

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Analýza nových syntetických drog - piperazinů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jakub Hajný
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Martin Švidrnoch
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 28.4.2014

.....
Jakub Hajný

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svým kolegům, kteří mi svým vřelým přístupem a neoblomnou snahou mi ve všem pomoci, zpříjemnili každodenní úkony, spojené se vznikem této bakalářské práce. Největší poděkování si zaslouží Mgr. Martin Švidrnoch, za jeho nekončící entuziasmus a skvělé vedení.

Děkuji také své rodinně za podanou pomocnou ruku, ochraňujíc mě po celou dobu mého studia. Především děkuji své přítelkyni Ngoc Mai Nguyen, která mi byla oporou při všech těžkých chvílích a radovala se s každého mého úspěchu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Hajný
Název práce	Analýza nových syntetických drog - piperazinů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Mgr. Martin Švidrnoch
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem podmínek pro stanovení piperazinových drog ve vzorcích moči pomocí spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. Teoretická část práce se věnuje obecnému úvodu do chemie nových syntetických drog a bližšímu obeznámení s piperazinovými drogami. Dále se věnuje obecné biotransformaci drog, se zaměřením na biotransformaci drog piperazinových. Součástí je i popis základních mechanismů kapilární elektroforézy, hmotnostní spektrometrie, jejich instrumentace a spojení. Experimentální část je zaměřená na optimalizaci purifikačního protokolu pro extrakci a zakoncentrování piperazinů. Také jsou v ní zkoumány podmínky pro separaci a detekci piperazinů v moči, mezi které patří např. vliv složení a koncentrace pracovního elektrolytu, jeho pH, průtok a složení pomocné kapaliny, teplota sprejovací kapiláry a tlak pomocného plynu. Optimalizovaná metoda byla aplikována na analýzu spikovaných vzorků moči.

Klíčová slova	nové syntetické drogy, piperazinové drogy, biotransformace drog, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	46
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Hajný
Title	Determination of piperazine-based new designer drugs
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of analytical chemistry
Supervisor	Mgr. Martin Švidrnich
The year of presentation	2014

Abstract

This work is focused on the optimization of conditions for the analysis of piperazine-derived designer drugs in urine samples using CE-ESI-MS/MS. The theoretical part deals with the general introduction of „new designer drugs“ and an introduction to the chemistry of piperazine-derived drugs. It also discusses the general biotransformation of drugs aimed at piperazine-derived drug biotransformation. It also includes a description of the basic mechanisms of capillary electrophoresis, mass spectrometry instrumentation and their hyphenation.

The experimental part is focused on optimizing the purification protocol for extraction and preconcentration of piperazines. It also investigates conditions for separation and detection of piperazines in urine samples including the influence the composition and concentration of the background electrolyte, the pH, flow rate and composition of the sheath liquid, spraying capillary temperature and pressure of the sheath gas. The optimized method was applied on spiked urine samples.

Keywords	new designer drugs, piperazine-derived drugs, biotransformation, capillary electrophoresis, mass spectrometry
Number of pages	46
Number of appendices	1
Language	Czech

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Syntetické drogy - piperaziny	2
2.2 Piperaziny	2
2.3 Metabolismus	4
2.3.1 Metabolismus piperazinových drog	9
2.4 Kapilární elektroforéza	12
2.4.1 Elektroforetická mobilita	12
2.4.2 Rozlišení	13
2.4.3 Elektroosmotický tok	13
2.4.4 Instrumentace	16
2.4.5 Kapiláry	16
2.4.6 Dávkování vzorku	17
2.4.7 Zdroj napětí	17
2.4.8 Detektory	17
2.4.9 Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CE-MS)	18
2.4.10 Iontový zdroj	18
2.4.10.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)	19
2.4.11 Hmotnostní analyzátor	21
2.4.12 Spojení CE-MS v toxikologické analýze	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Materiály a chemikálie	26

3.1.1 Chemikálie	26
3.1.2 Materiál	27
3.1.3 Přístrojové vybavení	27
3.2 Metody	28
3.2.1 Extrakce tuhou fází (SPE)	28
3.2.2 Purifikace a zakoncentrování metodou QuEChERS	29
3.2.3 Fragmentace pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (QqQ) a optimalizace kolizní energie	30
3.2.4 Metoda pro separaci vybraných piperazinových drog pomocí CE-ESI-MS	31
3.3 VÝSLEDKY A DISKUSE	32
3.3.1 Extrakce tuhou fází	32
3.3.2 Purifikace a zakoncentrování metodou QuEChERS	33
3.3.3 Fragmentace pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (QqQ) a optimalizace kolizní energie	34
3.3.4 Metoda pro separaci vybraných piperazinových drog pomocí CE-ESI-MS	36
4. ZÁVĚR	41
5. LITERATURA	42
6. SEZNAM ZKRATEK	44
7. PŘÍLOHY	46

1. ÚVOD

Už od nepaměti jsou návykové látky známé lidem pro své stimulační nebo halucinogenní účinky. Do návykových látek řadíme jakoukoliv chemickou sloučeninu, jež při opakované expozici vyvolává psychickou nebo fyzickou závislost. V organismu návykové látky napodobují účinek neurotransmiterů a tím způsobují biochemickou odezvu. Závislost je charakterizována změnami v chování a potřebou látku opakovaně užívat. Psychická závislost se projevuje nutkavostí k další dávce s vědomím, že po jejím podání se dostaví požadovaný účinek. Z nedostatku této látky se poté dostavují fyzické či psychické projevy, způsobené postupnou adaptací organismu, tudíž vznikem závislosti.

Kvůli vedlejším negativním účinkům se užívání návykových látek stalo ilegální. Lidská snaha obejít tento zákon vedla ke vzniku syntetických drog, ve světě známých jako tzv. „new designer drugs“. Do této skupiny patří např. velmi rozšířená extáze, tedy 3,4-methylendioxyamfetamin (MDMA), 1-(3-trifluorometylfenyl)piperazin, *N,N*-dimethyltryptamin aj. Tyto látky vznikají modifikací již existujících drog, z čehož vyplývá, že již obvykle nejsou nadále pod státním dohledem. Narůstající množství nových syntetických drog způsobuje nedostatek znalostí o jejich toxicitě a účincích, což je činí velice nebezpečnými. Problémem je také špatná průkaznost syntetických drog v případě diagnostiky stavu pacienta, důležitou pro poskytnutí lékařské péče. Je tedy velmi důležité držet krok s rozvíjejícím se drogovým trhem a zajistit tak odpovídající analyticko - chemický pokrok při průkazu a stanovení těchto látek.

Cílem této práce je vyvinout metodu spojením kapilární elektroforézy a hmotnostní spektroskopie, aplikovatelnou pro separaci nově se objevujících syntetických piperazinových drog.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Syntetické drogy - piperaziny

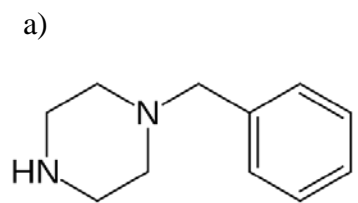
Syntetické drogy, ve světě známé jako „new designer drugs“ nebo také rekreační drogy, jsou nejvíce běžně užívané drogy. Tento problém je nejvíce rozšířen u mladých lidí, obzvláště v tanečních klubech. Tzv. „new designer drugs“ jsou heterogenní skupinou psychoaktivních látek, získaných modifikací chemické struktury určitého přírodního produktu nebo již existujících drog. Podle chemické struktury je můžeme dělit do následujících skupin [1]:

- Piperaziny – např. benzylpiperazin (viz Obr.1a), trifluorometylfenylpiperazin (viz Obr. 1b)
- Fenylaminy – např. amfetamin (viz Obr. 1e), benzodifuran, katinon
- Tryptaminy – např. dimethyltryptamin, metyltryptamin, tryptamin (viz Obr. 1f)
- Piperidiny a příbuzné sloučeniny – např. desoxypipradol, difenylprolinol

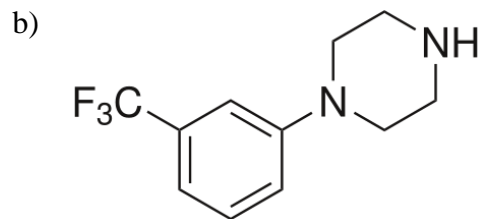
2.2 Piperaziny

Tyto nově objevující se syntetické drogy mohou být rozděleny do dvou skupin. První skupinou jsou benzylpiperaziny, kam řadíme například *N*-benzylpiperazin a jeho metylendioxidové analogy. Další skupinou jsou fenylpiperaziny, zahrnující chlorofenylpiperaziny, trifluorometylfenylpiperaziny a metoxyfenylpiperaziny [1]. Na trhu jsou zmíněné látky prodávány jako extáze nebo pod názvy jako jsou Rapture, Frenzy, Bliss, Charge, Herbal ecstasy, A2, Legal X a Legal E. K dostání jsou ve formě kapslí, tablet, ale i ve formě kapalné [1].

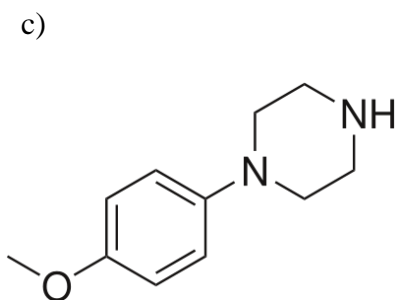
I když jsou piperaziny považovány za nově se objevující drogy, jejich první výskyt se objevil už v roce 1996 v USA. Za tu dobu si piperaziny získaly reputaci bezpečných drog, i když jsou známy případy, kdy došlo k velmi akutní intoxikaci [2]. Původní využití piperazinů byla léčba střevních parazitů ve veterinární farmakoterapii, kde se využívají dodnes [3].



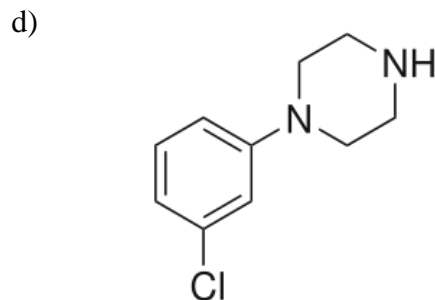
1-benzylpiperazin (BZP)



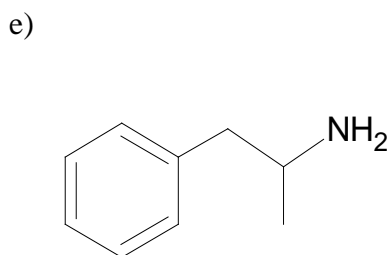
1-(3-trifluoromethylfenyl)piperazin (TFMPP)



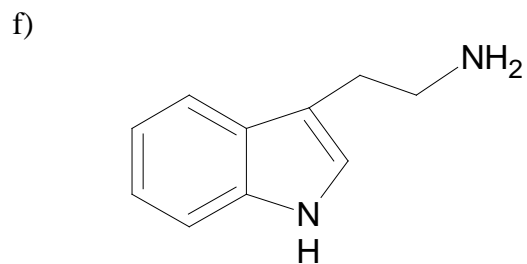
1-(4-metoxyfenyl)piperazin (MeOPP)



1-(3-chlorofenyl)piperazin (mCPP)



amfetamin



tryptamin

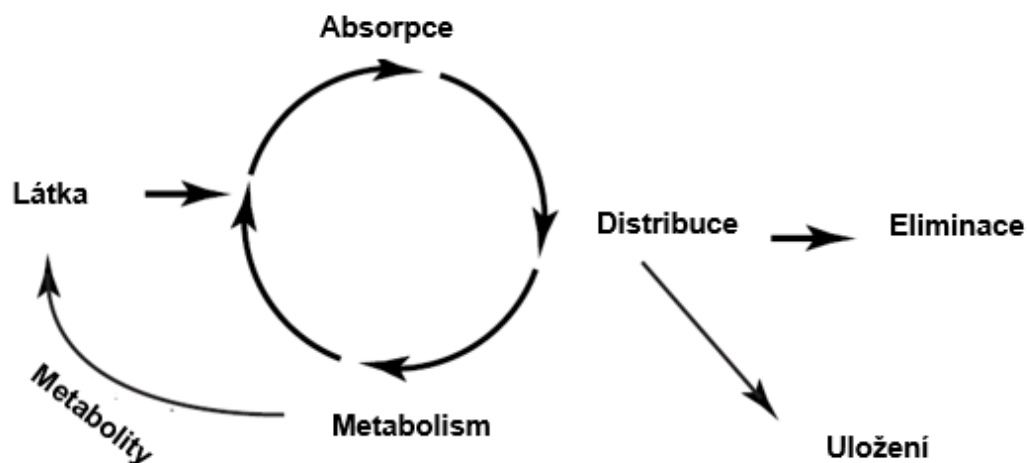
Obr. 1 Příklady vybraných chemických struktur rekreačních drog.

Účinky syntetických drog odvozených od piperazinů jsou v literatuře popisovány jako velmi podobné amfetaminům a MDMA. Uživatelé piperazinů popisují mezi hlavní účinky pocit přehnané sebedůvěry, zvýšená ostražitost, euforie a náhlý přísun energie. Nejčastější součástí prodávaných tablet je benzylpiperazin (BZP) kombinovaný s trifluoromethylfenylpiperazinem (TFMPP). Poměr BZP/TFMPP se pohybuje mezi 2:1 až 10:1 v závislosti na požadovaných účincích. Jedna tableta může obsahovat 70 – 250 mg piperazinů. Kvůli strukturální podobnosti BZP s piperidinem, který je součástí alkaloidu v pepři, se tablety někdy označují jako tzv. „herbal highs“ nebo „legal highs“. To je také jeden z mylných důvodů, proč mají piperaziny pověst bezpečných drog [4]. Klinické studie prokázaly, že mezi běžné symptomy při předávkování patří například zvracení, bolest hlavy, zmatení, pocit úzkosti, zvýšený tlak. Jsou ale také popsány případy, kdy došlo až k záchvatům nebo ztrátě vědomí [5].

Z chemického hlediska jsou piperaziny slabé báze a díky dvěma protonizovatelným dusíkům mají dvě hodnoty pK_a . Dvě vazby N-H zvyšují polaritu dané struktury a způsobují i dobrou rozpustnost ve vodě.

2.3 Metabolismus

Metabolická dráha je sled enzymových reakcí, které vedou k tvorbě určitého produktu. Meziprodukty a produkty drah jsou označovány jako metabolity. Všechny metabolické dráhy v organismu jsou regulované enzymy. Aby enzym mohl být aktivní, musí být ve spojení s dalšími molekulami – kofaktory. Kofaktorem mohou být např. kovové ionty (Zn^{2+}), a nebo organické molekuly známé jako koenzymy (NAD^+) [6].



Obr. 2 Schéma zachycující cestu látky organismem. Převzato a upraveno z [7].

Vstup syntetických drog do organismu se uskutečňuje nejčastěji perorálně. Látka se dostane přes dutinu ústní, jícen, žaludek až do střev, kde dochází k jejímu vstřebání. Některé látky ale mohou být vstřebávány už např. ze slin, sliznice jícnu nebo žaludku. Vstřebávání látky závisí na jejích fyzikálně - chemických vlastnostech, především na ionizovatelnosti a lipofilitě, a také na vlastnostech okolí (např. pH žaludečních šťáv). V případě hydrofilní, polární nebo ionizované absorbované látky, dojde k jejímu převážnému vylučování ledvinami v nezměněné formě. Lipofilní látky jsou nepolární a dobře rozpustné v tucích. To značí jejich dobrou prostupnost buněčnou membránou, a tudíž podléhají extenzivnímu metabolismu. Po absorpci látky dochází k její distribuci krevním oběhem a je buď metabolizována, nebo se dostane až do mozku, kde interaguje s receptory a vyvolává určité účinky. Jestli se tak stane, záleží na schopnosti projít přes hematoencefalickou bariéru. Hematoencefalická bariéra odděluje vnitřní prostředí mozku od cévního systému a tím reguluje transport látek mezi mozkovou tkání a krví [8].

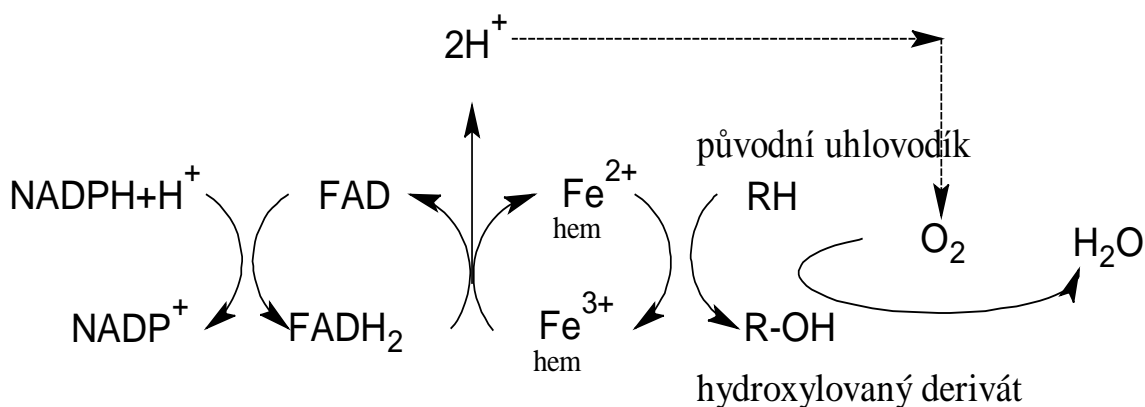
Cílem metabolismu je látku převést na polárnější formu, která je pak snáze eliminována močí z organismu. Dochází ke změně její chemické struktury vlivem metabolických drah, tento děj se nazývá biotransformace. Vzniklé metabolity vykazují odlišnou fyziologickou aktivitu a mnohdy je odstraněn jejich aktivní účinek

na organismus. Biotransformace se odehrává převážně v játrech, která jsou složená z hepatocytů. Hepatocyty obsahují velké množství enzymů, katalyzujících příslušné biotransformační reakce. Metabolity se mohou tvořit nejenom v játrech, ale i v plicích nebo ledvinách [8]. Biotransformace má tři fáze:

- 1. fáze (tzv. syntetická)
- 2. fáze (tzv. nesyntetická)
- 3. fáze

Syntetická fáze

Zahrnuje reakce, které modifikují jednu nebo více funkčních skupin. Většinou jsou zde nedisociované a lipofilní látky převedeny na látky s hydroxylovou a karboxylovou funkční skupinou. Naopak disociované a hydrofilní látky obvykle prochází organismem beze změn a poté jsou vyloučeny ledvinami do moči. Aby se v játrech mohla uskutečnit první fáze biotransformace, je potřeba přítomnost cytochromu P450. Jedná se o oxidázový systém hemových enzymů, které vykazují substrátovou specifitu k určitým typům chemických látek [8].



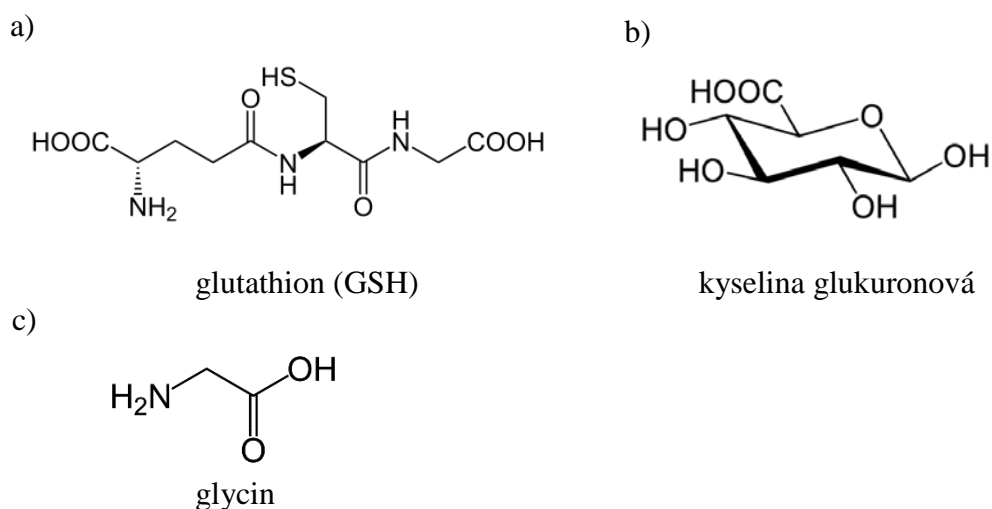
Obr. 3 Schéma obecné reakce biotransformace za účasti cytochromu P450 [9].

Nesyntetická fáze

Cílem této fáze je ukončit farmakologický účinek látky na organismus a vytvořit ve vodě rozpustnou sloučeninu, která může být poté vyloučena močí pryč z těla. Dochází zde ke konjugaci metabolitů vzniklých v první fázi s endogenními substráty za vzniku konjugátů. Endogenní substráty snižují afinitu látky k daným receptorům, tím pádem je látka obvykle neúčinná. Mezi endogenní substráty patří např. kyselina glukuronová (viz Obr. 4b), glycin (viz Obr. 4c), cystein, methionin, kyselina sírová, kyselina octová nebo glutathion (viz Obr. 4a). Aby mohly probíhat konjugační reakce, musí mít dostatek energie, která může být získána aktivací substrátu nebo reakcí s aktivovaným konjugačním činidlem, kterým může být např. 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS, viz Tab. 1¹), S-adenosyl methionin (SAM, viz Tab. 1⁴) nebo uridindifosfát-glukuronát (UDP, viz Tab. 1²) [8].

3. Fáze

Tato fáze není v organismu příliš běžná, obvykle zahrnuje další úpravu metabolitů, vzniklých v průběhu druhé fáze [8].



Obr. 4 Strukturální vzorce vybraných endogenních substrátů.

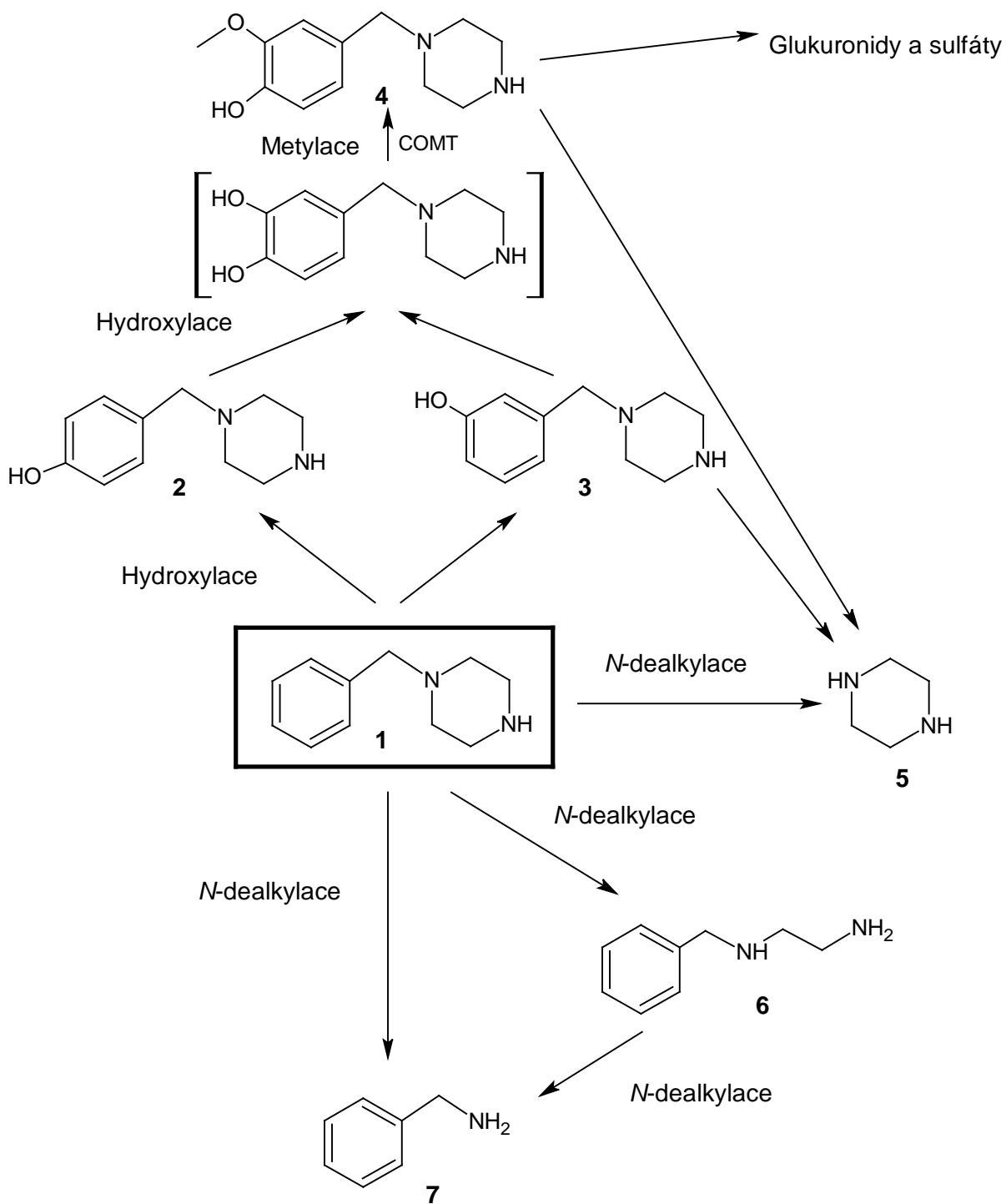
Tab. 1 Přehled konjugačních reakcí a k nim potřebných činidel. Převzato a upraveno z [8].

Konjugační reakce	Činidlo	Funkční skupina, se kterou může reagovat
Sulfatace	PAPS ¹⁾	-OH, -SH, -NH ₂
Glukuronidace	UDP-glukuronát ²⁾	-OH, -COOH, -NH ₂
Acetylace	Acetyl-CoA ³⁾	-OH, -NH ₂
Methylace	SAM ⁴⁾	-OH, -NH ₂
Glutathionace	GSH ⁵⁾	Ar-Cl, epoxidy
AMK	Glycin ⁶⁾	-COOH

2.3.1 Metabolismus piperazinových drog

V klinické a forenzní toxikologii je snaha vyvinout metody, které dokáží v moči identifikovat druh požití látky a provést následné stanovení. Výhoda analýzy moči spočívá v tom, že přítomné metabolity, kromě samotných prokazovaných látek, mohou být detekovány několik hodin až dnů po požití drogy, na rozdíl od analýzy krve, kde je tento rozsah užší. Výhodou moči je také její snadná příprava k analýze. Naopak manipulace s krví a příprava její matrice je značně složitější. I přesto má analýza krve značnou výhodu, jelikož v ní lze najít původní látky, což nám umožňuje snazší identifikaci. Na druhé straně v moči mohou přítomné látky tvořit velké pozadí, které nám může znesnadnit stanovení přítomných metabolitů a pokud není znám metabolismus hledané látky, nelze tak prokázat užití dané látky.

Piperaziny se dostávají do těla gastrointestiálním traktem, kde se velmi snadno absorbují. Následně se metabolizují v játrech, kde z nich vzniká široká škála metabolitů, což způsobuje velkou variabilitu v jejich toxicitě. Např. fenylpiperaziny jsou extenzivněji metabolizovány než benzylpiperaziny [10]. Při metabolizaci v játrech je nezbytná přítomnost enzymu CYP2D6, který katalyzuje hydroxylaci piperazinů v první fázi biotransformace [11]. Příklad předpokládaného metabolismu piperazinů, konkrétně u BZP, je uveden na Obr. 5.



Obr. 5 Předpokládaný metabolismus 1-benzylpiperazinu (BZP). 1: BZP; 2: 4-hydroxybenzylpiperazin; 3: 3-hydroxybenzylpiperazin; 4: *N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)piperazin; 5: piperazin; 6: *N*-benzylethylenediamin; 7: benzylamin. Převzato a upraveno z [1].

Studium BZP ukázalo, že metabolizace se zaměřuje na tři strukturní části: aromatický kruh, benzylová skupina a piperazinový heterocyklus. Aromatický kruh je přeměněn jednou nebo dvojitou hydroxylací (2 a 3, Obr. 3) za účasti CYP450, následovanou katechol-*O*-metyltransferasou (COMPT) katalyzující metylaci na *N*-(4-hydroxy-3-metoxybenzyl)piperazin (4, Obr. 3). Prokázán je také vznik odpovídajících glukuronidů a sulfátů. *N*-dealkylace benzylové skupiny vede k uvolnění piperazinového heterocyklu (5, Obr. 3), který je následně odbourán dvojitou *N*-dealkylací vedoucí ke vzniku *N*-benzyletylendiaminu (6, Obr. 3) nebo benzylaminu (7, Obr. 3) [12].

Farmakokinetika BZP byla studována na zdravých osobách mužského pohlaví při orálním podání 200 mg hydrochloridu BZP. Nejvyšší koncentrace v plazmě (C_{\max}) činila $262 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a tato hodnota nejvyšší koncentrace byla dosažena v čase $t_{\max}=75 \text{ min}$ po požití. Poločas eliminace ($t_{1/2}$) BZP byl 5,5 h. V plazmě byly detekovány dva hydroxylované metabolity: 4-hydroxybenzylpiperazin (4-OH BZP, viz Obr. 5, č. 2), 3-hydroxybenzylpiperazin (3-OH BZP, viz Obr. 5, č. 3). Bylo spočítáno, že 3-OH BZP dosáhl $C_{\max}=13 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ za 75 min (t_{\max}) po podání a 4-OH BZP dosáhl $C_{\max}=7 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ za 60 min (T_{\max}) po podání. Oba metabolity bylo možné detekovat v plazmě 24 h po podání [13].

Zkoumáním vzorků moči se ukázalo, že 6.0 % celkového množství BZP bylo vyloučeno v nekonjugované formě. Hlavní metabolity, 4-OH BZP a 3-OH BZP, byly přítomné ve velmi malých koncentracích (0.11 % celkového množství). Detekována byla také přítomnost dvou konjugovaných metabolitů, *O*-sulfát BZP a *N*-sulfát BZP. Z celkového množství vyloučeného BZP, pohybujícího se kolem 12,25 %, bylo spočítáno, že *O*-sulfátové a *N*-sulfátové metabolity BZP tvoří až 51 % a 30 % vyloučeného BZP [13].

2.4 Kapilární elektroforéza

Principem kapilární elektroforézy je separace nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit. Mobilita závisí na velikosti iontu a na velikosti jeho náboje. Např. menší iont se bude pohybovat rychleji než větší iont, ale iont s dvěma náboji se bude pohybovat rychleji než iont s jedním nábojem a podobnou velikostí [14].

Dnes patří kapilární elektroforéza k vysoce účinným separačním technikám, které ve spojení s dalšími detekčními technikami dovolují kvantitativní i kvalitativní analýzu. Všestrannost kapilární elektroforézy je dána jejími početnými možnostmi módů, které se liší svým separačním mechanismem. Z těchto lze jmenovat zejména micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), kapilární elektrochromatografii (CEC), kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF), kapilární izotachoforézu (CITP), kapilární gelovou elektroforézu (CGE) a nejvíce rozšířenou kapilární zónovou elektroforézu (CZE). Kapilární elektroforéza má široké spektrum uplatnění, je to metoda vhodná k separaci anorganických látek, organických a biologických materiálů (DNA, proteiny). Velkou výhodou je malá spotřeba rozpouštědel a malé objemy vzorků, ale také vysoká citlivost a účinnost [15].

2.4.1 Elektroforetická mobilita

Charakterizuje pohyb nabitě částice ve stejnosměrném elektrickém poli, jehož směr je dán znaménkem náboje částice a orientací elektrického pole. Rychlost tohoto pohybu je ovlivněna poměrem náboj/velikost a odporem prostředí. Elektroforetická mobilita, obvykle značena μ_e , určuje rychlost pohybu nabitých částic v_{ep} ve stejnosměrném elektrickém poli o intenzitě E [14]:

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1)$$

Elektroforetická mobilita (μ_e) je fyzikální konstanta, stanovená v bodě, kdy je rozpuštěná látka plně disociovaná ($\alpha_i = 1$). V praxi se ale liší od mobility stanovené experimentálně, která je nazývána efektivní mobilitou [15]:

$$\mu_{ef} = \alpha_i \cdot \mu_e$$

kde α_i je stupeň ionizace (disociace) molekuly. Z experimentálních výsledků je možné určit tzv. zdánlivou mobilitu (μ_{av}), která je vektorovým součtem elektroforetické mobility μ_{ep} a mobility μ_{eof} , vznikající v důsledku elektroosmotického toku:

$$\mu_{av} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \quad (3)$$

2.4.2 Rozlišení

Rozlišení určuje míru separace dvou analytů. Čím vyšší bude jejich hodnota rozlišení, tím víc budou tyto dvě látky od sebe separovány [15]. Pro kvantitativní analýzu je nutné, aby rozlišení bylo rovno nebo větší než 1,5:

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

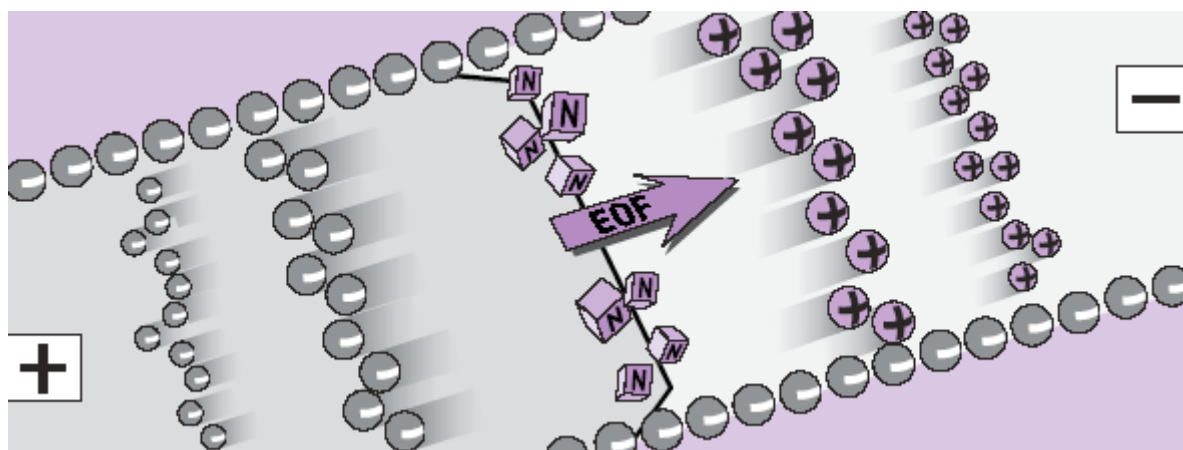
kde t_1 a t_2 jsou migrační časy látky a w_1 , w_2 jsou šířky píků u základěn.

2.4.3 Elektroosmotický tok

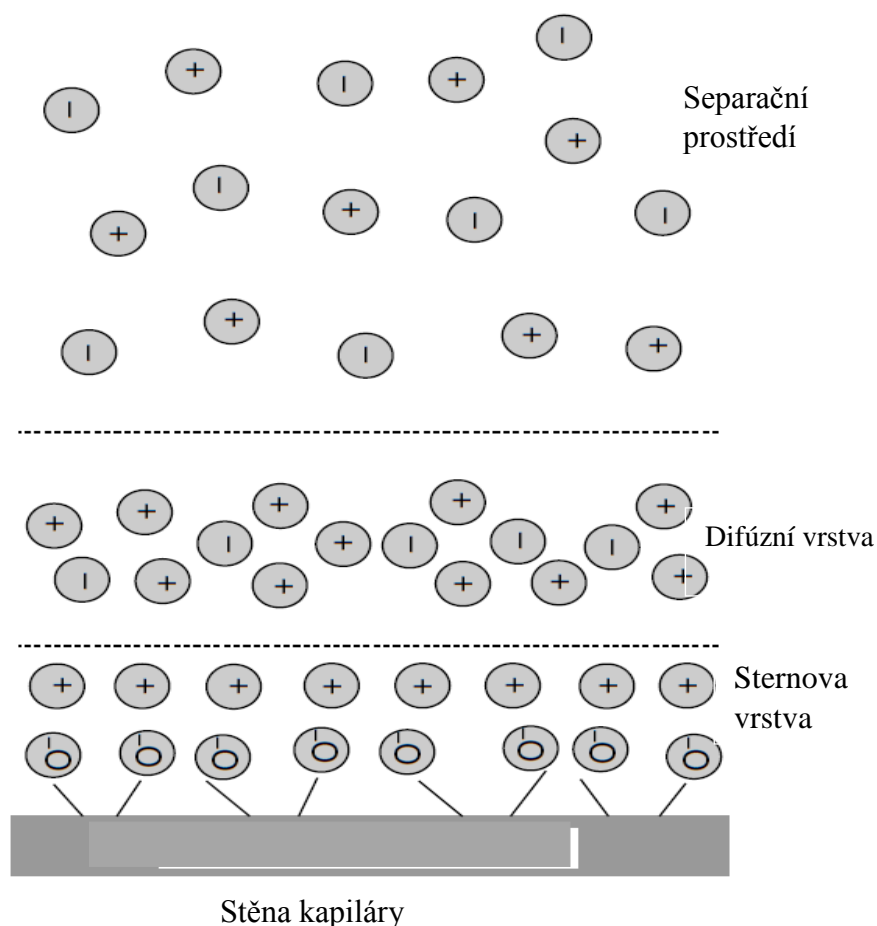
Elektroosmotický tok (EOF) je tok kapaliny v kapiláře po aplikaci stejnosměrného elektrického pole. Tento jev je důsledkem interakce elektrického pole s difúzní částí elektrické dvojvrstvy, vzniklou mezi nabitým povrchem kapiláry a elektrolytem. EOF se vyskytuje zejména u křemenných kapilár, u kterých se na vnitřní stěně nachází volné silanolové skupiny. Silanolové skupiny se při kontaktu s roztoky elektrolytů o vyšším pH disociují a na povrchu křemenné kapiláry vzniká záporný náboj (viz Obr. 6). K záporně nabitě stěně jsou přitahovány kationty z elektrolytu a vytváří se elektrická dvojvrstva (viz Obr. 7). Vzniklá dvojvrstva se skládá z nepohyblivé Sternovy vrstvy a difúzní vrstvy. Sternova vrstva vzniká

interakcí mezi nabitou stěnou kapiláry a ionty s opačným nábojem. Difúzní vrstva je výsledkem slabších interakcí, díky kterým je pohyblivá. Na rozhraní obou vrstev vzniká potenciálový rozdíl, nazývaný jako zeta potenciál (ζ). Při vložení elektrického pole se spolu s difúzní vrstvou pohybuje díky solvataci i zbylá část roztoku, čím vzniká elektroosmotický tok. Jeho pohyb směřuje k záporně nabitě elektrodě, tedy katodě. Rychlost elektroosmotického toku závisí na intenzitě elektrického pole a na velikosti náboje, který je na vnitřní stěně kapiláry. Náboj stěny výrazně ovlivňuje iontová síla a pH elektrolytu, čím vyšší je pH elektrolytu tím je záporný náboj stěny větší a elektroosmotický tok je rychlejší. EOF může být eliminován pomocí tzv. pokrývání. Permanentně pokryté kapiláry (permanent coated capillaries) mají na vnitřní povrch například kovalentně vázaný polymer, který eliminuje záporný náboj stěny a tím i elektroosmotický tok, zatím co u dynamicky pokrytých kapilár se využívá přidávání modifikátorů do pufru k alternativní deaktivaci nebo modifikaci vlastností povrchu vnitřní stěny kapiláry. Jako modifikátory se u dynamického pokrývání užívají např. poly(ethylen oxid) - PEO, poly(vinyl sulfonát) - PVS nebo poly(ethylen imin) - PEI [15].

Rychlostní profil EOF je téměř plošný, na rozdíl od toku kapaliny v HPLC, čímž se eliminuje rozmývání zón a dochází k velmi účinné separaci [15].



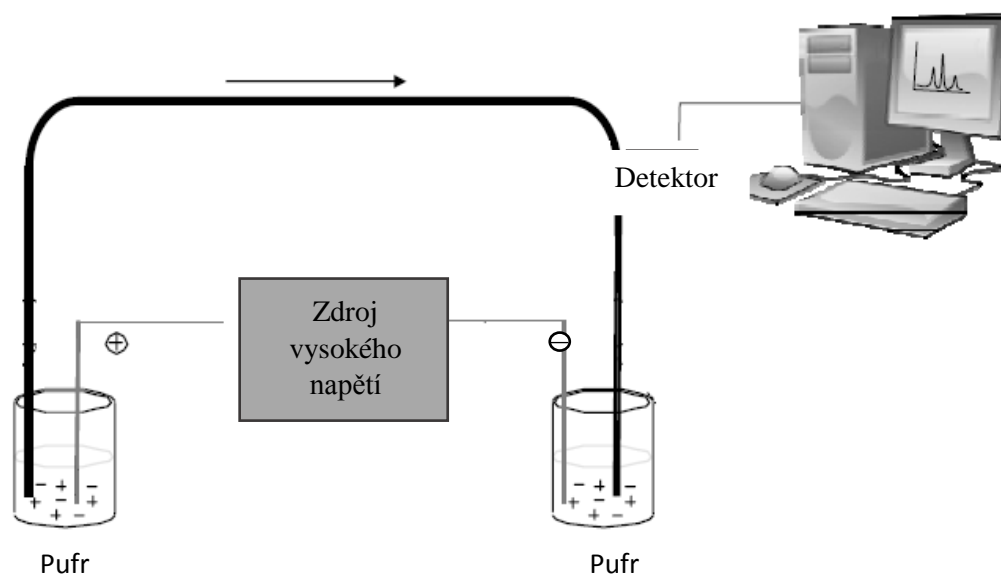
Obr. 6 Grafické znázornění separace nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli kapilární elektroforézou. Ionty jsou separovány na základě jejich hmotnosti a náboje. Neutrální molekuly jsou všechny neseny rychlostí EOF, ale nejsou od sebe navzájem separované. Převzato z [16].



Obr. 7 Grafické znázornění elektrické dvojvrstvy, skládající se z nepohyblivé Sternovy vrstvy a pohyblivé difúzní vrstvy. Převzato a upraveno z [17].

2.4.4 Instrumentace

Základní schéma kapilární elektroforézy je zobrazeno v Obr. 8. Zjednodušeně, konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníků pufrů. Obvykle rezervoáry obsahují elektrody k vytvoření elektrického spojení mezi zdrojem vysokého napětí a kapilárou. Vzorek je dávkován do kapiláry nahrazením jednoho z rezervoárů (obvykle anoda) rezervoárem se vzorkem. U konce kapiláry je umístěn detektor napojený na počítač, který zpracovává získané informace. Princip a druhy detektorů budou podrobněji diskutovány dále [17].



Obr. 8 Základní schéma kapilární elektroforézy. Převzato a upraveno z [17]

2.4.5 Kapiláry

Ideální vlastnosti materiálu pro výrobu kapilár pro elektroforézu by měly být chemická inertnost, propustnost pro UV/VIS záření, flexibilita a robustnost. Většinu těchto požadavků splňují křemenné kapiláry, které jsou ale velmi křehké a pro zlepšení jejich odolnosti a ohebnosti se potahují silnou vrstvou polyimidu. V praxi se používají nejčastěji kapiláry o vnitřním průměru v rozmezí 25 - 100 μm [15].

Důsledkem průchodu elektrického proudu kapilárou dochází k ohřevu a vzniká tzv. Jouleovo teplo. Vysoké hodnoty Jouleova tepla způsobují vznik vzduchových bublinek a změny ve viskozitě separačního pufru a to se může negativně projevit na výsledku separace. Z tohoto důvodu jsou kapiláry termostatované nebo se používají kapiláry s větším vnitřním průměrem pro účinné odvádění vznikajícího tepla [15].

2.4.6 Dávkování vzorku

Dávkování vzorků může být založeno na hydrodynamické nebo elektrokinetické injekci. Hydrodynamické dávkování může být dosaženo působením zvýšeného tlaku na rezervoár se vzorkem a to způsobí přímou injekci vzorku do kapiláry. Další možnosti jsou aplikace vakua na konec kapiláry a tím vzorek nasát nebo využít rozdílnou výšku obou rezervoárů, což způsobí nasátí vlivem změny tlaku na obou koncích [15].

Elektrokinetické dávkování je zprostředkováno ponořením konce kapiláry do rezervoáru s pufrem a druhým koncem do rezervoáru se vzorkem. Po vložení napětí dojde k migraci iontů do kapiláry [15].

2.4.7 Zdroj napětí

Separace v kapilární elektroforéze je umožněna díky vložení stejnosměrného elektrického napětí. Nejčastěji se používá napětí v rozsahu 0 - 30 kV. Při analýze je vhodné vkládat napětí postupným zvyšováním, čímž se eliminuje vznik bublinek [18].

2.4.8 Detektory

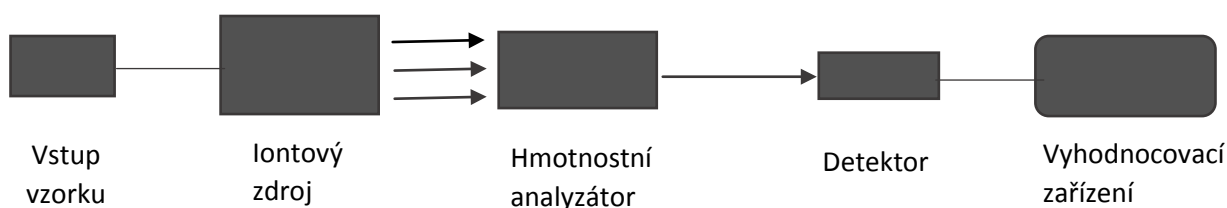
Detektory zaznamenávají separované zóny analytů a ve spojení s počítačem nám interpretují potřebná data o analýze. Detektory se vždy volí podle vlastností analyzované látky, aby byla poskytnuta co nejvyšší citlivost a co nejvíce analytických informací. Mezi nejběžnější detektory v současné době patří UV/VIS detektor a hmotnostní spektrometrie. Existují ale také elektrochemické a optické emisní detektory. Mezi emisní optické detektory patří tzv. laserem indukovaná fluorescence (LIF), která poskytuje doposud nejcitlivější detekční metodu. Nevýhodou je vysoká selektivita LIF, protože jen omezené množství analytů vykazuje nativní fluorescenci [18].

Elektrochemické detektory jsou velmi užitečné při detekci látek, které neabsorbují záření, a použití jiných detekčních technik by bylo komplikované. V praxi se můžeme setkat např. s vodivostní detekcí [18].

2.4.9 Spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CE-MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS) se stala velice populárním detektorem kapilární elektroforézy. CE-MS umožňuje separovat a detekovat látky s nízkými detekčními limity, přičemž může separované látky i identifikovat. Díky vysoké separační účinnosti kapilární elektroforézy a velmi citlivé detekci hmotnostní spektrometrie nachází CE-MS velmi široké uplatnění při analýze rozsáhlých skupin analytů nejrůznějších povah [15,18].

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která separuje a detekuje ionty na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, akcelerační komory, hmotnostního analyzátoru a detektoru [19].



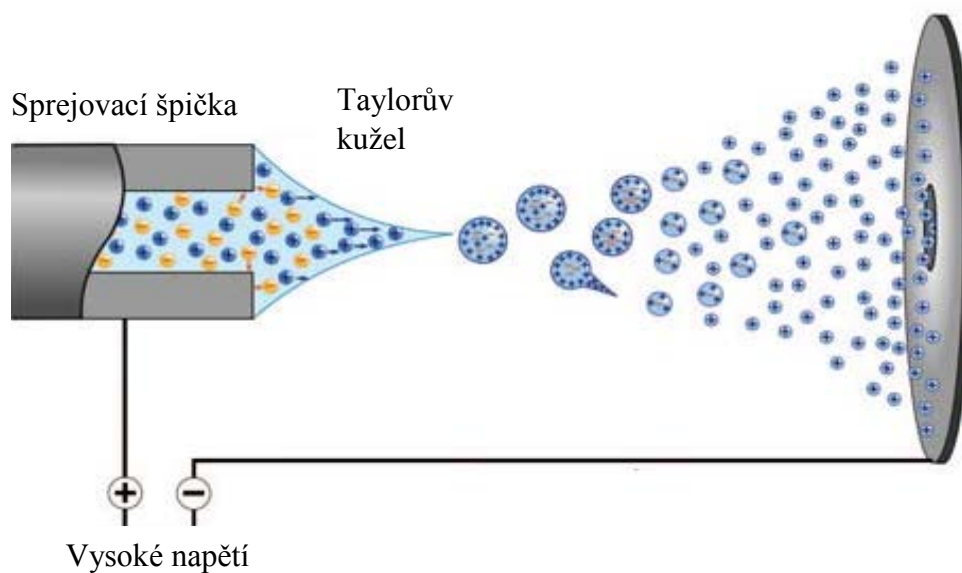
Obr. 9 Základní schéma hmotnostní spektrometrie.

2.4.10 Iontový zdroj

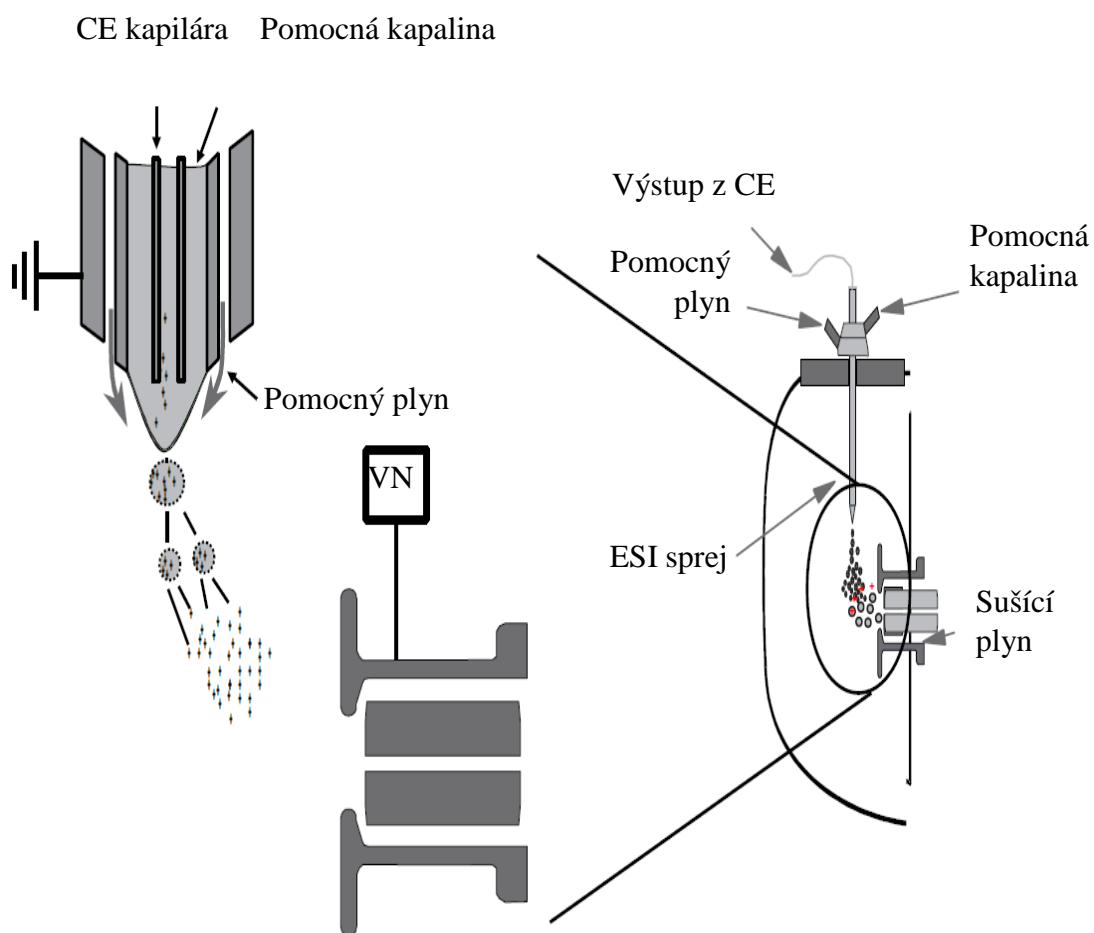
V praxi se nejvíce setkáme s elektrosprejovou ionizací (ESI), ale setkat se můžeme i s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI), ionizací elektronem (EI) nebo ionizací laserem za účasti matrice (MALDI), používanou zejména v oblasti proteomiky [18].

2.4.10.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Na kovovou sprejovací špičku je vloženo vysoké napětí a ze separovaného analytu a pomocné kapaliny se na konci sprejovací špičky tvoří nabité kapičky, které na sebe vzájemně působí elektrostatickou repulzí. Pokud hodnota repulzní síly přesáhne hodnotu povrchového napětí, dojde ke vzniku tzv. Taylorova kužele a dojde ke sprejování vzniklého nabitého aerosolu, jehož objem se zmenšuje v důsledku odpařování rozpouštědla (viz Obr. 10). V určité fázi dojde k expanzi nabitých částic a vzniknou ionty v plynné fázi, tento jev se nazývá tzv. Coulombická exploze [18].



Obr. 10 Schéma tvorby iontů v elektrospreji. Převzato z [20]



Obr. 11 Schéma ortogonálního uspořádání CE-ESI-MS. Převzato a upraveno z [21].

2.4.11 Hmotnostní analyzátor

Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou přiváděny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich separaci na základě hodnot m/z . Hmotnostních analyzátorů existuje několik typů, lišících se různými mechanismy separace iontů. Typ hmotnostního analyzátoru je volen podle potřebných parametrů analýzy a dle dostupných financí. Můžeme volit mezi magnetickým/elektrickým sektorovým analyzátozem, iontovou pastí (IT), detektorem doby letu (TOF), orbitrapem, iontovou cyklotronovou rezonancí a v neposlední řadě kvadrupólovým analyzátozem (resp. trojitým kvadrupólovým analyzátozem), který byl použit v této bakalářské práci [22].

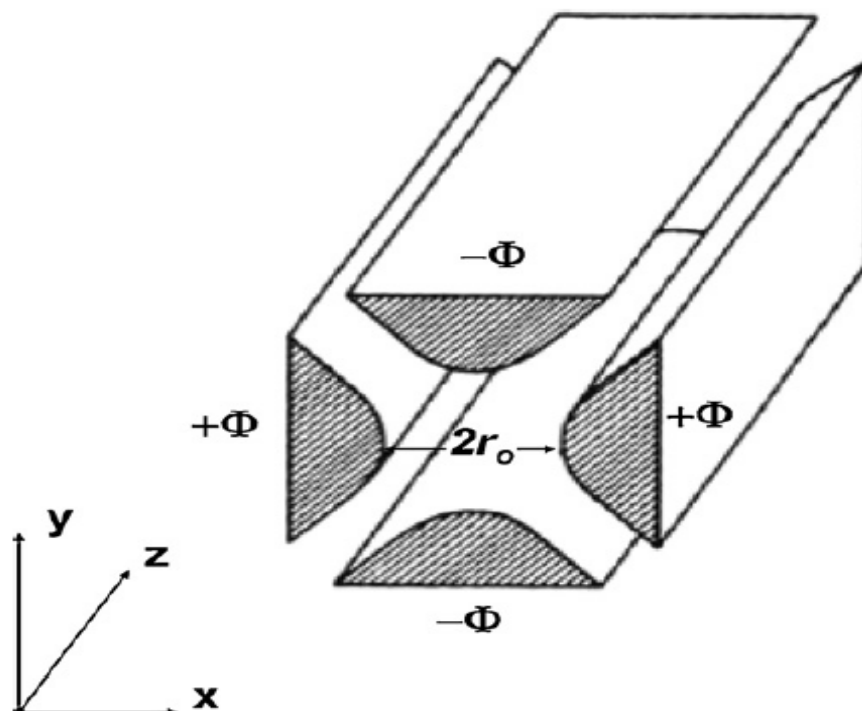
- Magnetický/elektrický sektorový analyzátor

Historicky nejstarší typ hmotnostního analyzátoru, v současné době se používá pouze pro speciální aplikace. Přesto se jedná o analyzátor s velmi vysokým rozlišením. Pracuje na principu rozdělování iontů podle m/z pomocí magnetického pole, v kterém dochází při průchodu iontů k zakřivení jejich drah [18,22].

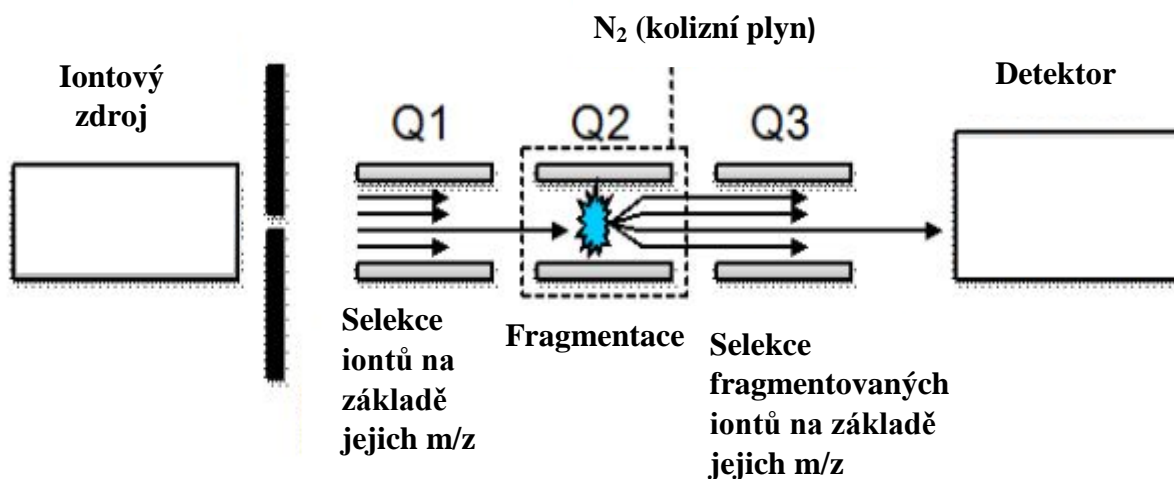
- Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor obsahuje čtyři rovnoběžné tyčové elektrody (viz Obr. 12), na které je vždy proti sobě vkládáno napětí obsahující stejnosměrnou a střídavou složku. Procházející ionty mezi tyčovými elektrodami oscilují a intenzita oscilace ovlivňuje jejich trajektorii pohybu vedoucímu k detektoru. Měněním napětí můžeme separovat ionty na základě jejich m/z . Kvadrupólový analyzátor je v praxi i přes svou nízkou rozlišovací schopnost běžně užíván, tento nedostatek kompenzuje velmi vysokou skenovací rychlostí [22]. Trojitý kvadrupólový analyzátor je složen ze tří kvadrupólů řazených za sebou. První

umožňuje selekci vybraných iontů na základě jejich m/z . Selektované ionty jsou poté vedeny do druhého kvadrupólu, který slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem a dochází zde tedy k fragmentaci selektovaných iontů. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí třetího kvadrupólu (viz Obr. 13). Velkou výhodou trojitého kvadrupólu je, že zde může docházet k opakovaným kolizním reakcím, díky kterým můžeme pozorovat více fragmentových iontů než u MS/MS měření s iontovou pastí. MS/MS je označení pro tandemovou hmotnostní spektrometrii, která slouží ke strukturální analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Tandemová hmotnostní spektrometrie má nejméně dva kroky, přičemž v prvním stupni se selektuje vybraný iont, který slouží jako prekurzor pro následnou fragmentaci v druhém kroku. Pokud chceme získat MS spektra vyšších řádů (MS^n), je nutné spojení několika analyzátorů za sebou. Teoreticky není počet tandemových analýz omezen, ale v praxi se dosahuje sedmi až osmi stupňů [18,22].



Obr. 12 Kvadrupólový analyzátor a znázorněné vložené napětí na hyperbolických elektrodách. Převzato a upraveno z [24].



Obr. 13 - Schéma trojitého kvadrupólového analyzátoru. Převzato a upraveno z [23].

- Iontová past (IT)

Iontová past pracuje podobně jako kvadrupól, má však jen tři elektrody, z nichž jedna je kruhová a zbylé dvě jsou vyklenuté do prostoru. V tomto prostoru se shromažďuje oblak iontů díky vhodnému vloženému napětí na kruhovou a dvě koncové elektrody. Postupnou změnou napětí jsou ionty podle jejich m/z vypuzovány na detektor výstupním otvorem. Do pasti se zavádí He jako tzv. tlumicí plyn, který tlumí oscilace a tím zlepšuje záchyt iontů. He se také používá jako kolizní plyn pro reakce při MS/MS experimentech. Iontová past umožňuje fragmentační analýzy (MS^n) v jednom místě (izolace iontů, fragmentace a měření produkovaných iontů). Iontová past bývá často ve spojení s kapalinovou chromatografií [19,22].

- Analyzátor doby letu (TOF)

TOF pracuje na principu dělení iontů podle jejich rozdílných dob letů, potřebných pro překonání určité dráhy. Ionty jsou urychleny napěťovým pulsem do letové trubice, kde letí rozdílnou rychlostí v závislosti na jejich hodnotě m/z . Ionty poté dopadají na detektor v různém čase. Jako první na detektor dopadají ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii. V praxi bývá nejčastěji používán ve spojení s pulzními technikami (např. MALDI) [19,22].

- Orbitrap

Jedná se o nejnovější typ hmotnostního analyzátoru. Skládá se z vnější a středové vřetenové elektrody, na které se vkládá napětí. Ionty z iontového zdroje vstupují do elektrického pole, kde se pohybují v drahách (orbitech) kolem centrální elektrody. Dojde k vytvoření rotujícího prstence iontů. Frekvence jsou stanoveny pomocí Fourierovy transformace a převedeny na hmotnostní spektrum. Orbitrap se využívá zejména při strukturní analýze [19,22].

- Iontová cyklotronová rezonance (ICR)

ICR je založena na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli ICR cely. Když se ionty, vzniklé v iontovém zdroji, dostanou do silného magnetického pole, začnou se pohybovat po cykloidálních trajektoriích s určitou cyklotronovou frekvencí, která je nepřímo úměrná hodnotě m/z . Aplikací pulzu excitačního napětí dochází k selektivní excitaci iontů o dané m/z . Detekce je založena na měření vzniklého střídavého proudu ionty na detekčních deskách. ICR je metoda významná díky svojí vysoké přesnosti a tím, že nedochází k destrukci iontů v detektoru, je možnost použití při fragmentačních analýzách [18,22].

2.4.12 Spojení CE-MS v toxikologické analýze

Kapilární elektroforéza patří k vysoce účinným separačním technikám, která ve spojení s hmotnostní spektrometrií dovoluje kvantitativní i kvalitativní analýzu. Všestrannost kapilární elektroforézy, dána jejími početnými možnostmi módů, je vhodná pro aplikaci v rychle se rozvíjející toxikologii. V toxikologii se především cení díky její vysoké citlivosti při separaci, identifikaci a charakterizaci široké škály molekul, především léčiv a drog. Vhodnost CE-MS pro tyto aplikace je dána také univerzálností a selektivností detektoru, který poskytuje velmi dobrou citlivost. Oproti kapalinové chromatografii, kde může být někdy použito pro látky iontového charakteru problematické, má kapilární elektroforéza široké spektrum uplatnění při separaci značně rozdílných látek. Její výhodou je také malá spotřeba rozpouštědel, malé objemy vzorků, vysoká citlivost a účinnost [15,17].

Spojení CE-MS bylo poprvé představeno v roce 1988 a i když je kapilární elektroforéza poměrně mladou záležitostí, objevuje se v současnosti mnoho odborných publikací zaměřující se na tuto metodu [17].

Spojení CE-ESI-MS obnáší také určitá omezení. Mezi nejdůležitější patří užívání těkavých pufřů např. acetátových. Těkavé pufry podporují proces ionizace elektrosprejem, jenž poskytuje ionty v plynné fázi pro hmotnostní analyzátor. Spojení mezi CE a MS je uskutečněno pomocí duté trubice připojené k jednomu konci zásobníku s pufrem. Z tohoto důvodu by měla být hladina pufru v zásobníku stejně vysoká jako je špička kapilár, abychom se vyhnuli zpětnému nasávání kapaliny.

Optimální rychlost toku kapaliny pro ionizaci elektrosprejem se pohybuje v řádech $\mu\text{L}/\text{min}$.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

Amoniak (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Hydroxid sodný (Merck, Darmstadt, Německo)

Isopropanol (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Kyselina mravenčí (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Kyselina octová (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Methanol v čistotě pro LC-MS (Merck, Darmstadt, Německo)

(*R*)-2-benzylpiperazin (BZP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1-(3-chlorofenyl)piperazin (mCPP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1-(4-chlorofenyl)piperazin (pCPP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1,4-dibenzylpiperazin (DBP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1-(2,3-difluorobenzyl)piperazin (DFBP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1-(3-methylbenzyl)piperazin (MBP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1-[4-(trifluoromethyl)benzyl]piperazin (TFMBP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

1-(3-trifluoromethylfenyl)piperazin (TFMPP) (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

3.1.2 Materiál

Křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 µm (MicroSolv Technology Eatontown, NJ, USA)

Mikropipety Eppendorf Research PLUS s nastavitelným objemem v rozsahu 20 - 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Mikrozkumavky, plastové – PP; objem 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Vialky skleněné, objem 2 ml (Aqilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)

Vialky zaklapávací, čirá; objem 10 ml (Merci, Praha, Česká republika)

SPE kolona Supel – Select SCX 30 mg (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Stojan na mikrozkumavky , plastový – PP; 80 míst (Merci, Praha, Česká republika)

Zkumavka PS sterilní se zátkou a kulatým dnem (Merci, Praha, Česká republika)

3.1.3 Přístrojové vybavení

pH metr inoLab_IDS Multi 9310P (WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Německo)

Analytické váhy MS (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)

Vakuový extraktor Supelco VISIPREP™ (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)

Centrifuga MR23i (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Třepačka MS 3 basic (IKA, Staufen, Německo)

Kapilární elektroforéza Agilent 7110 (Waldbronn, Německo)

ESI-MS kvadrupólový detektor Agilent G6130 (Waldbronn, Německo)

Hmotnostní detektor QqQ Agilent MSD 6460 (Waldbronn, Německo)

LC isokratická pumpa Agilent 1200 a 1260 s děličem toku v poměru 1:100 (Waldbronn, Německo)

Software Agilent ChemStation, Agilent MassHunter, Microsoft Excel 2010

3.2 Metody

3.2.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

Pro optimalizaci SPE byly použity komerčně dostupné SPE katexové kolony Supel - Select SCX 30 mg (Sigma - Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

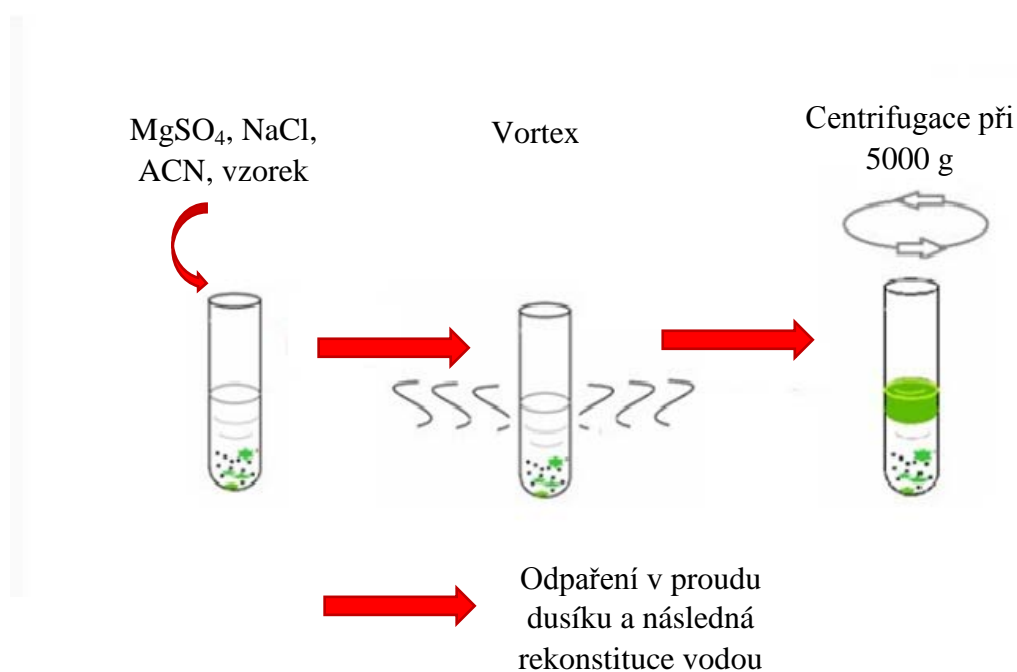
Jednotlivé kroky SPE jsou uvedeny v Tab. 2. Optimalizovaná SPE metoda byla nejprve aplikována na naspikovaném vzorku vody (1 ml), obsahující $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ standardů jednotlivých piperazinů. Obdobně byla tato metoda také aplikována na naspikovaný vzorek moči (1 ml) o koncentraci $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ jednotlivých piperazinů.

Tab. 2 Kroky SPE při purifikaci a zakoncentrování piperazinových drog pomocí katexových SPE kolonek.

-
1. Kondicionace 1 ml 1% kyseliny mravenčí v MeOH, poté 1 ml deionizované vody
 2. Přidání 1 ml vzorku
 3. Promytí 1 ml deionizované vody, 1 ml 1% kyseliny mravenčí v MeOH, poté opět 1 ml vody
 4. Eluce postupně 2x 1 ml roztoku (5 ml 2M amoniaku v MeOH + 45 ml MeOH)
 5. Odpaření proudem dusíku
 6. Rekonstituce ve 100 μl deionizované vody na teoretickou koncentraci 5 mg.l^{-1}
-

3.2.2 Purifikace a zakoncentrování metodou QuEChERS

Tato metoda byla převzata a upravena z literatury [25]. Nejprve se navázilo a smísilo 600 mg MgSO_4 s 300 mg NaCl . Promíchaná směs se vložila do centrifugační zkumavky, do které se přidal 1 ml acetonitrilu a 500 μl naspikovaného vzorku o koncentraci $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ standardů jednotlivých piperazinů. Po smíchání všech složek byla centrifugační zkumavka vortexována po dobu 10 s a následně zcentrifugována 5 min při 5000 g. Poté se odebrala vrchní acetonitrilová fáze, která se odpařila pod proudem dusíku. Odparek se nakonec rekonstituoval ve 100 μl deionizované vody. Zjednodušené schéma extrakce je uvedeno na obr. 14.



Obr. 14 Schéma postupu pro purifikaci a zakoncentrování piperazinů metodou QuEChERS.

3.2.3 Fragmentace pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (QqQ) a optimalizace kolizní energie

Před optimalizací CE-ESI-MS pro separaci vybraných piperazinů byly fragmentačními reakcemi zjištěny kolizní spektra jednotlivých piperazinů. Pro každý piperazin byly v product ion módu měřeny kolizní spektra při kolizních energiích od 0 do 45 eV (vždy s nárůstem po 5 eV). U každého piperazinu byly vybrány dva fragmenty s největší intenzitou - jeden pro kvantifikaci a druhý pro potřeby identifikace. Přehled vybraných fragmentů je uveden v tabulce č. 3. Výjimkou je MBP, u kterého kolizní spektra ukázala pouze jediný intenzivní fragment. Tyto přechody byly využity při měření v MRM módu.

Tab. 3 Výčet fragmentů s největší intenzitou u jednotlivých piperazinů (fragmenty použité pro kvantifikaci jsou znázorněny podtrženě)

Analyt	Prekursorový iont	Fragmenty s největší intenzitou
BZP	177,25	<u>134</u>
		117
MBP	191	<u>105</u>
mCPP	198	<u>155</u>
		119
DFBP	213,4	<u>127</u>
		85
TFMPP	231	<u>188</u>
		119
TFMBP	245,25	<u>159</u>
		85
DBP	267,38	<u>175</u>
		91

3.2.4 Metoda pro separaci vybraných piperazinových drog pomocí CE-ESI-MS

Vzorek byl připraven z roztoků standardů jednotlivých piperazinů. Byla připravena směs všech studovaných látek o koncentraci 1 mg.ml^{-1} ve vodě a pro další použití byly vzorky připraveny metodou postupného ředění. Pro separaci piperazinů byla použita nepokrytá kapilára o celkové délce 64.5 cm a vnitřním průměru 50 μm . Separáční napětí bylo +15 kV a pracovním elektrolytem (BGE) byl 50 mM acetát amonný o pH 4.5. Dávkování bylo prováděno hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Podmínky MS detekce: SIM mód, sprejovací napětí + 3.5 kV, pomocn kapalina methanol:voda:kyselina mravenčí (50/49.5/0.5; v/v/v) o průtoku 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, nebulizační plyn (N_2) o tlaku 5 psi a průtoku 10 l.min^{-1} . Teplota plynu 200 $^\circ\text{C}$.

3.3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.3.1 Extrakce tuhou fází

Pro stanovení návratnosti (recovery) jednokrokové purifikace s následným zakoncentrováním piperazinových drog byly použity komerčně dostupné SPE kolonky Supel – Select SCX 30 mg (Sigma - Aldrich Corp., USA). Objem vzorku pro SPE extrakci byl 1 ml o koncentraci 0,5 mg.l⁻¹ jednotlivých piperazinů. Návratnosti byly v případě vzorků ve vodě ve většině případů vyšší než 90 %, oproti tomu byly návratnosti spikovaných vzorků moči o něco nižší a to z důvodu vlivu matrice na extrakci (viz Tab. 4). I přes tento vliv byly všechny návratnosti s použitím vyvinuté metody SPE uspokojivé.

Tab. 4 Návratnost SPE: spikovaná voda a spikovaná moč

Analyt	Návratnost voda (%)	Návratnost moč (%)
BZP	89,7	90,9
MBP	99,8	96,2
mCPP	97,6	91,0
DFBP	93,1	91,9
TFMPP	98,6	96,9
TFMBP	92,7	87,9
DBP	97,9	95,3

3.3.2 Purifikace a zakoncentrování metodou QuEChERS

Pro stanovení návratnosti purifikační metody QuEChERS bylo do centrifugačních zkumavek nanášeno 500 μl vzorku o koncentraci $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ jednotlivých piperazinů.

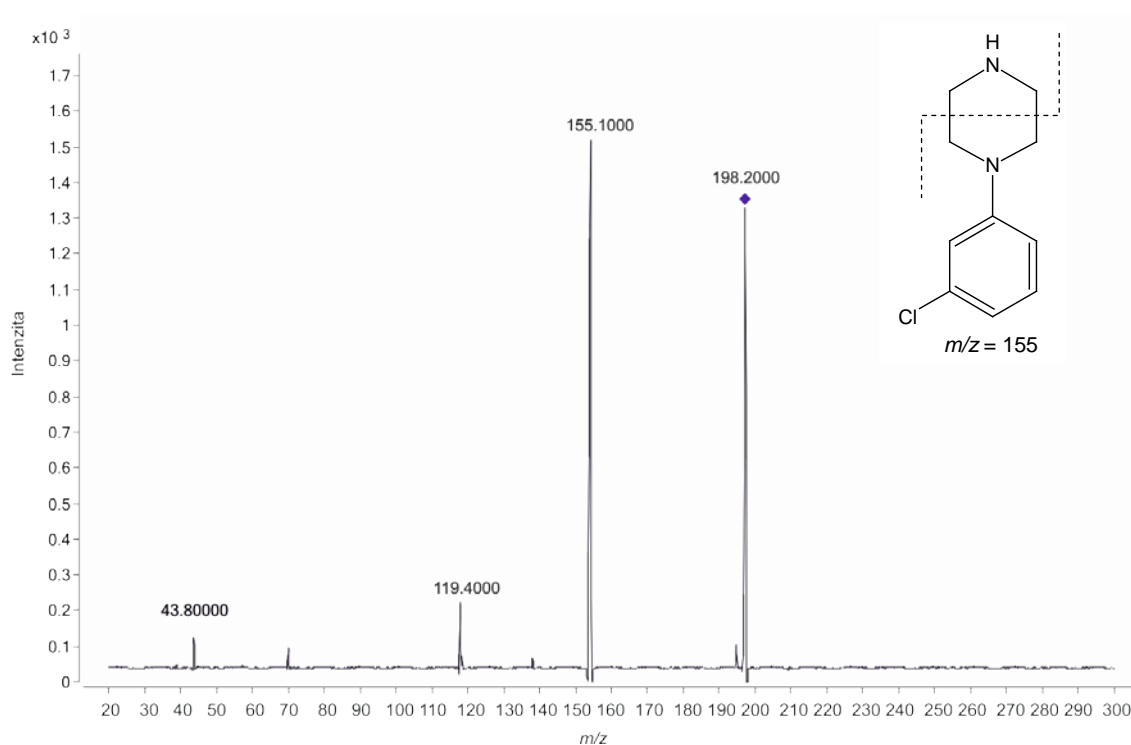
Tab. 5 Návratnost metody QuEChERS

Analyt	Návratnost (%)
BZP	7,38
MBP	15,32
mCPP	13,19
DFBP	17,31
TFMPP	13,67
TFMBP	16,5
DBP	16,48

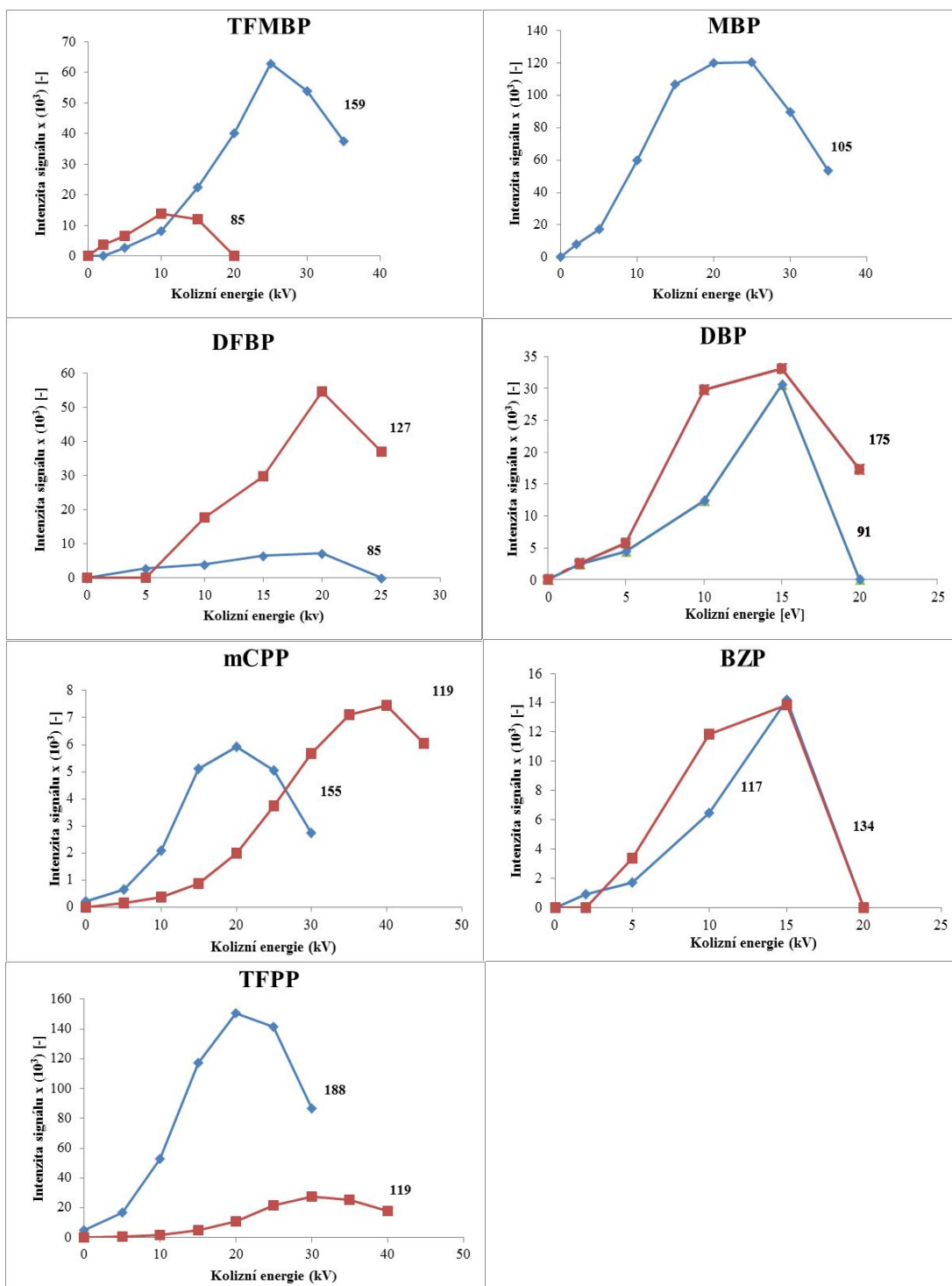
Výtěžnosti metody QuEChERS vyšly v průměru až 5x méně než je tomu u metody SPE. Výhoda metody QuEChER ale spočívá v její experimentální nenáročnosti a s tím i spojenou znatelnou úsporou času, která je zhruba trojnásobná v porovnání s metodou SPE. Další výhodou je také nízká cena potřebných chemikálií (MgSO_4 , NaCl) a malá spotřeba rozpouštědel. Důležité je také zmínit její univerzálnost pro purifikaci a zakoncentrování drog zásaditého charakteru viz [25], kde autoři touto metodou dosáhli přijatelných výtěžností, pohybujících se okolo 60 %. Z uvedeného je patrný potenciál této extrakční metody především pro rychlou identifikaci, ale při její další optimalizaci i pro kvantifikace piperazinových drog.

3.3.3 Fragmentace pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (QqQ) a optimalizace kolizní energie

Pro každou studovanou látku bylo fragmentačními reakcemi stanoveno kolizní spektrum, měřené při kolizní energii 0 - 45 eV. Z každého kolizního spektra byly vybrány dva nejintenzivnější fragmenty (viz Tab. 3). Byl zkoumán vliv kolizní energie na intenzitu signálu s ohledem na vznik a četnost jednotlivých fragmentů piperazinových drog.



Obr. 15 Fragmentační spektrum mCPP při 40 eV.

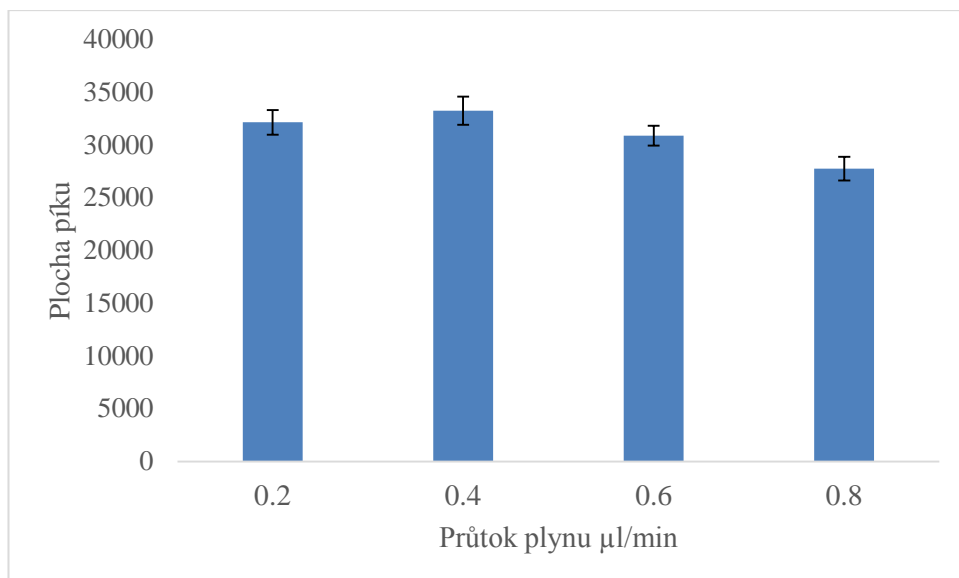


Obr. 16 Závislost intenzity signálu na kolizní energii pro jednotlivé fragmenty.

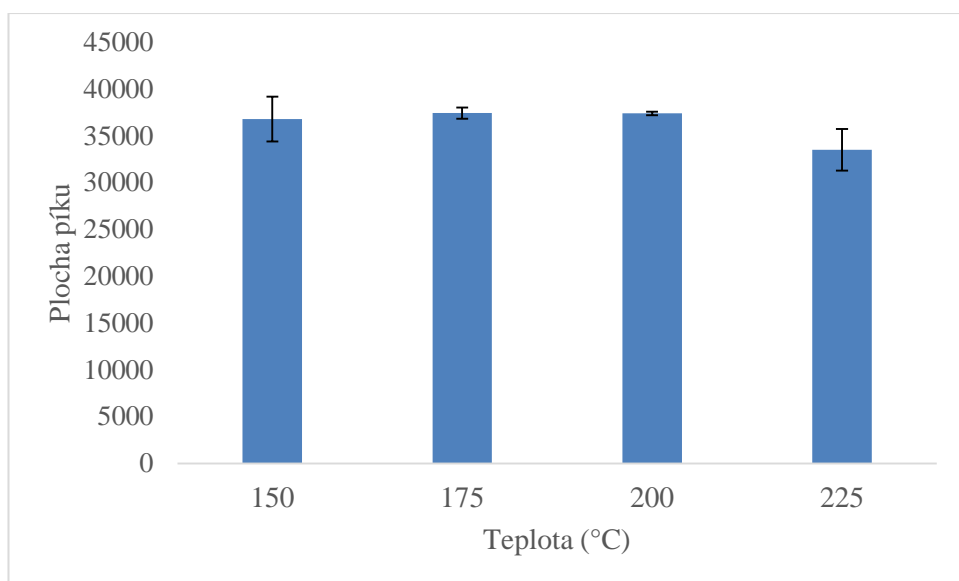
Optimalizované kolizní energie byly použity pro MRM měření. Z výsledků jsou zřejmé rozdíly v optimálních kolizních energiích, které dosáhly až 40 eV. U každého piperazinu byly z kolizního spektra vybrány dva nejintenzivnější fragmenty (nejintenzivnější pro kvantifikaci a druhý nejintenzivnější pro potvrzení identity). Pouze jediný fragment byl vybrán u MBP, kde v kolizním spektru nebyl nalezen žádný jiný výrazně intenzivní fragment.

3.3.4 Metoda pro separaci vybraných piperazinových drog pomocí CE-ESI-MS

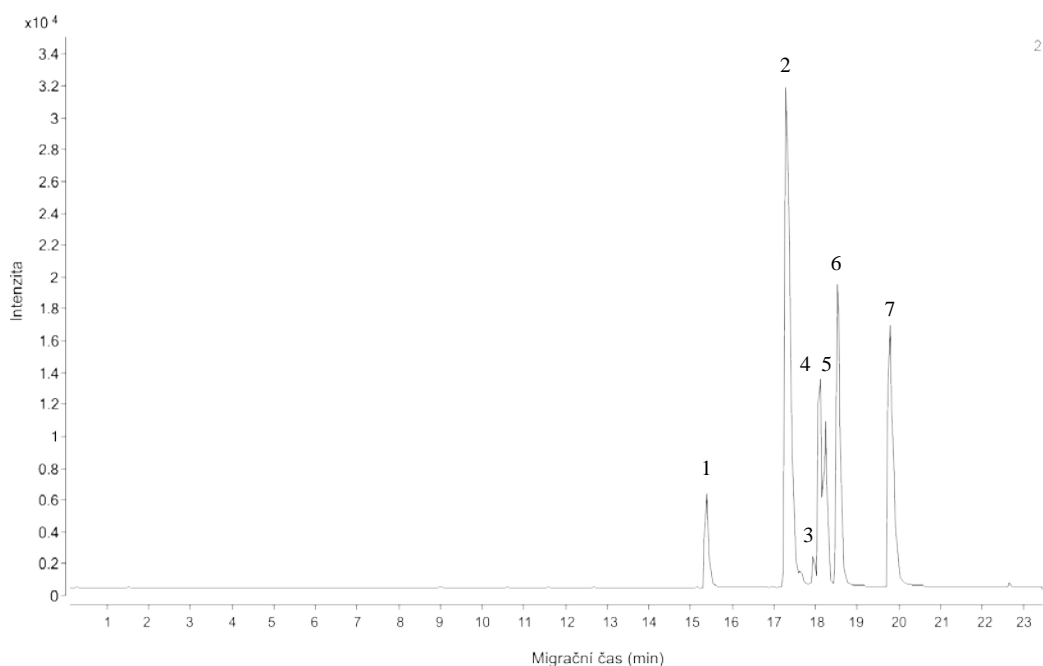
Podmínky byly nejprve optimalizovány na nepokryté kapiláře o efektivní délce 64,5 cm. Nedostatečná velikost této kapiláry nevedla k dostatečné separaci všech analyzovaných piperazinů, tudíž se přikročilo k použití nepokryté kapiláry o efektivní délce 90 cm. Zkoumána byla také pokrytá kapilára o zvolené efektivní délce 90 cm, ale v tomto případě pokrytí nevedlo k dostatečné separaci. Jako pufr se nejvíce osvědčil 50 mM acetát amonný o pH 4,5 s 5% přídavkem isopropanolu. Pomocná kapalina obsahovala methanol, vodu a kyselinu mravenčí (50/49,5/0,5; v/v/v). Její optimální průtok byl zkoumán v rozmezí 0,2 - 0,8 $\mu\text{l}/\text{min}$, vždy po zvyšující se hodnotě o 0,2 (viz Obr. 16), kde největší plochu píku poskytl průtok 0,4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Dále byl studován vliv teploty vyhřívání kapiláry na ploše píku, při teplotách 150, 175, 200, 225 °C. Nejvíce vyhovující teplotou se ukázala být teplota vyhřívání kapiláry 200 °C. Optimalizované podmínky byly poté aplikovány při analýze v TIC módu (tzv. sken celkového iontového proudu, viz Obr 18) a v MRM módu (viz Obr 19).



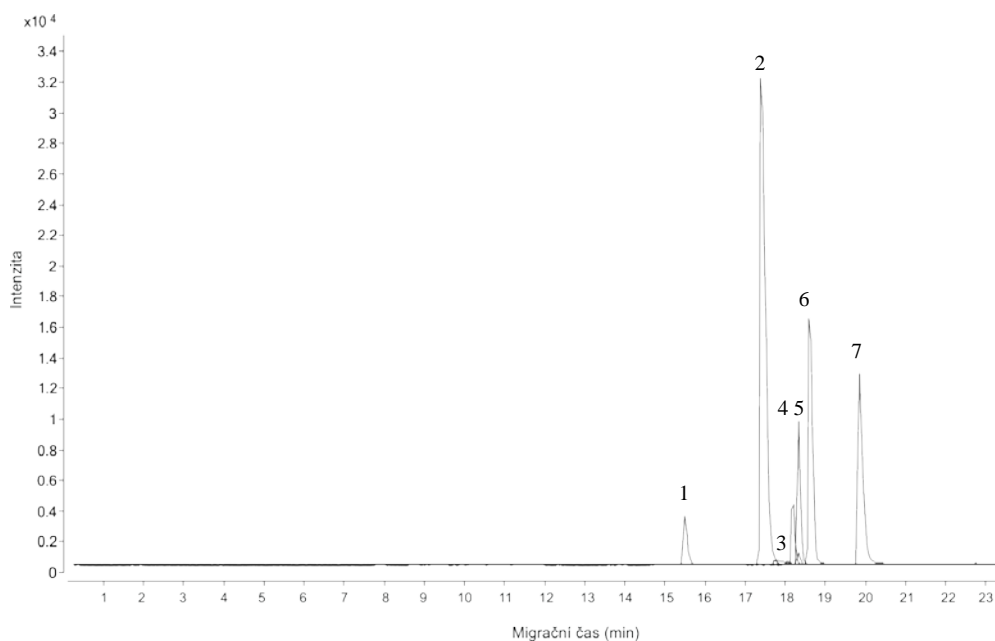
Obr. 17 Závislost průtoku pomocné kapaliny na ploše píku (pro BZP). Podmínky separace: nepokrytá kapilára 90 cm efektivní délka, 50 μm i.d., separační napětí +15 kV, pufr: 50 mM acetát amonný pH 4.5 + 5 % iPr-OH. Dávkování hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Podmínky MS detekce: TIC mód, sprejovací napětí + 3.5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:kys. mravenčí (50/49.5/0.5; v/v/v), nebulizační plyn (N_2) o tlaku 5 psi a průtoku 10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota plynu 200 $^{\circ}\text{C}$.



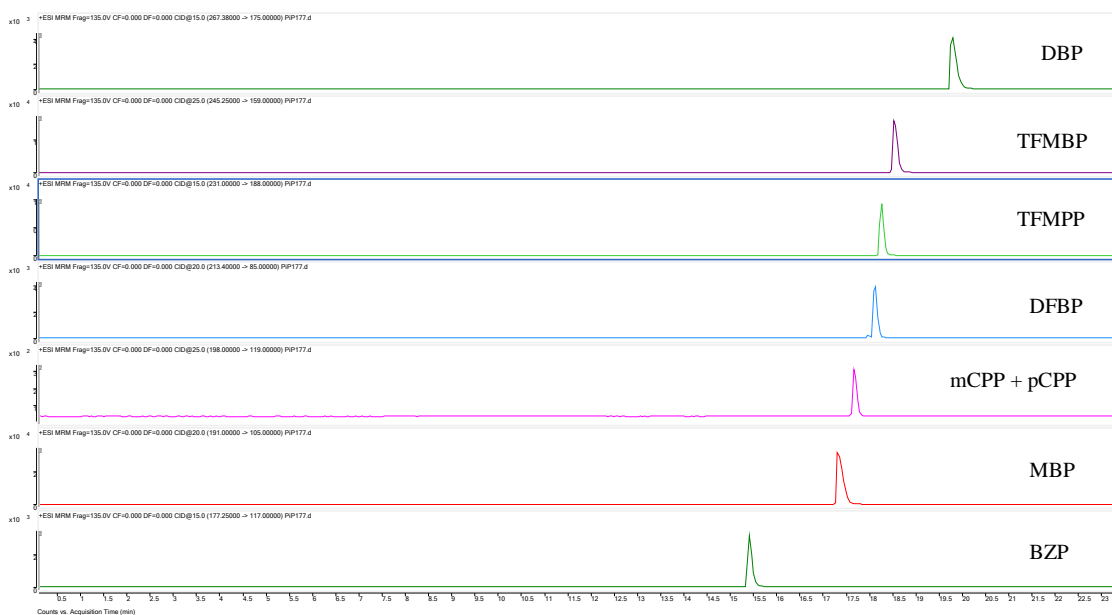
Obr. 18 Vliv teploty vyhřívání kapiláry na ploše píku (pro BZP). Podmínky separace: nepokrytá kapilára 90 cm efektivní délka, 50 μm i.d., separační napětí +15 kV, pufr: 50 mM acetát amonný pH 4.5 + 5 % iPr-OH. Dávkování hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Podmínky MS detekce: TIC mód, sprejovací napětí + 3.5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:kys. mravenčí (50/49.5/0.5; v/v/v) o průtoku 4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizační plyn (N_2) o tlaku 5 psi a průtoku 10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota plynu 200 $^{\circ}\text{C}$.



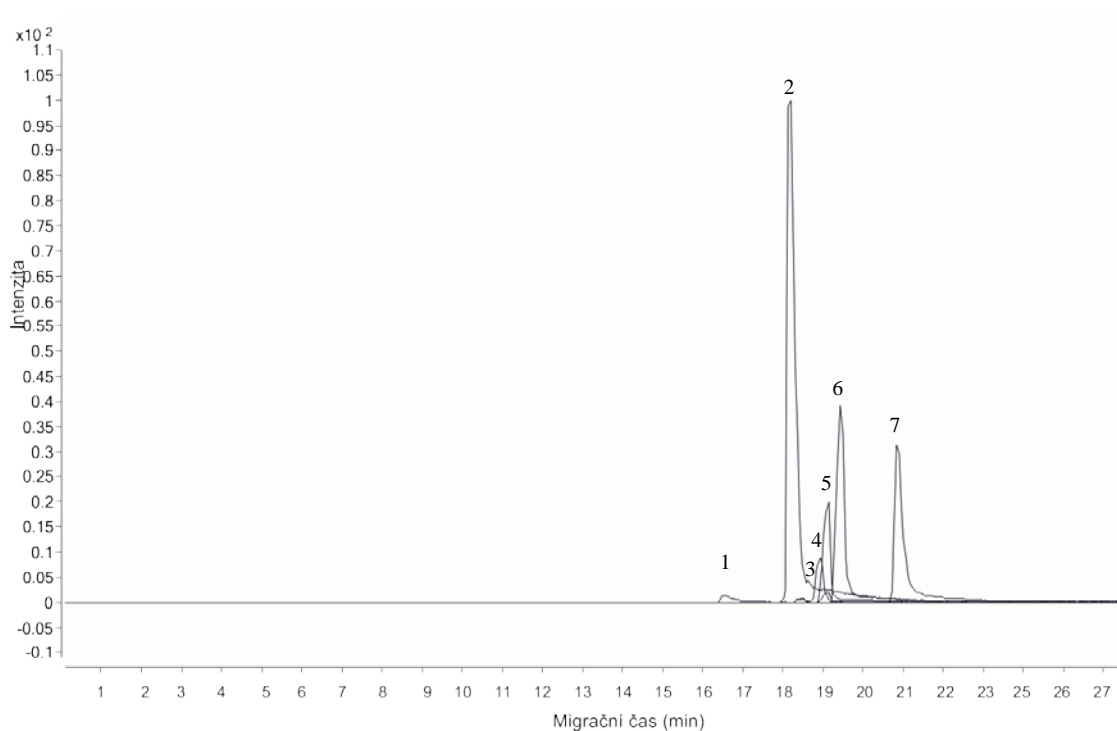
Obr. 19 TIC elektroferogram separovaných piperazinů: 1 - BZP, 2 - MBP, 3 – mCPP a pCPP, 4 - DFBP, 5 - TFMPP, 6 - TFMBP, 7 - DBP. Podmínky separace: nepokrytá kapilára 90 cm efektivní délka, 50 μm i.d., separační napětí +15 kV, pufr: 50 mM acetát amonný pH 4.5 + 5 % iPr-OH. Dávkování hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Podmínky MS detekce: TIC mód, sprejovací napětí + 3.5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:kys. mravenčí (50/49.5/0.5; v/v/v) o průtoku 4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizační plyn (N_2) o tlaku 5 psi a průtoku 10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota plynu 200 $^{\circ}\text{C}$.



Obr. 20 MRM elektroferogram separovaných piperazinů, bez překrývajících se nebo málo intenzivních přechodů: 1 - BZP, 2 - MBP, 3 – mCPP a pCPP, 4 - DFBP, 5 - TFMPP, 6 - TFMBP, 7 - DBP. Podmínky separace: nepokrytá kapilára 90 cm efektivní délka, 50 μm i.d., separační napětí +15 kV, pufr: 50 mM acetát amonný pH 4.5 + 5 % iPr-OH. Dávkování hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Podmínky MS detekce: TIC mód, sprejovací napětí + 3.5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:kys. mravenčí (50/49.5/0.5; v/v/v) o průtoku 4 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizační plyn (N_2) o tlaku 5 psi a průtoku 10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota plynu 200 $^{\circ}\text{C}$.



Obr. 21 MRM elektroferogram separovaných piperazinů – detailní náhled pro MRM jednotlivých piperazinových drog. Podmínky viz předchozí elektroferogramy.



Obr. 22 MRM elektroferogram separovaných piperazinů – analýza spikované moči (každý z analytů o koncentraci 5 mg.l^{-1}) po SPE extrakci (podrobněji popsána v textu). Podmínky separace jsou shodné jako v případě předchozích elektroferogramů.

Elektroferogramy (viz Obr. 18 - 20) ukazují úspěšnou separaci vybraných piperazinů s výjimkou izomerů mCPP a pCPP. Na Obr. 22 je ukázána aplikace vyvinuté metody na spikovaný vzorek moči na koncentrační hladinu $0.5 \text{ } 5 \text{ mg.l}^{-1}$ každého analytu. Vzorek moči byl extrahován a purifikován pomocí SPE metody která je popsána výše a poté ihned analyzován vyvinutou metodou.

Zmíněné dva izomery se nepodařilo za daných podmínek separovat. Separace by byla možná s použitím cyklodextrinů viz [26], jenž umožňují separovat izomery na základě rozdílné interakce s molekulami selektoru. Cyklodextriny jsou však jako aditiva pro CE-MS komplikací vzhledem k nutnosti použití těkavých složek pufru a aditiv. Tento fakt výrazně limituje jejich využití, avšak lze je implementovat do separačního systému za pomocí tzv. metody částečného plnění (tzv. PF, partial filling method). Pro experimentální náročnost však tento typ separace nebyl v této práci studován.

4. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá purifikací a zakoncentrováním piperazinových drog ve vzorcích moči a jejich následnou identifikací a kvantifikací pomocí vyvinuté metody CE-ESI-MS/MS. Podařilo se vyvinout spolehlivou purifikační metodu s vysokou návratností - SPE. Jako alternativa ke klasické SPE purifikaci se také podařilo optimalizovat rychlou a jak cenově, tak i časově nenáročnou metodu pro identifikaci piperazinových drog, potencionálně i jiných drog s bazickým charakterem – tzv. QuEChERS. Optimalizovaná metoda bohužel není vhodná pro separaci polohových izomerů piperazinových drog, což však její využitelnost v praxi nijak nesnižuje.

Optimalizované podmínky měření jsou následující: nepokrytá kapilára o délce 90 cm a průměru 50 μm , separační napětí +15 kV, pufr: 50 mM acetát amonný pH 4.5 + 5 % *iPr*-OH. Dávkování hydrodynamicky 50 mbar/5 s. Podmínky MS detekce: TIC mód, sprejovací napětí + 3.5 kV, pomocná kapalina methanol:voda:kys. mravenčí (50/49.5/0.5; v/v/v) o průtoku 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, nebulizační plyn (N_2) o tlaku 5 psi a průtoku 10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota plynu 200 $^\circ\text{C}$.

Uvedené výsledky poukazují na značný potenciál optimalizované metody pro analýzu piperazinových drog v reálných vzorcích moči. Také je patrná konkurence schopnost této metody vůči spojením LC-MS [27] a GC-MS [28] z hlediska dosažených návratností a délky analýzy. Práce byla rovněž přijata k prezentaci formou posteru na prestižní mezinárodní konferenci The 38th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC 2014) v Itálii (viz abstrakt – příloha č. 1).

5. LITERATURA

1. Arbo M.D., Bastos M.L., Carmo H.F. (2011): Piperazine compounds as drugs of abuse. *Drug and Alcohol Dependence* **122**, 174-185.
2. Austin H., Monasterio E. (2004): Acute psychosis following ingestion of 'Rapture'. *Australas Psychiatry* **12**, 406-408.
3. Haroz, R., Greenberg M. (2006): New Drugs of Abuse in North America. *Clinics in Laboratory Medicine* **26**, 147-164.
4. Joanne C.L., Reem K.J., HeeSeung L., Maree-Ann J., Rob R.K., Bruce R.R. (2011): Determining the subjective and physiological effects of BZP combined with TFMPP in human males. *Psychopharmacology* **214**, 761-768.
5. Gee P., Richardson S., Woltersdorf W., Moore G. (2005): Toxic effects of BZP-based herbal party pills in humans: a prospective study in Christchurch, New Zealand. *The New Zealand Medical Journal* **118**, 1784-1794.
6. Peč P. (2009): *Přehled Biochemie*. Nakladatelství Olomouc, Česká Republika, 34.
7. Bell S. (2009): Drugs and Poisons in the Body. In: *Drugs, poisons and Chemistry*. (Bell S.), Facts on file, NY, U.S.A., 50-78.
8. Linhart I. (2012): *Toxikologie: Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. VŠCHT Praha, Česká republika, 375.
9. Balíková M. (2007): *Forenzní a klinická toxikologie*. Galen, Česká Republika, 140.
10. Maurer H.H., Kraemer T., Springer D., Staack, R.F. (2004): Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Hepatic Metabolism of Designer Drugs of the Amphetamine (Ecstasy), Piperazine, and Pyrrolidinophenone Types - A Synopsis. *Therapeutic Drug Monitoring* **26**, 127-131.
11. Staack R.F., Paul L.D., Springer D., Kraemer T., Maurer H.H. (2003): Cytochrome P450 dependent metabolism of the new designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) *In vivo* studies in Wistar and Dark Agouti rats as well as *in vitro* studies in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **67**, 235-244.
12. Staack R.F., Maurer H.H. (2005): Metabolism of designer drugs of abuse. *Current Drug Metabolism* **6**, 259-274.
13. Antia U., Lee H.S., Kydd R.R., Tingle M.D., Russell B.R. (2009): Pharmacokinetics of 'party pill ' drug N-benzylpiperazine (BZP) in healthy human participants. *Forensic Science International* **186**, 63-67.
14. Altaira D.K. (1996): *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, Operation, and Application*. Vol. 2, (Altaira D.K.), Glaxo Research and Development, Ware, Hertfordshire, UK, 349.
15. Rozing P.G., Lauer H.H. (2010): *High Performance Capillary Electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany, 174.
16. Alcheme homepage: http://alcheme.tamu.edu/?page_id=6823 (29.10.2013).
17. Landers P.J. (2008): Introduction to Capillary Electrophoresis In: *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. 3rd ed., (Landers P.J.), CRC Press, Boca Raton, U.S.A, 1-75.
18. Švidrnoch M. (2012): *Analýza ethylglukuronidu pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií*. Diplomová práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká Republika.
19. Watson J.T., Sparkman O.D. (2007): Types of m/z Analyzers. In: *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*. 4th ed., Wiley, England, 61-131.
20. Waters homepage: http://www.waters.com/waters/en_US/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=en_US (23.10.2013).
21. Hewlett-Packard: *CE-ESI-MS: an integrated solution*. Publikáční číslo 5968-1328E, 1999.

22. Holčapek M. Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice homepage: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php> (13.11.2013).
23. Intech homepage: <http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/microdosing-assessment-to-evaluate-pharmacokinetics-and-drug-metabolism-using-lc-mc-ms-technology> (24.10.2013).
24. Sudakov M., Apatskava M., (2012): Perturbation theory for ion motion in quadrupole radio frequency field. *International Journal of Mass Spectrometry* **325-327**, 58-66.
25. Matsuta S., Nakanishi K., Miki A., Zaitso K., Shima N., Kamata T., Katagi M., Tatsuno M., Tsuboi K., Tsuchihashi H., Suzuki K. (2013): Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Science International*, **232**, 40-45.
26. Siroka J., Polesel D.N., Costa J.L., Lanaro R., Tavares M.F.M., Polasek M. (2013): Separation and determination of chlorophenylpiperazine isomers in confiscated pills by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **84**, 140-147.
27. Montesano C., Sergi M., Moro M., Napoletano S., Romolo F.S., Del Carlo M., Compagnone D., Curini R. (2013): Screening of methylenedioxyamphetamine- and piperazine-derived designer drugs in urine by LC–MS/MS using neutral loss and precursor ion scan. *Journal of Mass Spectrometry*. **48**, 49-59.
28. Tsutsumi H., Katagi M., Miki A., Shima N., Kamata T., Nishikawa., Nakajima K., Tsuchihashi H. (2005): Development of simultaneous gas chromatography–mass spectrometric and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric determination method for the new designer drugs, *N*-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) and their main metabolites in urine. *Journal of Chromatography B-analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **819**, 315-322.

6. SEZNAM ZKRATEK

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
BGE	Pracovní elektrolyt
BZP	Benzylpiperazin
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CITP	Kapilární izotachoforéza
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CYP	Cytochrom
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DBP	Dibenzylpiperazin
DFBP	Difluorobenzylpiperazin
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
ICR	Iontová cyklotronová rezonance
IT	Iontová past
LC	Kapalinová chromatografie
MALDI	Desorpce a ionizace za účasti matrice
MBP	Methylbenzylpiperazin
mCPP	Metachlorofenylpiperazin
MDMA	Methylendioxyamfetamin
MEKC	Micelární elektrokinetickou chromatografií
MRM	Monitorování několika fragmentačních reakcí
SPE	Extrakce na pevné fázi
pCPP	Parachlorofenylpiperazin
PEO	Poly(ethylen oxid)
PEI	Poly(vinyl sulfonát)
PVS	Poly(ethylen imin)
QqQ	Trojité kvadrpól

TIC	Celkový iontový proud
TOF	Detekce pomocí doby letu
TFMBP	Trifluoromethylbenzylpiperazin
TFMPP	Trifluoromethylfenylpiperazin
UV/VIS	Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti
v/v	Objem na objem

7. PŘÍLOHY

Příloha č. 1 – Abstrakt práce přijatý k prezentaci na mezinárodní konferenci

THE PIPERAZINE-BASED DESIGNER DRUGS: THE SLOW INTRODUCTION OF CE-ESI-MS/MS TO THE FORENSIC AND TOXICOLOGICAL ANALYSES

Martin Švidrnoch¹, Jakub Hajný¹, Vítězslav Maier¹

¹*Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. Listopadu 12, Olomouc, CZ-77146, Czech Republic*

Designer drugs and their newly synthesized derivatives have become a serious problem across the whole world. Piperazine-based drugs (PBDs) have similar stimulant properties like the wide group of amphetamines and thus are getting more common among drug abusers [1, 2]. Because of the fact that this relatively new group of drugs have not fully understood mechanism of action, PBDs could cause many serious health problems and thus the selective and sensitive detection is strongly needed.

In this work we focused on the determination and sensitive identification of selected PBDs and their possible impurities (e.g. *N*-benzylpiperazine, BZP; 3-trifluoromethylphenylpiperazine, TFMPP or *meta*-chlorophenylpiperazine, mCPP) using capillary electrophoresis equipped with a tandem mass spectrometry detector (CE-MS/MS). We evaluated important parameters such as the electrolyte composition and MS conditions such as drying gas temperature, pressure and flow rate as well as the sheath liquid composition. Beside that we studied the fragmentation patterns to allow selective identification using the MS/MS analysis in the multiple reaction monitoring (MRM). Also the collision energies were determined for the studied PBDs. A clean-up step was introduced prior to the analysis using an SPE extraction method. Also the developed method was partially validated and parameters such as linearity, limits of detection and quantification and repeatability were determined. The developed method was applied to the analysis of urine samples to prove its possible employing into the toxicological and forensic analysis.

References:

- [1] Anita U. et al., For. Sci. Int. 186 (2009) 63
- [2] Montesano C. et al.: J. Mass Spectrom. 48 (2013) 49

Acknowledgement

The financial support by Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (Project CZ.1.07/2.3.00/20.0018) and the grant of Ministry of Health of the Czech Republic IGA MZ No. NT-13593 are gratefully acknowledged.