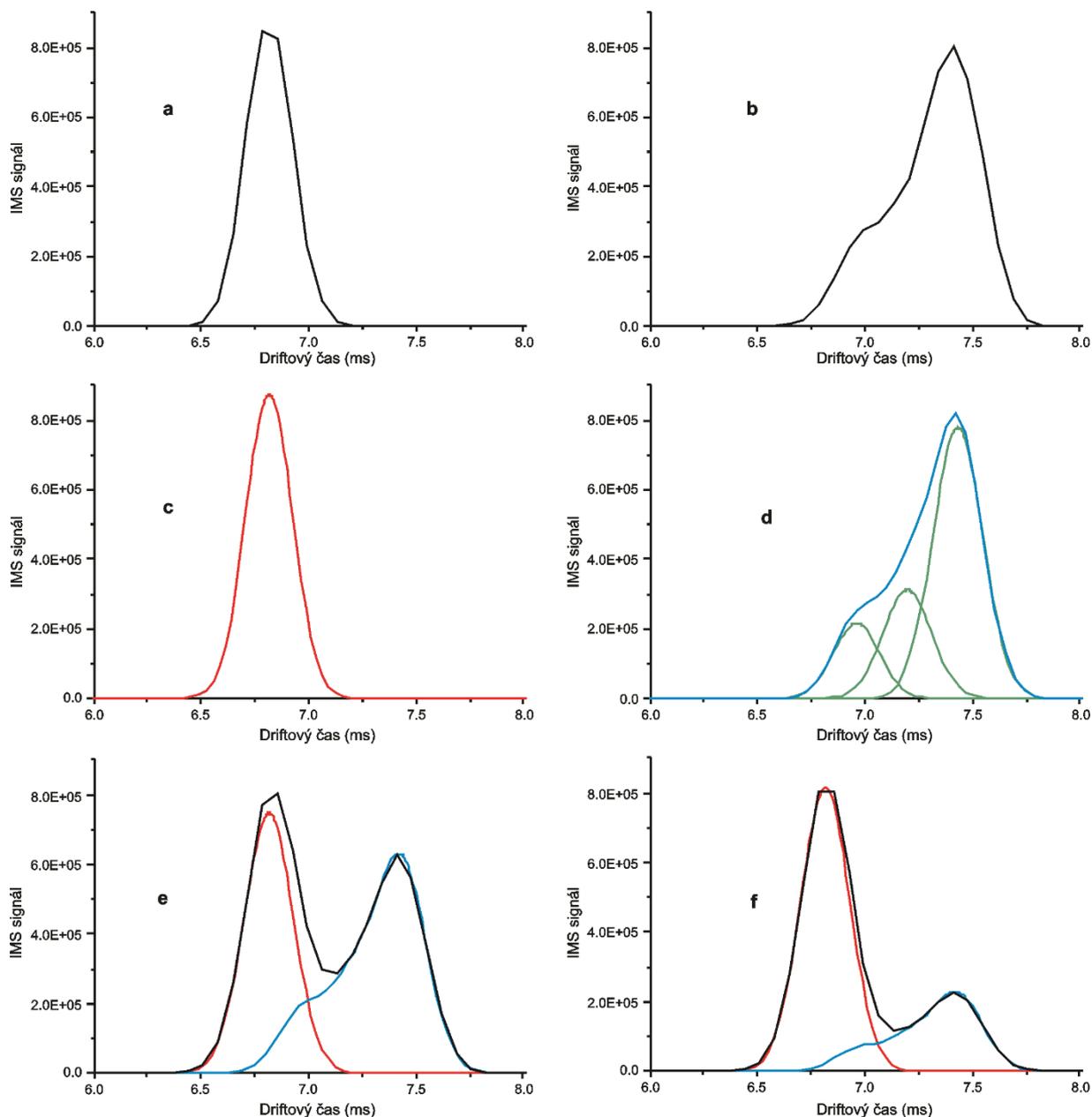
Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní detekcí byla použita k určování účinného srážkového průřezu na přístroji s mobilitní celou TWIMS. Významným parametrem nastavení byla rychlost vlny, jelikož při jejím špatném nastavení dochází k přechodu mobilitních píků kalibrantu do dalšího mobilitního okna, což vede k chybným výsledkům. Byl testován druh kalibrantu, přidávání automaticky nedetekovaných signálů kalibrantu a korelace mezi těmito dvěma kalibranty. Následně byl postup aplikován na modelovou směs pěti látek, pro kterou byly zjištěny hodnoty CCS. Hodnoty CCS pro jednotlivé standardy látek se dobře shodovaly s hodnotami získanými při analýze směsi, což ukazuje na potenciál CCS při identifikaci látek, kdy je možné porovnávat CCS neznámé látky se standardem.

4.3. Určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků

4.3.2. Postup zpracování dat, tvorba ATD funkce

Gaussovský ATD profil je možné získat pro sloučeniny poskytující ionty s pouze jedním geometrickým uspořádáním. Rozšířené a asymetrické ATD profily příslušející jedné sloučenině jsou známkou přítomnosti iontů lišících se v jejich geometrickém uspořádání. Každé z těchto uspořádání přispívá k vytvoření ATD profilu, který je možné popsat lineární kombinací Gaussovských funkcí. V ideálním případě se počet funkcí rovná počtu uspořádání.

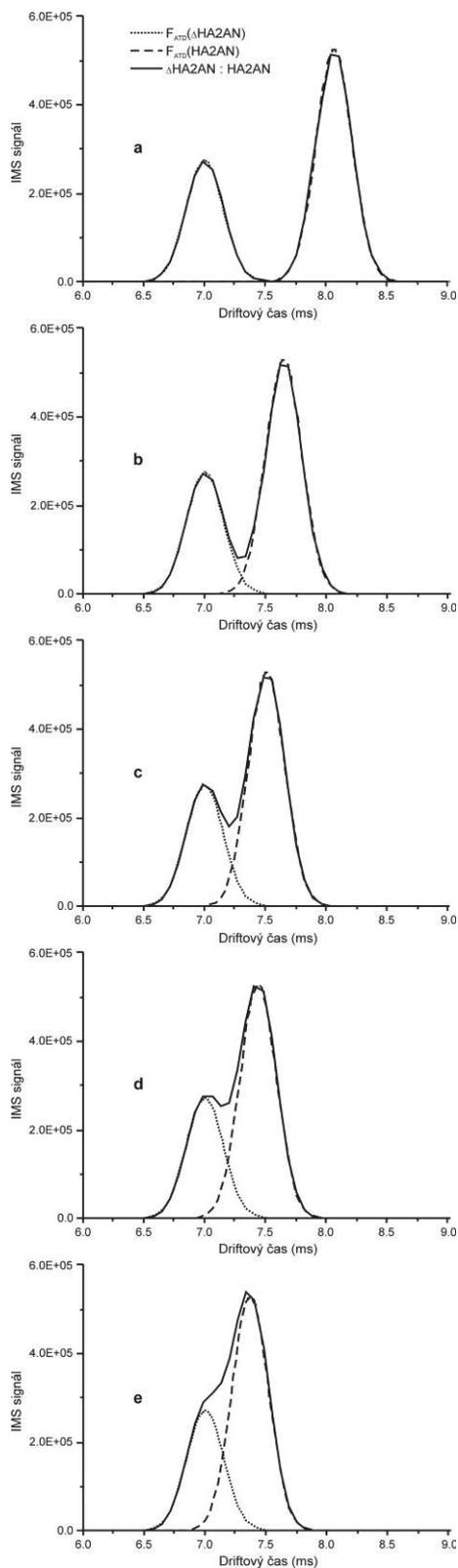
Uváděný postup je vhodný ke zpracování mobilitních dat naměřených pro binární směsi, u nichž počet geometrických uspořádání nebyl znám. Postup zahrnoval celkem tři kroky: **1)** získání mobilogramů standardů (jejichž hmotnostní spektra mohou být shodná) nebo mobilogramů vykreslených pro jedinečné fragmentové ionty dané látky, čímž se obdrží ATD profil jednotlivých sloučenin (Obr. 5 a, b); **2)** každý profil je popsán jednou (Obr. 5 c) nebo několika Gaussovskými funkcemi (Obr. 5 d), Gaussovská funkce nebo kombinace těchto funkcí vytváří pro každou sloučeninu ATD funkci (F_{ATD}) (červená a modrá křivka na Obr. 5 c, d); **3)** získané ATD funkce jsou aplikovány na mobilogramy vzorků k určení plochy píku jednotlivých sloučenin v binární směsi (Obr. 5 e, f).



Obr. 5: Schéma zpracování dat: a), b) experimentální ATD profily (mobilogramy) měřené pro jednotlivé sloučeniny; c), d) popsání jednotlivých profilů jednou (c) nebo několika (v tomto případě třemi – zelená křivka) (d) Gaussovskými funkcemi a vytvořené ATD funkce (červená a modrá křivka); e), f) použití vytvořené ATD funkce na experimentální mobilogramy odpovídající dvěma binárním směsím o různých poměrech sloučenin.

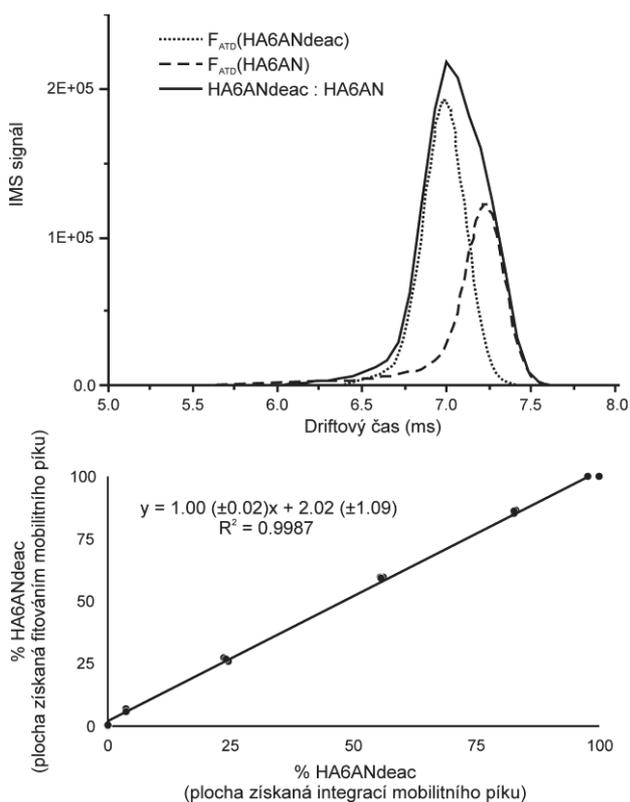
4.3.3. Aplikace ATD funkce na modelové směsi

Výše uvedený postup byl testován na modelových směsích (Δ HA2AN : HA2AN a HA3NN : HA4NA) s manuálním posunem/překryvem vrcholů píků. Při tomto testování byly použity směsi látek, které se lišily hodnotami m/z. Jejich mobilogramy tak mohly být extrahovány/vykresleny a nezávisle integrovány, čímž byla získána plocha píku pro každý oligosacharid ve směsi. Plochy pak byly porovnány s hodnotami získanými aplikací ATD funkcí. Složky Δ HA2AN a HA2AN vykazovaly symetrické ATD profily. Oba z těchto profilů byly dobře popsány pouze jednou Gaussovskou funkcí, která v těchto případech byla rovněž jejich ATD funkcí (Obr. 6). ATD funkce byly aplikovány na binární modelovou směs obsahující Δ HA2AN a HA2AN, přičemž byla modelována různá míra separace výše zmíněným posunem dat (Obr. 6 a-e). Aplikací testované metody se podařilo prokázat přítomnost obou oligosacharidů i v případě mobilogramu s jedním maximem (Obr. 6 e). Popisovaným postupem bylo dosaženo dobrých výsledků pro různě se překrývající píky oligosacharidů. Ve všech stupních separace bylo docíleno dobré korelace mezi plochami získanými na základě fitování a hodnotami získanými integrací mobilních píků ($R^2 \geq 0.9995$, směrnice~1). Druhá modelová směs HA3NN : HA4NA je blíže uvedena v disertační práci.



Obr. 6: Modelové iontově mobilitní separace směsi $\Delta HA2AN : HA2AN$ (50:50, w/w). Aplikován byl posun mobilogramu HA2AN (v binech) a) 11, b) 5, c) 3, d) 2, e) 1. ATD funkce byly získány pomocí standardů $\Delta HA2AN$ (m/z 378,081) a HA2AN (m/z 396,096).

Dalším příkladem je směs obsahující oligosacharidy HA6ANdeac a HA6AN, která poskytovala pouze jeden mírně deformovaný pík (Obr. 7). K popsání ATD profilů jednotlivých složek (měření standardů) bylo využito dvou respektive pěti Gaussovských funkcí. Aplikace ATD funkcí $F_{ATD}(HA6ANdeac)$ a $F_{ATD}(HA6AN)$ umožnila odhalit příspěvek obou oligosacharidů tomuto jednomu píku. Podobně jako v obou předchozích případech se ionty oligosacharidů lišily hodnotou m/z , což umožnilo nezávisle integrovat jejich mobilogramy. Výsledky získané integrací a fitováním dobře korelovaly ($R^2 = 0.9987$, směrnice ~ 1 , Obr.7).



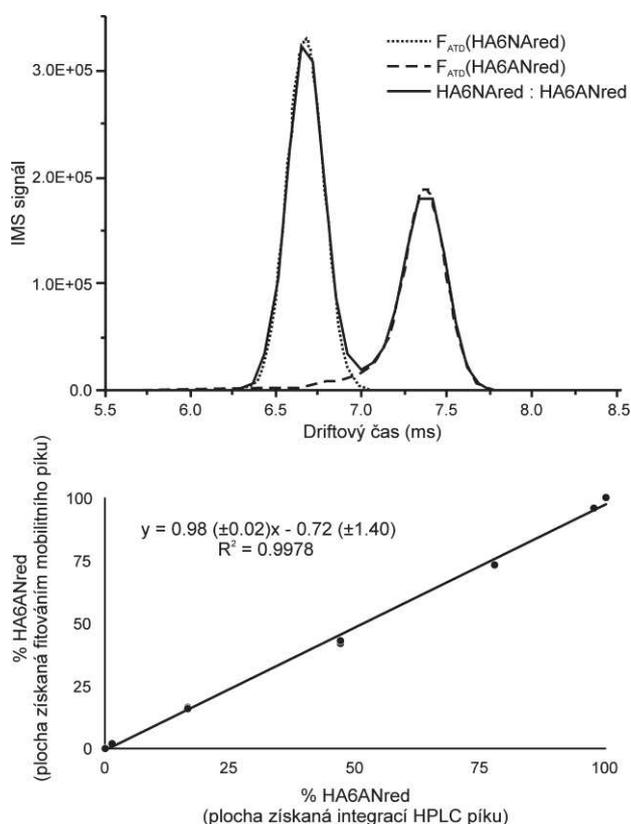
Obr. 7: Mobilogram směsi HA6ANdeac (m/z 1112,302) : HA6AN (m/z 1154,316) (50:50, w/w). Lineární korelace poměrů plochy píku HA6ANdeac ku celkové ploše. Poměry byly vypočteny z dat získaných fitováním a integrací. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.

Jak je již uvedeno u výše popsaných příkladů, výsledné ATD funkce složek binárních směsí byly aplikovány na vzorky s různým zastoupením složek (0:100, 5:95, 25:75, 50:50, 75:25, 95:5 a 100:0). V případě nízkého obsahu minoritní složky ($\leq 5\%$) nacházející se v hůře separované binární směsi dochází ke zhoršení její detekovatelnosti i korelace mezi plochou této složky získanou pomocí fitování a integrací mobility píků. Pro vyšší plochy minoritní složky zjištěné plochy vzájemně dobře korelovaly u všech tří směsí. Vlivy jako nízký obsah složky, horší separace a také tvar ATD profilu vedou k obtížnější detekci a mohou způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky. Přesto se minoritní složku podařilo v řadě vzorků detekovat.

4.3.4. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi

Po provedení testů na modelových směsích byl výše popsán postup aplikován také na analýzu směsí izomerů oligosacharidů. První izomerní směs tvořily oligosacharidy HA6NAred : HA6ANred, které byly mobilitně poměrně dobře separovány (Obr. 8). Profil HA6NAred byl popsán jednou Gaussovskou funkcí a profil HA6ANred pěti funkcemi. Plochy píků složek získané fitováním byly srovnány s hodnotami z integrací mobilitních i HPLC dat. V případě integrace mobilitních dat (aplikována integrace ke kolmici) byla plocha HA6NAred nadhodnocena v důsledku frontování druhého píku (HA6ANred). Nadhodnocení lze doložit srovnáním poměrů ploch složek. HPLC data poskytla poměr ploch izomerů 22,2 : 77,8. Integrací mobilogramu byl získán poměr 31,8 : 68,2 a testovaným postupem 26,9 : 73,1. Z výsledků je patrné, že poměr získaný námi navrženým postupem byl bližší HPLC separaci, kdy jsou izomery zcela separovány. Výsledky získané na základě fitování dobře korelovaly s výstupy z HPLC ($R^2 = 0.9978$, Obr. 8).

Separace druhé testované směsi obsahující izomery HA4ANred a HA4NAred již nebyla úplná. Bližší popis této separace je uveden v disertační práci.



Obr. 8: Mobilogram izomerní směsi (HA6NAred : HA6ANred, 50:50 w/w) pro $m/z = 1157,405$. Lineární korelace poměrů plochy píku HA6ANred ku celkové ploše směsi. Poměry byly vypočteny z dat získaných fitováním a HPLC. V závorkách jsou uvedeny intervaly spolehlivosti.

4.3.5. Aplikace ATD funkce na izomerní směsi při využití jedinečných fragmentových iontů

V předchozích kapitolách byly pro fitování využity ATD funkce generované na základě naměřených dat pro standardy. Vytvoření ATD funkcí je také možné pomocí mobilogramů vykreslených pro jedinečné fragmentové ionty příslušného izomeru. Postup vyžadoval dvě analýzy izomerní směsi: i) CID (kolizí indukovaná disociace) byla aplikována po mobilitní separaci s následným vykreslením ATD profilů pro hodnoty m/z jedinečných fragmentových iontů (podmínkou je dostatečná intenzita jejich signálu). Následným fitováním ATD profilů byly získány výsledné ATD funkce pro oba izomery. ii) Vytvořené ATD funkce byly poté použity na data stejného vzorku naměřeného bez CID. Takový postup umožňuje odlišit ATD profily a určit plochy pro izomery, u kterých nejsou k dispozici standardy. Oba přístupy, jak tvorba ATD funkcí na standardech, tak pomocí jedinečných fragmentových iontů, byly testovány na dvou binárních izomerních směsích o třech různých poměrech (Tab. IV). Získané výsledky vykazují dobrou shodu.

Tab. IV. Poměry ploch píků stanovené HPLC a dvěma přístupy fitování mobilitních píků pro různé poměry izomerů.

Izomerní směs	HPLC ^a	Fitování (standardů) ^{a,b}	Fitování (jedinečných fragmentových iontů) ^{a,c}
HA4ANred : HA4NAred	27,1 : 72,9 (0,2)	25,6 : 74,4 (0,4)	25,3 : 74,7 (0,6)
HA4ANred : HA4NAred	69,2 : 30,8 (0,1)	67,9 : 32,1 (0,2)	67,5 : 32,5 (0,2)
HA4ANred : HA4NAred	97,5 : 2,5 (0,1)	96,5 : 3,5 (0,2)	96,4 : 3,6 (0,1)
HA6ANred : HA6NAred	76,5 : 23,5 (0,5)	78,9 : 21,1 (0,3)	78,0 : 22,0 (0,3)
HA6ANred : HA6NAred	27,3 : 72,7 (0,6)	32,3 : 67,7 (0,2)	30,0 : 70,0 (0,2)
HA6ANred : HA6NAred	2,0 : 98,0 (0,1)	3,7 : 96,3 (0,1)	2,4 : 97,6 (0,1)

^a V závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky.

^b ATD funkce získaná pomocí standardů.

^c ATD funkce získaná pomocí jedinečných fragmentových iontů.

4.3.6. Závěr

Navržený jednoduchý postup pro určování plochy překrytých mobilitních píků vychází z dobré opakovatelnosti driftového času a tvaru mobilitního píku (ATD profilu). Tvar píku je popsán jednou nebo vícero Gaussovskými funkcemi a je získána tzv. ATD funkce

pro jednotlivé složky v binárních směsích např. izomerů. K vyhodnocení byl použit program OriginPro 2015, avšak může být aplikován i jiný software umožňující stejnou analýzu píků. Fitování a tvorba ATD funkce pomocí standardů dovoluje analyzovat směsi látek s identickými hmotnostními spektry. Identifikace a kvantifikace látek se stejným elementárním složením je příkladem aplikace, která je obtížná i pro hmotnostní spektrometry s velmi vysokou rozlišovací schopností. V případě nedostupnosti standardů lze tento postup použít, pokud složky ve směsi poskytují odlišné fragmentové ionty. Navržený postup, který byl aplikován na oligosacharidy odvozené od kyseliny hyaluronové, umožňuje prokázat minoritní složky ve směsi již od jejího zastoupení okolo 5 %. Lze jej uplatnit nejen při analýze oligosacharidů, ale také u dalších analytů špatně separovaných iontovou mobilitou.

5. ZÁVĚR

V souladu se stanovenými cíli byly v rámci předložené práce studovány a validovány dvě jednoduché a rychlé chromatografické metody, UHPLC a UHPSFC, pro stanovení 15 NPS v moči. K přípravě vzorků byl zvolen jednoduchý postup „zředit-zfiltrovat-analyzovat“. Metoda UHPSFC poskytovala kompaktnější výsledky v matričních efektech a výtěžnosti oproti UHPLC, avšak na vyšších koncentračních hladinách docházelo k přenosu analytu do následné analýzy. Všechny dvojice izomerů psychoaktivních látek se podařilo úspěšně separovat jen technikou UHPSF. Pomocí UHPLC se nepodařilo rozlišit izomery 3-FMC a 4-FMC. Z důvodu nedostupnosti standardů NPS značených stabilními izotopy se UHPSFC jeví jako vhodnější technika, a to díky podobnějším matričním efektům a výtěžnostem pro různé NPS.

Rovněž byla studována separace NPS pomocí iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií, včetně určování hodnot CCS pro tyto látky. Testován byl vliv druhu driftového plynu k rozlišení izomerních látek. Driftové časy těchto párů byly ve všech plynech velice podobné a nepodařilo se látky dostatečně odseparovat. Ukázána však byla možnost využít CCS jako charakteristiku dané látky.

Dobrá opakovatelnost iontové mobilitních profilů dovolila navrhnout nový postup k určení ploch nedostatečně separovaných mobilitních píků. Studovaný postup byl testován na oligosacharidech odvozených od kyseliny hyaluronové. Podařilo se prokázat jeho aplikovatelnost na nedostatečně separované binární směsi. Obecně jej lze uplatnit i na jiné látky než oligosacharidy.

Jedním z hlavních hledisek při vývoji analytických metod je jejich časová náročnost. Důraz kladený na rychlou identifikaci neznámé látky bývá podstatný zejména při určování intoxikace. Výše uvedené výsledky poukazují na možnosti rychlých separací především v oblasti analýzy toxikologicky nebo biologicky zajímavých látek.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] D. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure*, J. Sep. Sci 29 (2006) 1836–1848.
- [2] A. de Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gélébart, F. David, P. Sandra, *Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations*, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 60–69.
- [3] S. Eeltink, B. Wouters, G. Desmet, M. Ursem, D. Blinco, G. D. Kemp, A. Treumann, *High-resolution separations of protein isoforms with liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry using polymer monolithic capillary columns*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 5504–5511.
- [4] F. Detobel, K. Broeckhoven, J. Wellens, B. Wouters, R. Swart, M. Ursem, G. Desmet, S. Eeltink, *Parameters affecting the separation of intact proteins in gradient-elution reversed-phase chromatography using poly(styrene-co-divinylbenzene) monolithic capillary columns*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3085–3090.
- [5] K. Hormann, T. Müllner, S. Bruns, A. Höltzel, U. Tallarek, *Morphology and separation efficiency of a new generation of analytical silica monoliths*, J. Chromatogr. A 1222 (2012) 46–58.
- [6] Onyx brochure, Phenomenex, staženo 5. ledna 2018
<https://www.brebhuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/zhonyx.pdf>
- [7] N. Wu, J. Dempsey, P. M. Yehl, A. Dovletoglou, D. Ellison, J. Wyvratt, *Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using Monolithic Columns*, Anal. Chim. Acta, 2004, 523, 149–156.
- [8] G. Guichon, *The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1126 (2006) 6–49.
- [9] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, *Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles*, J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 57–71.
- [10] N. Tanaka, *Core-Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography*, Anal. Chem. 88 (2016) 279–298.

- [11] S. Deridder, G. Desmet, *Effective medium theory expressions for the effective diffusion in chromatographic beds filled with porous, non-porous and porous-shell particles and cylinders. Part II: Numerical verification and quantitative effect of solid core on expected B-term band broadening*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 46–56.
- [12] L. Nováková, A. G. -G. Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. I: Investigation of mobile phase and MS conditions*, Anal. Chim. Acta 853 (2015) 637–646.
- [13] L. Nováková, M. Rentsch, A. G. -G. Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Ultra high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. II: Analysis of biological samples*, Anal. Chim. Acta 853 (2015) 647–659.
- [14] A. G. -G. Perrenoud, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds*, J. Chromatogr. A, 1266 (2012) 158–167.
- [15] S. Fekete, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice*, J. Chromatogr. A, 1408 (2015) 1–14.
- [16] Ch. Gourmel, A. G. -G. Perrenoud, L. Waller, E. Reginato, J. Verne, B. Dulery, J. -L. Veuthey, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillarme, *Evaluation and comparison of various separation techniques for the analysis of closely-related compounds of pharmaceutical interest*, J. Chromatogr. A, 1282 (2013) 172–177.
- [17] K. Plachká, L. Chrenková, M. Douša, L. Nováková, *Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities*, J. Pharm. Biomed. Anal. 125 (2016) 376–384.
- [18] V. Desfontaine, L. Nováková, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J. -L. Veuthey, D. Guillarme, *Liquid chromatography and supercritical fluid chromatography as alternative techniques to gas chromatography for the rapid screening of anabolic agents in urine*, J. Chromatogr. A, 1451 (2016) 145–155.

- [19] A. C. O. Costa, J. L. da Costa, F. G. Tonin, M. F. M. Tavares, G. A. Micke, *Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples*, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 140–143.
- [20] V. M. Rizelio, L. Tenfen, R. da Silveira, L. V. Gonzaga, A. C. O. Costa, R. Fett, *Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples*, Talanta 93 (2012) 62– 66.
- [21] Y. Jiang, Y. Ma, *A Fast Capillary Electrophoresis Method for Separation and Quantification of Modified Nucleosides in Urinary Samples*, Anal. Chem.81 (2009) 6474–6480.
- [22] J. F. Banks Jr., T. Dresch, *Detection of Fast Capillary Electrophoresis Peptide and Protein Separations Using Electrospray Ionization With a Time-of-Flight Mass Spectrometer*, Anal. Chem. 68 (1996) 1480–1485.
- [23] A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H. H. Hill Jr., *Ion mobility–mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 1–22.
- [24] H. H. Hill Jr., W. F. Siems, R. H. St. Louis, *Ion mobility spectrometry*, Anal. Chem. 62 (1990) 1201–1209.
- [25] Ion Mobility Training brochure: 1. Overview, Waters (2012).
- [26] F. Lanucara, S. W. Holman, Ch. J. Gray, C. E. Eyers, *The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics*, Nat. Chem. 6 (2014) 281–294.
- [27] L. Borovcová, M. Hermannová, V. Pauk, M. Šimek, V. Havlíček, K. Lemr, *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, Anal. Chim. Acta 981 (2017) 71–79.
- [28] J. P. Smith, O. B. Sutcliffe, C. E. Banks, *An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs)*. Analyst 140 (2015) 4932–4948.
- [29] World Drug Report 2017, staženo 5. ledna 2018
https://www.unodc.org/wdr2017/field/WDR_2017_presentation_lauch_version.pdf
- [30] S. Karch, *Cathinone Neurotoxicity (“The “3Ms”)*, Curr. Neuropharmacol. 13 (2015) 21–25.

- [31] L. J. Marinetti, H. M. Antonides, *Analysis of synthetic cathinones commonly found in bath salts in human performance and postmortem toxicology: Method development, drug distribution and interpretation of results*, J. Anal. Toxicol. 37 (2013) 135–146.
- [32] J. P. Kelly, *Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology*, Drug Test. Anal. 3 (2011) 439–453.
- [33] L. Borovcová, V. Pauk, K. Lemr, *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) – v tisku DOI: 10.1002/jssc.201800006
- [34] V. Pauk, V. Žihlová, L. Borovcová, V. Havlíček, K. Schug, K. Lemr, *Fast separation of selected cathinones and phenylethylamines by supercritical fluid chromatography*, J. Chromatogr. A 1423 (2015) 169–176.
- [35] H. Gu, G. Liu, J. Wang, A. -F. Aubry, M. E. Arnold, *Selecting the Correct Weighting Factors for Linear and Quadratic Calibration Curves with Least-Squares Regression Algorithm in Bioanalytical LC-MS/MS Assays and Impacts of Using Incorrect Weighting Factors on Curve Stability, Data Quality, and Assay Performance*, Anal. Chem. 86 (2014) 8959–8966.
- [36] I. Campuzano, M. F. Bush, C. V. Robinson, C. Beaumont, K. Richardson, H. Kim, H. I. Kim, *Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry: Comparison of Theoretical and Experimentally Derived Nitrogen Collision Cross Sections*, Anal. Chem. 84 (2012) 1026–1033.

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: Lucie Borovcová
Adresa: Opavská 13, 748 01 Hlučín
Email: lucie.borovcova@volny.cz

VZDĚLÁNÍ

- 09/2012 – současnost
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie
- 2010 – 06/2012
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.
diplomová práce: „Studium ionizace opiátů pro hmotnostně spektrometrickou analýzu vzorku moči“
V rámci tohoto studijního oboru získáno osvědčení o absolvování rozšiřujícího studijního modulu „**Analytická chemie ve forenzních vědách**“.
- 2007 – 2010
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.
bakalářská práce: „Nanomateriály a nanotechnologie v analytické chemii“

STÁŽE

- 7 - 9/2014
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o. na oddělení TSA. Získání praktických zkušeností v laboratoři kapalinové chromatografie – validace metod.
- 3 - 5/2014

Vědeckovýzkumná stáž – University of Vienna, Institute of Analytical Chemistry.
Vedoucí: prof. Dr. Andreas Rizzi. Strukturní analýza oligosacharidů získaných z glykoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

- 8/2011, 8/2012, 7/2013
Odborná studijní stáž v mezinárodní farmaceutické společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o. Získání praktických zkušeností v laboratoři kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
- 3 - 12/2011
Účast v projektu *Praktické aspekty ve výuce analytické chemie*. Řešení modelového úkolu na téma „Vypracování validačního protokolu pro stanovení doprovodných látek ve vybrané aktivní farmaceutické substanci metodou HPLC“ zpracovaného ve společnosti TEVA CZECH INDUSTRIES s.r.o.

PROJEKTY

- Člen týmu – Univerzita Palackého jako komplexní vzdělávací instituce CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002337
- Člen týmu – Efektivní zpracování vzorků se složkami matrice, IGA_PrF_2018_027
- Člen týmu – Multimodální zobrazování, GA ČR, 16-20229S
- Člen týmu – Vzorkování a účinnost desorpce/ionizace za atmosférického tlaku při hmotnostně spektrometrickém experimentu, GA ČR, GAP206/12/1150
- Člen týmu – Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu, IGA_PrF_2015_020
- Člen týmu – Modulární výuka jako nástroj odezvy vzdělávacího systému na potřeby praxe, CZ.1.07/2.2.00/28.0029
- Člen týmu – Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu, IGA_PrF_2014_031
- Člen týmu – Nové separační postupy pro zpracování analytických vzorků a jejich aplikace při vývoji, TA ČR, TA03010458
- Člen týmu – Desorpční nanoelektrosprej: instrumentace, povrchová analýza a zobrazování, COST, LD13005
- Člen týmu – Úprava vzorku při analýze složitých matric, IGA_PrF_2013_030

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

- LS 2017/2018 – ACH/PAC (Cvičení z pokročilé analytické chemie – 7 hod./týd.)
 - ACH/SOP (Seminář oborová praxe – 1 hod./týd.)
 - ACH/OP (Oborová praxe – zajištění praxe)
- LS 2016/2017 – ACH/PAC (Cvičení z pokročilé analytické chemie – 7 hod./týd.)
 - ACH/SOP (Seminář oborová praxe – 1 hod./týd.)
 - ACH/OP (Oborová praxe – zajištění praxe)
- LS 2014/2015 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)
- LS 2012/2013 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)

- *Konzultant diplomové práce* Bc. Jany Ondruchové na téma: „Účinný srážkový průřez při identifikaci drog spojením iontové mobility s hmotnostní spektrometrií“ – úspěšně obhájeno květen 2016.
- *Konzultant diplomové práce* Bc. Kláry Hejtmánkové na téma: „Chromatografická analýza fotoiniciátorů v obalových materiálech jako možných kontaminantů potravin“ – úspěšně obhájeno květen 2016.
- *Konzultant diplomové práce* Bc. Sandry Benické na téma: „Iontová pohyblivost s hmotnostní spektrometrií ve forenzní analýze“ – úspěšně obhájeno květen 2015.
- *Vedoucí bakalářské práce* Jany Ondruchové na téma: „Izolace a analýza účinných látek v rostlinném materiálu“ – úspěšně obhájeno květen 2014.

PUBLIKACE

- **Borovcová L.**, Pauk V., Lemr K., *Analysis of new psychoactive substances in human urine by ultra-high performance supercritical fluid and liquid chromatography: validation and comparison*, J. Sep. Sci. (2018) – v tisku
- **Borovcová L.**, Hermannová M., Pauk V., Šimek M., Havlíček V., Lemr K., *Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks*, Anal. Chim. Acta 981 (2017) 71-79.
- Skopalová J., Barták P., Bednář P., Tomková H., Ingr T., Lorencová I., Kučerová P., Papoušek R., **Borovcová L.**, Lemr K., *Carbon fiber brush electrode as a novel substrate for atmospheric solids analysis probe (ASAP) mass spectrometry:*

Electrochemical oxidation of brominated phenols, Anal. Chim. Acta 999 (2018) 60–68.

- Táborský J., Švidrnoch M., Kurka O., **Borovcová L.**, Bednář P., Barták P., Skopalová J., *Electrochemical oxidation of zopiclone*, Monatsh. Chem. 147 (2016) 53–60.
- Pauk V., Žihlová V., **Borovcová L.**, Havlíček V., Schug K., Lemr K., *Fast separation of selected cathinones and phenylethylamines by supercritical fluid chromatography*, J. Chromatogr. A 1423 (2015) 169–176.

KONFERENCE

- **Borovcová L.**, Fryčák P., Havlíček V., Lemr K., *Influence of pressure drop on signal in desorption nanoelectrospray mass spectra: Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2018*, Olomouc, ČR, 29. 1. – 1. 2. 2018 poster, abstrakt str. 68 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Pauk V., Thacker J., Bai L., Schug K., Lemr K., *Comparison of ultra-high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography methods for analysis of photoinitiators as potential food contaminants: HPLC 2017*, Praha, ČR, 18. – 22. 6. 2017, poster.
- **Borovcová L.**, Hartmanová L., Matušů T., Lorencová I., Havlíček V., Lemr K., *Drug analysis by desorption nanoelectrospray: 35th Informal Meeting on Mass Spectrometry*, Aussois, Francie, 7. – 11. 5. 2017, poster – abstrakt ve sborníku str. 54.
- **Borovcová L.**, Pauk V., Lemr K., *Fast separation in new designer drugs screening: Účast na soutěži Cena Shimadzu*: Práce byla vybrána z celkového počtu 52 zaslaných do užšího výběru, které byly prezentovány v rámci 68. sjezdu chemických společností v Praze 4. – 7. 9. 2016 a je publikována v Czech Chem. Soc. Symp. Ser 14, 159-310 (2016).
- **Borovcová L.**, Hejtmánková K., Lemr K., *Chromatographic analysis of photoinitiators in packaging materials as potencial contaminants of food: Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2016*, Olomouc, ČR, 6. – 9. 6. 2016 poster, abstrakt str. 83 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Kučera L., Barták P., Papoušek R., Behenský P., Lemr K., *GC/MS in development of herbal medicinal products: 20th International Conference „Analytical Methods and Human Health“*, Patince, SK, 15. – 18. 6. 2015 poster, abstrakt str. 139 ve Sborníku – 3. místo v posterové sekci.

- **Borovcová L.**, Pauk V., Benická S., Havlíček V., Lemr K., *Screening of new designer drugs*: 4. Konference české společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Hradec Králové, ČR, 15. – 17. 4. 2015 poster, abstrakt str. 57 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Rizzi A., Michael C., *The structural analysis of oligosaccharides released from glycoproteins by means of high – resolution mass spectrometry*: Konference projektu MOSYP CZ.1.07/2.2.00/28.0029, Branná, ČR, 24. – 26. 9. 2014 přednáška, abstrakt str. 13 ve Sborníku.
- **Borovcová L.**, Petreň M., Lemr K., *QuEChERS in new designer drugs screening: Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2014*, Olomouc, ČR, 10. – 14. 2. 2014 poster, abstrakt str. 97 ve Sborníku.

DALŠÍ AKTIVITY

- Funkční vzorek **FV02/ACH/2015** – *Laboratorní zařízení pro úpravu vzorků* – spoluautor (výstup projektu TAČR).
- Funkční vzorek **FV01/ACH/2013** – *Zlepšení reprodukovatelnosti desorpčního nanoelektrospreje pomocí teflonového nástavce* – spoluautor (výstup projektu COST).
- Smluvní výzkum pro společnost Waters, Teva.
- Asistenční činnost při organizaci exkurzí škol a popularizačních akcích.
- Recenzent bakalářských a diplomových prací.