

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**ÚČINNÝ SRÁŽKOVÝ PRŮŘEZ PŘI IDENTIFIKACI DROG SPOJENÍM IONTOVÉ
MOBILITY S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Jana Ondruchová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, PhD.

Konzultant:

Mgr. Lucie Borovcová

Olomouc 2016

SOUHRN

Diplomová práce je zaměřena na určování účinného srážkového průřezu kationů a fenylethylaminů na přístroji s mobilní celou typu TWIMS.

V úvodní kapitole je popsána iontová mobilní spektrometrie – vstup iontů, ionizace a detekce. Další kapitola je věnována třem typům mobilních cel, jejich popisu, použití a srovnání. Poté je v teoretické části vysvětlen pojem účinný srážkový průřez (CCS), včetně konkrétních aplikací. Poslední kapitola pojednává o programu MOBCAL, který umožňuje teoretické výpočty účinného srážkového průřezu.

V experimentální části diplomové práce, je prvně krok za krokem vysvětlen postup zpracování experimentálních dat v programu DriftScope. Následně je uvedena kapitola týkající se správného výběru rychlosti vlny v mobilní cele, která je klíčová pro správné zpracování naměřených dat. Určování účinného srážkového průřezu 18 nových syntetických drog bylo provedeno s využitím dvou kalibrantů – polyanin a směs látek (acetaminophen, alprenolol, N-ethylanilin, clozapin-N-oxid, colchicin, ondansetron, reserpin a verapamil). Následně byla ověřena funkčnost kalibrantů na experimentech, při kterých se vyhodnocoval účinný srážkový průřez jednotlivých látek z kalibrační směsi na kalibrant polyalanin. Závěrem bylo také ověřeno použití CCS jako identifikační charakteristiky při analýze směsi nových syntetických drog.

SUMMARY

This thesis is focused on determination of collision cross section of cationic and phenylethylamines using TWIMS as a type of mobility cell.

In the introduction, ion mobility-mass spectrometry is described – input ions, ionisation and detection. Next chapter deals with various types of mobility cells - their description, use and comparison. Following chapter explains collision cross section (CCS) with its specific applications. Last chapter is focused on software MOBCAL which can predict theoretical calculations of CCS.

Experimental part of this thesis is started with the explanation of experimental data processing method using program DriftScope. Next chapter describes the process of selecting the correct wave velocity inside the mobility cell which is crucial for correct data analysis. Determination of CCS of 18 new synthetic drugs was performed using two calibrants - polyaniline and mixture (acetaminophen, alprenolol, N-ethylaniline, clozapine-N-oxide, colchicine, ondansetron, reserpine and verapamil). Subsequently, proper function of those calibrants was controlled experimentally when CCS of the substances from mixture was determined using polyaniline as calibrant. In the end, the usage of CCS as identification characteristic for new synthetic drugs was verified.

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

.....
Jana Ondruchová

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D za cenné rady, připomínky a čas věnovaný mé diplomové práci. Dále děkuji Mgr. Lucii Borovcové za konzultace a pomoc při provádění experimentu.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Iontová mobilní spektrometrie.....	2
2.2	Přístrojové schéma pro iontovou mobilní spektrometrii	2
2.3	Princip migrace iontů.....	3
2.4	Tři základní typy iontově mobilních cel.....	5
2.4.1	Iontová mobilita v driftové trubici.....	5
2.4.2	Iontová mobilita s využitím putující vlny.....	5
2.4.3	Iontová mobilita s využitím asymetrické vlny s vysokou intenzitou elektrického pole.....	7
2.4.4	Srovnání iontově mobilních technik a jejich použití.....	8
2.5	Účinný srážkový průřez (Collision Cross Section, CCS, Ω).....	11
2.6	Přímé měření účinného srážkového průřezu a jeho měření s využitím kalibrantů	13
2.7	MOBCAL	24
2.8	Nové syntetické drogy	26
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1	Přístroje, chemikálie	27
3.2	Pracovní postupy.....	30
3.2.1	Analýzy na Synaptu G2-S.....	30
3.2.2	Příprava roztoků nových syntetických drog.....	30
3.2.3	Příprava kalibrantů.....	30
3.2.4	Průběh měření	31
3.2.5	Zpracovávání dat v programu DriftScope.....	31

4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
4.1	Polyalanin a volba rychlosti vlny.....	42
4.2	Určování účinného srážkového průřezu nových syntetických drog na kalibrant polyalanin.....	44
4.3	Určování účinného srážkového průřezu nových syntetických drog pomocí kalibrace směsí látek	49
4.4	Porovnání hodnot CCS drog získaných na kalibrant polyalanin a směs látek... ..	53
4.5	Měření účinného srážkového průřezu látek z kalibrační směsi na kalibrant polyalanin.....	55
4.6	Modelové směsné vzorky drog	58
4.7	Fragmentační spektra nových syntetických drog.....	59
5.	ZÁVĚR.....	61
6.	Seznam použité literatury	63
7.	SEZNAM ZKRATEK	66
8.	PŘÍLOHY	67

1. ÚVOD

Iontová mobilní spektrometrie se v analytické praxi využívá už přes 40 let. Tato analytická technika má široký rámec uplatnění, používá se například k analýze výbušnin na letištích, k analýze potravin, k monitorování životního prostředí či k farmaceutickým aplikacím. Své použití nachází též ve spojení s hmotnostní spektrometrií při ověřování struktury a identifikaci látek, ale také pro zlepšení poměru signálu k šumu při kvantitativní analýze. Právě k ověření struktury a identifikaci se využívá účinný srážkový průřez neboli CCS, který lze pomocí této metody určit.

Předložená diplomová práce se zabývá určením hodnot účinných srážkových průřezů (CCS) nových syntetických drog ze skupiny fenylethylaminů a kationů. Byly porovnávány experimentálně zjištěné hodnoty CCS získané pomocí dvou kalibrantů. Prvním kalibrantem byl polyalanin, druhým směs 6-ti látek (acetaminophen, alprenolol, N-ethylanilin, clozapin-N-oxid, colchicin, ondansetron, reserpin a verapamil). Zjištění hodnot CCS poskytuje zajímavou možnost pro zlepšení identifikace nových syntetických drog spolu s hmotnostními spektry.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Iontová mobilitní spektrometrie

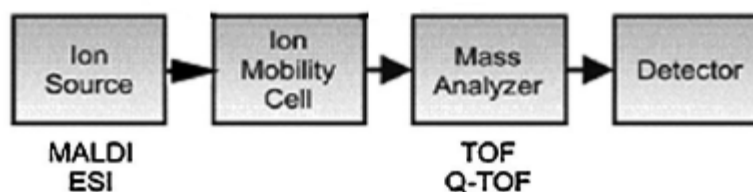
Iontová mobilitní spektrometrie (IMS, Ion Mobility Spectrometry) je založena na putování iontu v plynné fázi, kdy je jeho pohyb ovlivňován elektrickým polem a srážkami s driftovým plynem. Poměr rychlosti iontů vzhledem k intenzitě elektrického pole se nazývá *iontová mobilita* a technika využívající separace iontů na základě rozdílných mobilit se nazývá *iontová mobilitní spektrometrie*. Iontová mobilitní spektrometrie v sobě kombinuje vysokou citlivost, nízké detekční limity v rozsahu ng-pg/l, relativně nízké technické požadavky, monitorování látek v reálném čase a rychlý sběr spekter v řádu milisekund, což je oproti chromatografickým metodám velká výhoda.[1], [2]

Iontová mobilitní spektrometrie se začala používat v 70. letech 20. století. V těchto letech byla tato technika také známá pod názvy *plynová elektroforéza* nebo *plasmová chromatografie*. V posledních letech se rozvíjí spojení IMS s hmotnostní spektrometrií, kde nachází své široké uplatnění např. v analýze farmaceutických přípravků, při analýze nelegálních drog či při detekci výbušnin. V dnešní době jsou nejpoužívanější tři typy mobilitních cel, které jsou popsány v kapitole 2.4.[1], [2], [2], [4]

2.2 Přístrojové schéma pro iontovou mobilitní spektrometrii

Iontový mobilitní spektrometr se skládá ze tří základních částí: z iontového zdroje, iontově mobilitní cely a detektoru iontů. Pokud je IMS spojena s hmotnostním spektrometrem, je za mobilitní celu zařazen hmotnostní analyzátor např. analyzátor doby letu (TOF).[5]

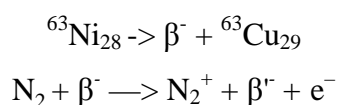
Na obrázku 1 je zobrazen náčrt iontově mobilitního spektrometru ve spojení s hmotnostním analyzátozem.



Obr. 1 Komponenty spojení iontového mobilitního spektrometru s hmotnostním spektrometrem (převzato z cit.[5])

První část přístroje představuje oblast vstupu vzorku. Vzorky mohou být do IMS zavedeny různými způsoby. Plynné vzorky jsou dávkovány přímo, semitěkavé látky jsou dávkovány tepelnou desorpcí např. ze sběrových filtrů. Dalšími způsoby dávkování jsou plynová chromatografie, kapalinová chromatografie či přímá infúze.[6]

K ionizaci je používána řada technik např. fotoionizace, laserová ionizace, MALDI nebo termoionizace. Dále lze využít i ambientní ionizační techniky např. DESI či DART. Původním zdrojem ionizace byl radioaktivní ^{63}Ni , který emituje β^- částice reagující s molekulou pomocného plynu, např. dusíku.[1], [4], [6], [7], [8]



β^- je částice, která předala část své energie na ionizaci molekuly dusíku. Další složkou reakce je ion N_2^+ , který začíná sérii iontově molekulových reakcí při stopových množstvích H_2O , NH_3 , NO nebo vzorku v dostatečné koncentraci. Vzhledem k jeho krátkému životu se neobjevuje ve spektru. Při menším množství vzorku vznikají iontové klastry $(\text{H}_2\text{O})_n\text{NH}_4^+$, $(\text{H}_2\text{O})_n\text{NO}^+$ a $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$, také označované jako *reakční ionty*. Pozitivním reakčním iontem je $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$, v negativním módu je používán ion $\text{O}_2^-(\text{H}_2\text{O})_n$. Tyto ionty reagují s neutrálními analyty v plynné fázi iontově molekulovými reakcemi a dávají vzniknout *iontům* analytu. Na základě chemické struktury mohou sloučeniny upřednostňovat reakce vedoucí ke kationtům nebo aniontům.[1], [2], [4], [8]

Další částí iontově mobilitního spektrometru je mobilitní cela. Podrobnější popis tří nejběžnějších mobilitních cel je v kapitolách 2.4.1, 2.4.2 a 2.4.3.

Poslední částí IMS je detektor. Detektorem může být například Faradayův pohár. Při spojení s hmotnostní spektrometrií je detekce prováděna obvyklými detektory iontů hmotnostního spektrometru.[9]

2.3 Princip migrace iontů

První veličinou popisující IMS je driftová rychlost v_d jednotlivých iontů. Driftová rychlost je určena driftovým časem t_d [ms], který potřebují ionty k překonání vzdálenosti d [cm] mezi vstupem do mobilitní cely a detektorem (4).[8]

$$v_d = d / t_d \quad (4)$$

Driftová rychlost iontů závisí počtu srážek mezi ionty a molekulami driftového plynu při pohybu k nižšímu potenciálu, který je přímo úměrný na intenzitě elektrického pole (E), dle rovnice (5).[1], [3], [7]

$$v_d = KE \quad (5)$$

kde konstanta úměrnosti K se nazývá iontová mobilita [cm^2/Vs].

Tuto konstantu můžeme pro nízkou intenzitu elektrického pole (<1000 V/cm) určit dle rovnice (6).[3]

$$K = v_d/E = L^2/Vt_d \quad (6)$$

kde L je driftová vzdálenost [cm], V je napětí (rozdíl potenciálů mezi body vzdálenými L cm) a t_d je čas, který potřebují ionty k překonání dráhy o délce L . [1]

K výpočtu iontové mobility K lze využít Mason-Schampovu rovnici (7), [3]

$$K = 3/16 [ze/No (2\pi/\mu kT)^{1/2} (1/\Omega_D)] \quad (7)$$

kde z je náboj iontu, e je náboj elektronu [C], No je hustota driftového plynu [*molekuly na cm^{-3}*], μ je redukovaná hmotnost kolizního páru ion-driftový plyn [$\mu = mM/(m+M)$], m hmotnost iontu, M hmotnost neutrálních molekul plynu, k je Boltzmanova konstanta, T teplota [K], Ω_D účinný srážkový průřez. [3]

Driftová rychlost je závislá na teplotě a tlaku v driftové trubici (K je funkcí tlaku), proto se K přepočítává na 273 K a 760 torrů, čímž dostáváme redukovanou konstantu úměrnosti K_0 . [3], [8]

$$K_0 = K(273/T)(P/760) \quad (8)$$

T je teplota v kelvinech a P je tlak v torrech.

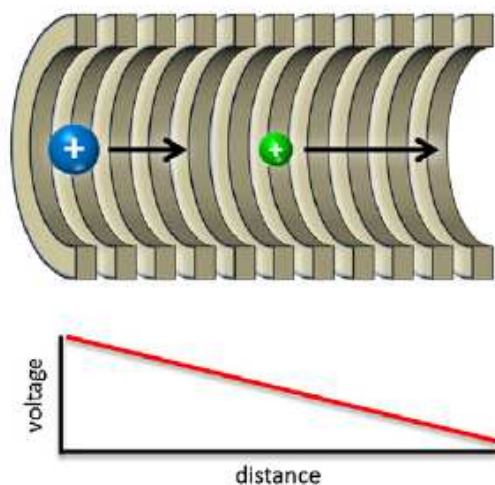
Při vyšší intenzitě elektrického pole přestává platit přímá úměra mezi E a K . [3]

2.4 Tři základní typy iontové mobilitních cel

2.4.1 Iontová mobilita v driftové trubici

Měření se provádí v driftové trubici (drift tube, drift tube ion mobility, DTIM) naplněné driftovým plynem, na kterou je vloženo elektrické pole o intenzitě 5-100 Vcm⁻¹. Ionty jsou směřovány do vstupního otvoru driftové trubice a v důsledku vloženého elektrického pole a interakci s molekulami driftového plynu (většinou He) driftují trubicí, dokud ji na druhém konci neopustí. U menších a kompaktnějších iontů dochází k méně častým kolizím s plynem, proto budou méně zpomalené a jejich driftové časy budou kratší než u větších iontů. Měřením driftové rychlosti iontu při dané teplotě (T) a řešením Mason-Schampovi rovnice (9) lze vypočítat účinný srážkový průřez (collision cross section, CCS, Ω). Hodnota CCS na jehož základě lze identifikovat látky podle jejich tvaru a velikosti, je počítána přímo bez nutnosti použití standardu.[5], [10], [11], [12]

$$\Omega = \frac{3ze}{16N} \cdot \left(\frac{2\pi}{\mu k_B T}\right)^{1/2} \cdot \frac{1}{K_0} \quad (9)$$

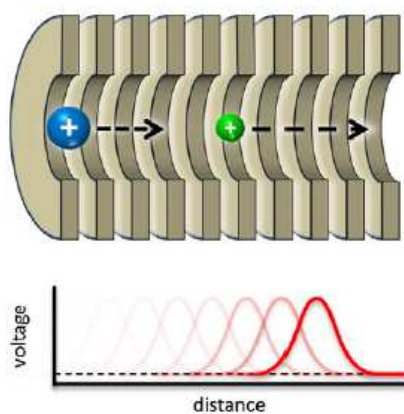


Obr. 2 Nákres zobrazuje konstrukci DTIM (převzato z cit. [13])

2.4.2 Iontová mobilita s využitím putující vlny

Druhým typem mobilitní cely je iontová mobilita s využitím putující vlny (travelling wave ion mobility, TWIM). Prvním komerčně dostupným přístrojem využívající tento typ iontové mobility, a to ve spojení s hmotnostním spektrometrem (ion mobility-mass

spectrometry, IM-MS), byl v roce 2006 Synapt HDMS, který byl v roce 2009 nahrazen Synaptem G2. Druhá generace (kombinace IM s hmotnostním spektrometrem) přinesla vyšší citlivost, 4x vyšší rozlišovací schopnost, lepší přesnost hmoty a rychlejší sběr dat (20 spekter/s). Metoda je založena na separaci iontů pomocí série napěťových pulsů uvnitř mobilní cely skládající se z vysokofrekvenčních elektrod. Krátkodobý stejnosměrný nízkonapěťový puls se aplikuje postupně na elektrody tvořící mobilní celou, čímž se vytvoří postupná (putující) vlna pohánějící ionty driftovou celou. Ionty s vyšší mobilitou jsou unášeny vlnou rychleji, ionty s nižší mobilitou se převalují přes vlnu a putují pomaleji. V takovémto uspořádání nelze přímo měřit CCS, jelikož není k dispozici potřebný popis, v tomto případě proměnné intenzity elektrického pole. Nelze aplikovat výše uvedené vztahy mezi intenzitou elektrického pole a driftovou rychlostí. Hodnoty CCS však lze získat s využitím kalibrace pomocí standardů, jejichž hodnoty CCS jsou známy (z měření pomocí driftové trubice). K provedení kalibrace je vhodné použít látky podobných fyzikálních a chemických vlastností se známými hodnotami CCS, čímž dojde k zajištění podmínek vhodných jak pro analyt, tak pro kalibrant. TWIM lze použít k separaci, či s využitím kalibrace ke strukturní analýze. Další nevýhodou je nižší separační schopnost oproti technice DTIM. Naopak rychlost měření je větší, což usnadňuje zabudování TWIM do spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. K vizualizaci dat slouží software Driftscope, který nabízí řadu možností k jejich zhodnocení např. 3D vizualizace nebo 2D ploty.[5], [10], [11], [12], [13]



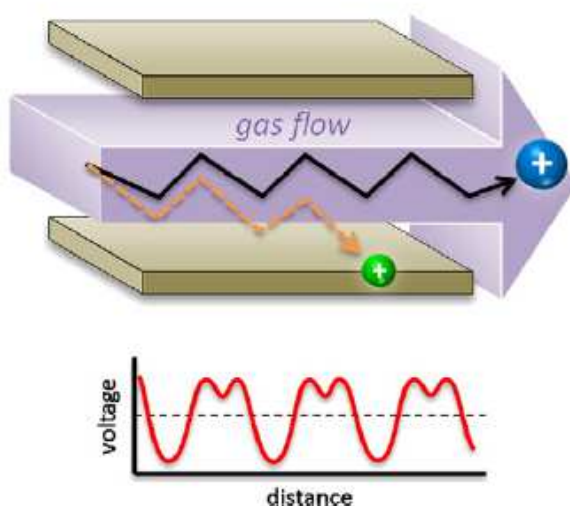
Obr. 3 Nákres zobrazuje konstrukci TWIM (převzato z cit. [13])

2.4.3 Iontová mobilita s využitím asymetrické vlny s vysokou intenzitou elektrického pole

Dalším typem iontové mobility je technika založená na aplikaci asymetrické napěťové vlny, kdy se střídají vysokonapěťové a nízkonapěťové pulzy (high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry, FAIMS). Poprvé byla použita v letech 1980 v Sovětském svazu, komerčně dostupnou ve spojení s hmotnostní spektrometrií se stala v roce 2003. FAIMS umožňuje separaci iontů, které nebyly rozlišeny DTIM či TWIM.[10], [13]

K dosažení separace iontů jsou použita dvě rozdílná napětí, disperzní a kompenzační, a proud driftového plynu. Disperzní napětí je tvořeno střídavým asymetrickým tvarem vlny, přičemž hodnota kladného napětí je vyšší než negativního. Kompenzační napětí je vkládáno za účelem nasměrování iontů při průchodu elektrodami na výstup z mobilitní cely. Při vložení daného kompenzačního napětí budou ionty specifické mobility odpuzovány od elektrod, zatímco jiné ionty pokračují a jsou na elektrodách neutralizovány.[11]

FAIMS funguje jako mobilitní filtr a ve spojení s kapalinovou chromatografií bývá používán jako separační technika sloužící k oddělení iontů před MS analýzou. Touto technikou nelze určit CCS, protože pracuje při vysokých hodnotách sil elektrického pole, což znemožňuje korelaci mezi driftovým časem a strukturou analytu. FAIMS bývá primárně používáno k odstranění nežádoucího pozadí v analyzovaném vzorku a k separaci analytů.[11]



Obr. 4 Nákres zobrazuje konstrukci FAIMS (převzato z cit. [13])

2.4.4 Srovnání iontově mobilitních technik a jejich použití

Tab. I Výhody a nevýhody mobilitních cel (převzato z cit. [11], [12], [13])

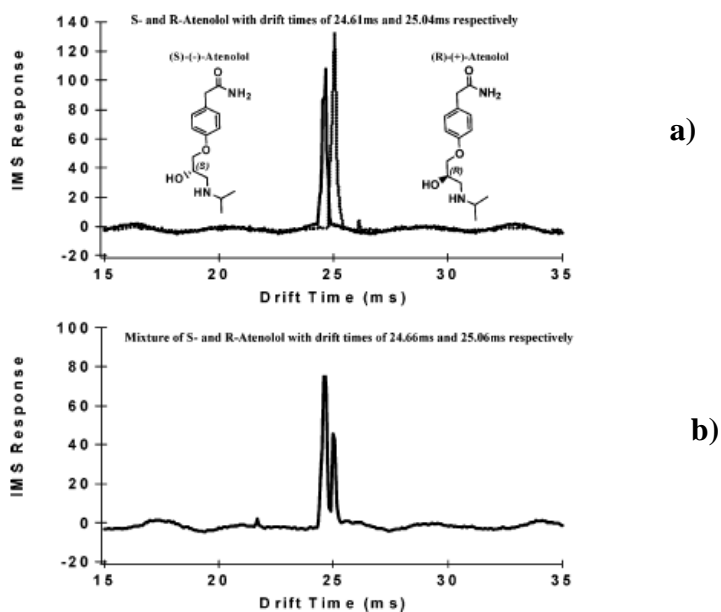
	Výhody	Nevýhody
DTIMS:	<ul style="list-style-type: none"> ° CCS (Ω) lze změřit přímo ° lze použít pro separaci iontů s podobnými mobilitami ° vysoká rozlišovací schopnost ($> 100, \Omega/\Delta \Omega$) 	<ul style="list-style-type: none"> ° současná konfigurace komerčních přístrojů dovoluje zařadit mobilitní celou pouze hned za ionizaci ° ionty nejsou do mobilitní cely dávkovány kontinuálně, což vede ke ztrátám a snížení citlivosti, do jisté míry lze řešit multiplexováním
TWIMS:	<ul style="list-style-type: none"> ° lze vypočítat CCS ° může být použita k mobilitní separaci produktových iontů generovaných např. kolizí indukovanou disociací 	<ul style="list-style-type: none"> ° stanovit CCS lze pouze po provedení kalibrace ° relativně nízká rozlišovací schopnost ($\leq 45, \Omega/\Delta \Omega$)
FAIMS:	<ul style="list-style-type: none"> ° vysoká rozlišovací schopnost ($\leq 100, \Omega/\Delta \Omega$) ° relativně jednoduché přenesení mezi různými hmotnostními spektrometry 	<ul style="list-style-type: none"> ° CCS nelze určit ° horší pracovní cyklus při vloženém kompenzačním napětí – snížení citlivosti ° dnešní řešení geometrické konfigurace přístrojů umožňuje zařazení mobility pouze hned za ionizaci

Iontová mobilitní spektrometrie má široké možnosti uplatnění. Dříve byla užívána i jako detektor pro plynovou [14], [15] či superkritickou fluidní chromatografii. [16], [17] V dnešní době je nejvíce známá díky detekci výbušnin [18], [19], dále se používá k analýze nelegálních drog [20], k detekci bojových chemických látek [21], k detekci bakterií [24] a k monitorování kvality vody [25]. Své uplatnění nachází též v metabolomice, kde se uplatňuje např. při analýze vydechovaného vzduchu [2], [22], [23] (vývoj metod pro včasnou diagnózu rakoviny). Další možností je využití k farmaceutickým aplikacím respektive ke kontrole kvality a zabezpečování jakosti [26], [27].

Iontová mobilitní spektrometrie ve spojení s MS se používá k analýze řady malých molekul např. veterinární léčiva, farmaceutické přípravky, metabolity a pesticidy.[5] Toto spojení se dále využívá i např. k separaci strukturních izomerů [28].

Iontová mobilita v driftové trubici (DTIM) ve spojení s hmotnostní spektrometrií našla své uplatnění v chirální separaci. *Dwivedi a kol.* ve svém článku prezentují chirální iontovou mobilitní spektrometrii (CIMS) a příklady jejího použití k separaci enantiomerů a racemických směsí farmaceutik, aminokyselin či cukrů.[29]

CIMS separuje plynné ionty nejen na základě rozdílu ve tvaru a velikosti, ale také na základě stereospecifických interakcí s chirálním plynem. Autoři ve své práci používají (S)-(+)-2- butanol jako chirální modifikátor, který slouží k enantiomerní separaci např. atenololu, serinu, glukosy či tryptofanu z jejich racemických směsí. Autoři se dále zabývali vlivem velikosti přídavku chirálního modifikátoru do driftového plynu (N₂). Obrázek 5 a zobrazuje překryté mobilogramy R a S enantiomeru atenololu po přídavku 10 ppm chirálního modifikátoru ((S)-(+)-2- butanolu) do driftového plynu (N₂). Druhý z mobilogramů (Obr. 5 b) zobrazuje separaci enantiomerů z jejich racemické směsi. Použitá metodika by mohla vést k vývoji nové a rychlé analytické metody umožňující separaci enantiomerů.[29]



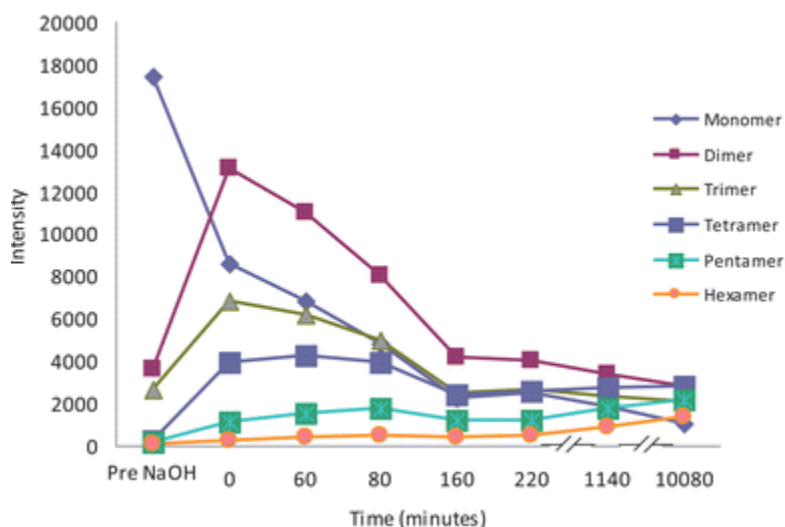
Obr. 5 Mobilogramy atenololu: **a)** překryté mobilogramy R a S enantiomeru atenololu, **b)** separace racemické směsi(převzato z cit.[29])

Dále se DTIM/MS použilo při sledování hydratace a desolvatace malých molekulových iontů. *Momoh a El-Shall* studovali hydrataci organických iontů, která je důležitá pro chemické, biologické ale i fyzikální procesy jako je např. tvorba micel,

párování bází v DNA či při navrhování struktury léčiv, ale může sloužit i k zjištění struktury daných iontů. Analyzován byl fenylacetylenový ion ($C_8H_6^+$), který byl pulsy směřován do driftové cely naplněné vodní parou (0,2-0,6 Torr). Autoři s použitím driftové cely zjistili vazebné energie molekul vody s fenylacetylenovým iontem a také demonstrovali, že sledováním hydratace daných iontů lze určit jejich strukturu.[30]

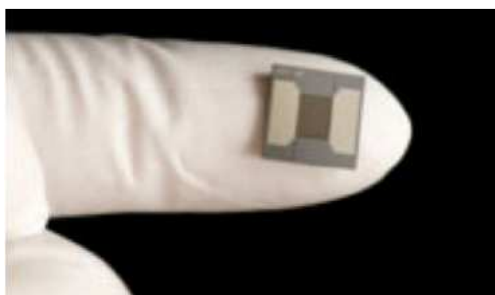
TWIMS má též široké uplatnění, byla použita např. k monitorování průběhu reakce v reálném čase, což poskytuje detailnější informace o průběhu reakce a může vést k jejímu lepšímu pochopení. Techniky v současné době používané k takovému monitorování jsou např. hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, nukleární magnetická rezonance nebo infračervená spektrometrie. Časově lze rozlišit např. vznik meziproductů či formaci produktu a tím i optimalizovat experimentální podmínky.[5], [31]

Harry a kol. sledovali průběh reakce 7-fluor-6-hydroxy-2-methylindolu s hydroxidem sodným. K reakci byl použit 7-fluor-6-hydroxy-2-methylindol o koncentraci 125 $\mu\text{g/ml}$ v acetonitrilu. Dále byl připraven 40 mM NaOH, který po přidání k 7-fluor-6-hydroxy-2-methylindolu zahájil deprotonační reakci. Reakční směs byla po dobu prvních šesti hodin reakce udržována při teplotě -5 až 0 $^{\circ}\text{C}$, po uplynutí doby byla ponechána při laboratorní teplotě přes noc. Poté se odebralo alikvotní množství roztoku, které bylo zředěno na potřebnou koncentraci a následně proběhla IM/MS analýza. Spektra byla sbírána v intervalech 60, 80, 160, 220 min, dále po 24 hodinách a po 7 dnech od přidání NaOH. K analýze byl použit Synapt HDMS, který pracoval v pozitivním módu s ionizací elektrosprejem. Obrázek 6 zobrazuje časovou závislost intenzity protonovaných molekul vzniklých z produktů a reaktantů na čase. Je např. patrné, že dimer dosáhl maximální intenzity v krátkém čase od přidání NaOH a pak jeho intenzita klesala, což je spojeno s další polymerací a vznikem vyšších multimerů. Touto studií autoři prokázali, že IM/MS lze použít k rychlému zhodnocení reakční směsi, potažmo ke sledování reakce v reálném čase.[31]



Obr. 6 Závislost intenzity iontů na čase (převzato z cit. [31])

Typem iontové mobility, kterou lze snadno miniaturizovat je FAIMS. Její výhodou je instrumentální nenáročnost, dá se spojit s přenosným hmotnostním spektrometrem. Tato metoda našla uplatnění při mikrobiální analýze, při které jsou používány FAIMS mikročipy. Mikročipy zvyšují rychlost separace, umožňují rychlé monitorování částic a analýzu nízkých koncentrací. Vzhled současného mikročipu je na obrázku 7. Vícekanálové mikročipy jsou spojovány s iontovým zdrojem či detektorem a nachází využití při analýze plynů, při chemickém monitorování a v autonomní diagnostice zdraví.[5]

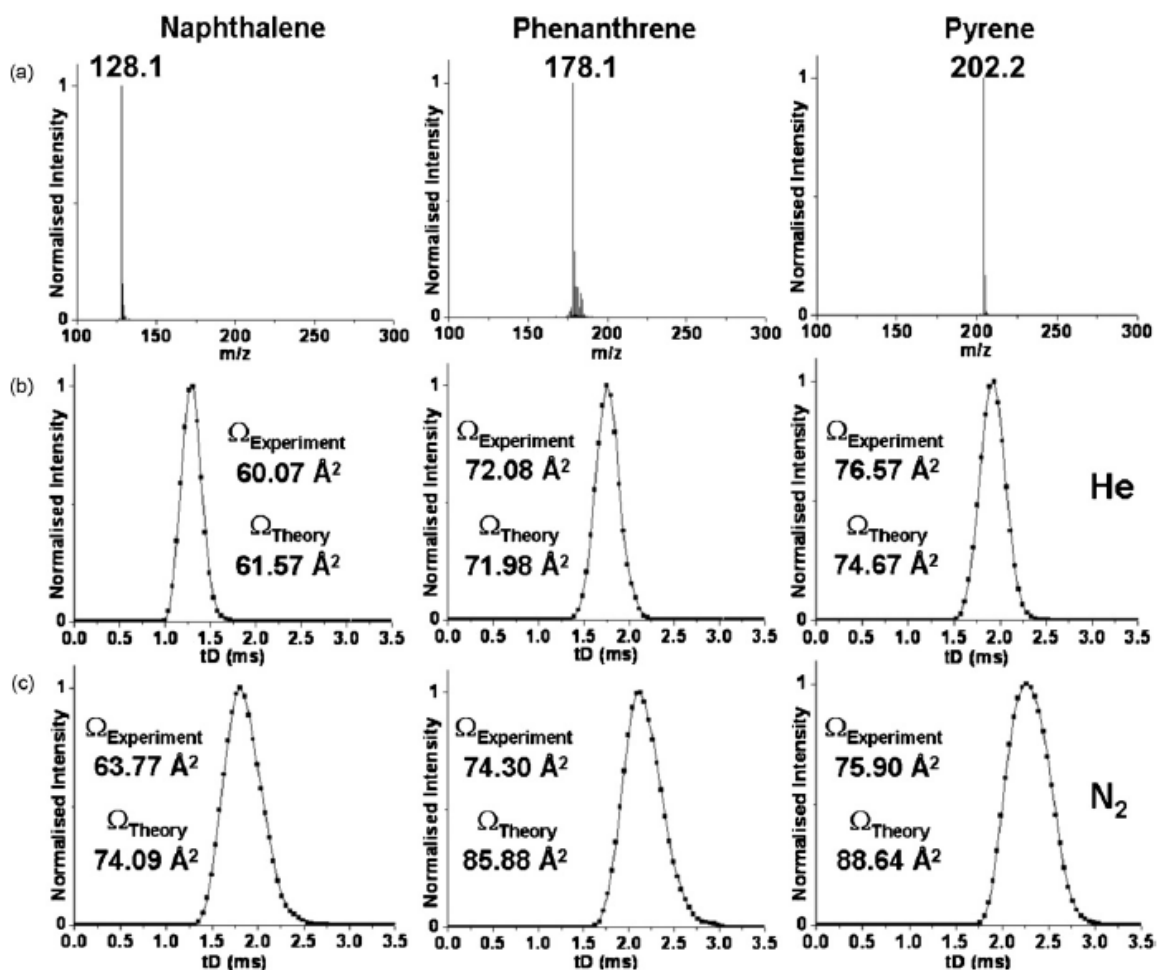


Obr. 7 Vzhled FAIMS mikročipu (převzato z cit. [5])

2.5 Účinný srážkový průřez (Collision Cross Section, CCS, Ω)

Účinný srážkový průřez (collision cross section, CCS, Ω) charakterizuje míru interakce iontu s neutrálními molekulami driftového plynu. Jedná se o zajímavou rozlišovací charakteristiku iontu v plynném stavu související s jeho chemickou strukturou a konformací.[32]

Hodnota CCS je velmi závislá na druhu kolizního plynu, ve kterém se měří, čím větší jsou molekuly kolizního plynu, tím větší je hodnota CCS. Měření CCS analytu by tedy mělo být prováděno ve stejném kolizním plynu, ve kterém jsou naměřeny hodnoty CCS pro kalibrant, v případě použití mobilní cely TWIM. Na obrázku 8 jsou zobrazeny mobilogramy naftalenu, fenantrenu a pyrenu. Obrázky **b** se vztahují k heliu jako driftovému plynu, obrázky **c** k dusíku a je patrné, že jejich CCS jsou odlišná.[33]



Obr. 8 Mobilogramy naftalenu, fenantrenu a pyrenu v různých driftových plynech (převzato z cit. [33])

Hodnotu účinného srážkového průřezu lze určit přímo v případě použití iontové mobility v driftové trubici (DTIM). Driftový čas lze převést na CCS pomocí Mason-Schampovi rovnice. Tu lze aplikovat pouze na malé molekuly, velké molekuly, jako jsou např. proteiny, mohou podléhat významnějším změnám CCS v závislosti na teplotě. Hodnota

CCS také závisí na hmotnosti iontu, molekulách driftového plynu, interakcích ion-driftový plyn a tvaru iontu.[34], [35], [36]

V případě použití iontové mobility s putující vlnou (TWIM) je nutné k získání hodnot účinného srážkového průřezu provádět kalibraci se standardy, u nichž jsou již hodnoty účinného srážkového průřezu známy.[34]

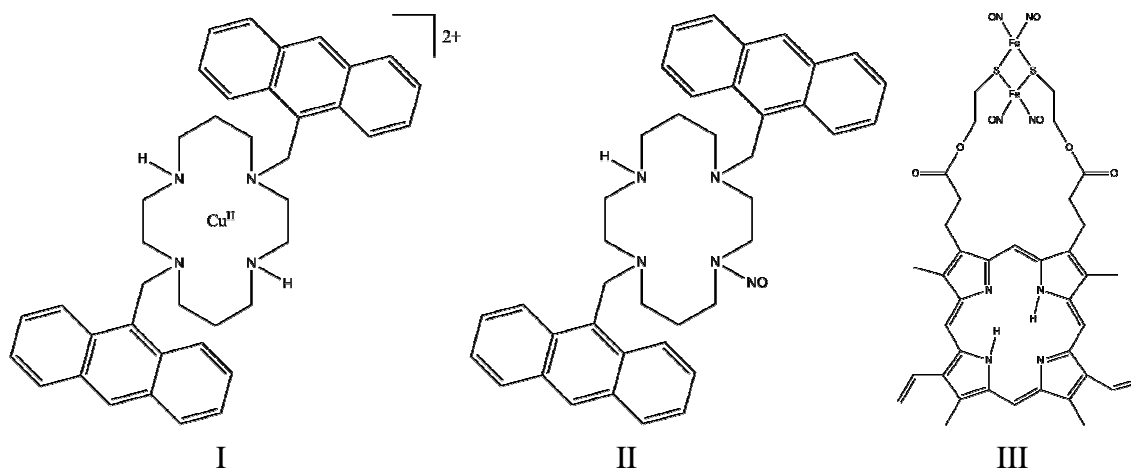
Experimentální CCS lze také srovnat s teoretickými hodnotami CCS získanými pomocí molekulárně dynamických simulací v programu MOBCAL, viz kapitola 2.7.[11]

2.6 Přímé měření účinného srážkového průřezu a jeho měření s využitím kalibrantů

Hodnoty CCS, vypočtené či naměřené, mohou být použity k určení struktury dané látky. K určení struktury však pouze tyto hodnoty nestačí, ale je nutné mít úplné nebo částečné informace o struktuře látky (získané rentgenostrukturní analýzou, hmotnostní spektrometrií nebo NMR). Data získaná rentgenostrukturní analýzou nebo NMR mohou sloužit k predikci CCS a srovnání s experimentálními hodnotami. Příkladem může být využití k analýze léčiv, kdy fyzikálně chemické a vazebné vlastnosti závisí na struktuře. V současnosti se provádí velké množství studií zabývajících se konformačními vlastnostmi malých molekul. V neposlední řadě může být zjištění CCS využito i k rozhodnutí, které molekula ze série poskytuje nejlepší optimální účinnost, čehož se využívá při vývoji léčiv.[5], [11]

Analytická metoda IMS/MS se používá také k analýze supramolekulárních komplexů. Supramolekulární komplexy mají fotochemické vlastnosti, které jsou důležité pro zachycení sluneční energie, pro fotochemické léky a fluorescenční sensory.[5]

Baker a kol. použili ke studiu bichromatických kovových organických komplexů iontovou mobilitu s driftovou trubicí. Pro analýzu byly vybrány tři sloučeniny, jejichž struktury jsou zobrazeny na obrázku 9.



Obr. 9 Struktury studovaných sloučenin: I: komplex $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{DAC})^{2+}$, II: nitrosylovaný ligand DAC-NO, III: červená sůl kyseliny Rousinové PPIX-RSE (III)

V případě komplexu I autoři porovnávali jeho strukturu získanou metodou iontové mobility s jeho krystalovou strukturou. Dále určovali orientaci antracenové skupiny v ligandu II vzhledem k cyklamu, v případě sloučeniny III se zabývali nalezením jejích stabilních struktur a jejich vzájemným vztahem. K analýze byla využita ionizační technika MALDI, kde jako matrice byla použita 2,5-dihydroxybenzoová kyselina a jako rozpouštědlo sloužil metanol. Vzniklé ionty byly akcelerovány 9 keV do 1 m dlouhé letové trubice. Ionty byly dále vpraveny do 20 cm driftové cely naplněné heliem (1,5 Torr), při teplotě 80 až 500 K (v závislosti na experimentu), na kterou se též aplikovalo slabé elektrické pole, které vpouštělo ionty skrze helium s konstantní driftovou rychlostí. Za driftovou celou byly ionty směřovány do kvadrupólového hmotnostního analyzátoru. Z hodnot distribuce driftového času byla vypočítána redukovaná konstanta mobility při různé intenzitě elektrického pole (7,5-16 V/cm). Vypočtené hodnoty CCS byly srovnány s experimentálními. Pro komplex I byla teoretická hodnota CCS $\Omega_{\text{N}_2} = 166 \text{ \AA}^2$ a experimentální $\Omega_{\text{N}_2} = 161 \text{ \AA}^2$, pro sloučeninu II $\Omega_{\text{N}_2} = 161 \text{ \AA}^2$, $\Omega_{\text{N}_2} = 172 \text{ \AA}^2$ a experimentální hodnoty $\Omega_{\text{N}_2} = 159 \text{ \AA}^2$, $\Omega_{\text{N}_2} = 173 \text{ \AA}^2$ (dvě hodnoty uváděné pro jednu látku odpovídají jejím konformerům). V případě látky III byly experimentální hodnoty CCS $\Omega_{\text{N}_2} = 200 \text{ \AA}^2$ a $\Omega_{\text{N}_2} = 210 \text{ \AA}^2$ blízké teoretickým hodnotám konformerů s vyšší vypočítanou energií. Autoři např. na základě porovnání krystalové struktury s experimentálně zjištěnými hodnotami CCS zjistili, že komplex I má podobnou strukturu v pevném a plynném stavu.[37]

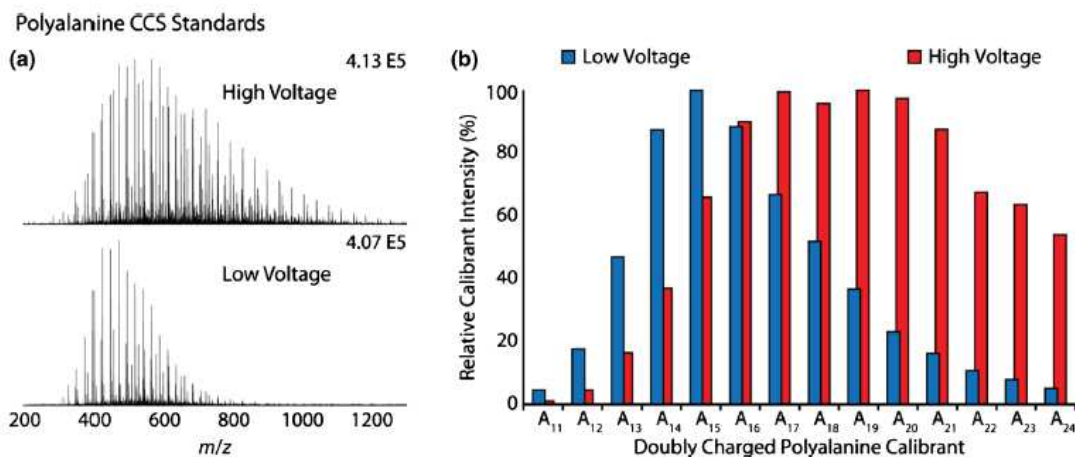
Součástí vývoje a objevování nových léčiv je i identifikace metabolitů těchto léčiv. K tomuto účelu lze použít iontovou mobilní spektrometrii ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Dear a kol.* využili metodiku, která v sobě spojuje teoretické výpočty a experimenty s TWIM, k přiřazení experimentálních dat a struktur řady isomerních metabolitů léčiv. Jako modelovou sloučeninu použili 5HT3 antagonistu ondansetronu, který produkuje isomerní aromatické hydroxyl metabolity. Měření bylo prováděno na Synaptu G2 HDMS v pozitivním módu a jako ionizační zdroj sloužil elektrosperej. Podmínky měření byly voleny takto: teplota zdroje 120 °C, desolvatační teplota 450 °C, dále byly použity různé rychlosti vlny (900, 1000 a 1100 m/s) s amplitudou pulsu 40 V. Data se sbírala v kontinuálním módu s rozsahem m/z od 50 do 600. Ke kalibraci autoři použili pět jednonásobně nabitých iontů polyalaninu s hodnotami CCS, které byly změřeny pomocí DTIM. Hodnoty účinných srážkových průřezů byly následující: 89 Å² (m/z 232,12); 102,9 Å² (m/z 303,16); 115 Å² (m/z 374,2); 127 Å² (m/z 445,24) a 140,5 Å² (m/z 516,27). Teoretické hodnoty CCS byly vypočítány pomocí softwaru MOBCAL. Jako nejvhodnější metodou k výpočtu se jevila metoda trajektorie.[38]

Odlišení antagonisty ondansetronu od jeho isomerních hydroxy metabolitů nešlo provést konvenční technikou UHPLC/MS/MS bez použití standardů, protože nebylo možné odlišit hydroxy metabolity poskytující stejná MS/MS spektra. Poloha hydroxy skupiny metabolitů byla odlišena použitím IM ve spojení s LC a MS. K identifikaci metabolitů posloužilo porovnání CCS získaných experimentálně TWIMS a CCS získaných výpočtem.[5], [38]

Lietz a kol. se zaměřili na tvorbu databáze CCS peptidů, kterou lze použít například k zjištění konformace komplexu kov-peptid. Stejně jako *Bush a kol.* použili ke kalibraci tryptických peptidů jednou, dvakrát a třikrát protonované molekuly polyalaninu, které byly změřeny na upraveném Synaptu G1 (mobilní celou byla driftová trubice).[39]

Kalibrant (polyalanin) o koncentraci 0,1 mg/ml byl rozpuštěn v 50% ACN okyseleném 1% kyselinou mravenčí. Vzniklý kalibrační roztok byl proměřen při pěti různých poměrech rychlost vlny/výška vlny (500/30, 500/35, 600/35, 700/35 a 800/40). Výška vlny souvisí s velikostí napěťových pulsů, které tvoří putující vlnu, a rychlost vlny se vztahuje k rychlosti šíření těchto pulsů. Měření bylo prováděno při dvou sprejovacích napětích 1,2-2 kV a 3 kV. Při nízkém napětí byly pozorovány ionty do m/z 900, na rozdíl od měření při vysokém napětí,

kdy jsou měřeny ionty až o m/z 1200. Změna napětí také ovlivňuje nábojový stav standardu polyalaninu (Obr. 10). K ověření kalibrace polyalaninem při vysokém napětí byly využity hodnoty CCS bradykininu.[39]



Obr. 10 Polyalanin měřený při vysokém a nízkém sprejovacím napětí (převzato z cit.[39])

Použitím iontové mobility lze analyzovat tisíce peptidů v jednom experimentu. Vzhledem k velkému množství získaných CCS se autoři rozhodli vytvořit vlastní software pepCCScal, který se používá k výpočtu CCS peptidů z hodnot naměřených Synaptem G2S.

Nejprve si vytvořili csv soubor hodnot CCS pro kalibrant (polyalanin), který se otevře v programu Driftscope a provede se nechromatografická detekce píků. Csv soubor se skládá ze tří sloupců, sloupec A obsahuje peptidové sekvence kalibrantu, ve sloupci B je náboj kalibrantu a v posledním sloupci jsou hodnoty CCS kalibrantu. V dalším kroku prováděli výpočty CCS softwarem pepCCScal.[39]

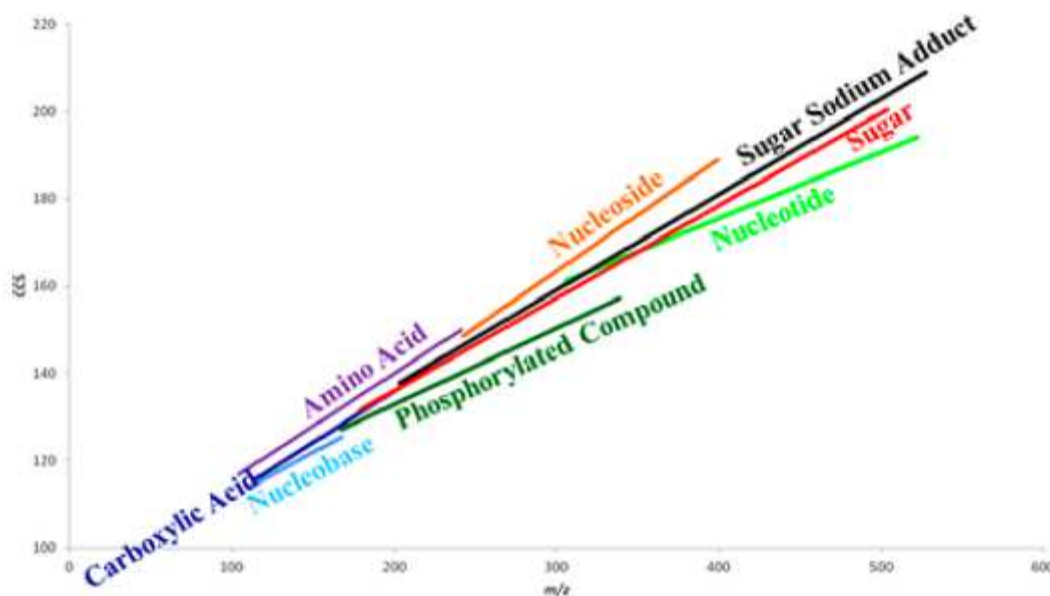
Paglia a kol. využili iontovou mobilitu a měření CCS k objasnění struktur metabolitů. Zjištění struktury metabolitů je hlavním analytickým úkolem oboru zabývající se studiem metabolismu – metabolomiky. Pomocí TWIM/MS autoři proměřili 125 běžných metabolitů. K jejich analýze se běžně užívá LC/MS, ale za účinnější nástroj pro metabolomickou analýzu lze považovat UPLC ve spojení s iontovou mobilitou a hmotnostní spektrometrií. Iontová mobilita byla měřena na třech různých přístrojích. Podmínky nastavované na přístrojích v kladném i záporném módu jsou zobrazeny v tabulce (Tab II).[40]

Tab. II Nastavení jednotlivých Synaptů

ES ⁺	Napětí na kapiláře (kV)	Teplota zdroje (°C)	Desolvatační teplota (°C)	Rychlost vlny (m/s)	Výška vlny (V)
Synapt 1	2,5	120	500	600	40
Synapt 2	2,5	100	250	650	37
Synapt 3	2,5	110	200	650	40
ES ⁻					
Synapt 1	2,5	120	500	900	40
Synapt 2	2,9	100	250	790	40
Synapt 3	3	110	200	600	40

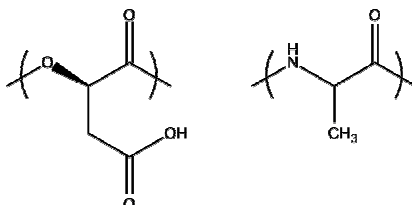
Kalibrantem pro všechna měření jak v kladném, tak v záporném módu byl poly-DL-alanin. Roztok polyalaninu o koncentraci 10 mg/l se připravil jeho rozpuštěním ve směsi acetonitril/voda (50:50, v/v). Hodnoty CCS pro metabolity se získaly kalibrací na jednonásobně nabitě oligomery polyalaninu pokrývající rozsah hmotností od 231 do 799 Da, s hodnotami CCS od 151 Å² do 306 Å² pro kladný mód a od 150 Å² do 308 Å² pro záporný mód.[40]

Na obrázku 11 je zobrazen graf závislosti CCS na m/z pro analyzované metabolity, např. cukry, aminokyseliny, nukleosidy a nukleotidy, a je patrné, že každá skupina látek zaujímá jinou oblast hodnot CCS v závislosti na m/z a také se liší směrnici dané přímkou.[40]

**Obr. 11** Korelace m/z a CCS analyzovaných metabolitů (převzato z cit. [40])

Autorům se podařilo vytvořit databázi, která mimo retenčních časů, m/z obsahuje i CCS, což zvyšuje pravděpodobnost správné identifikace metabolitu.[40]

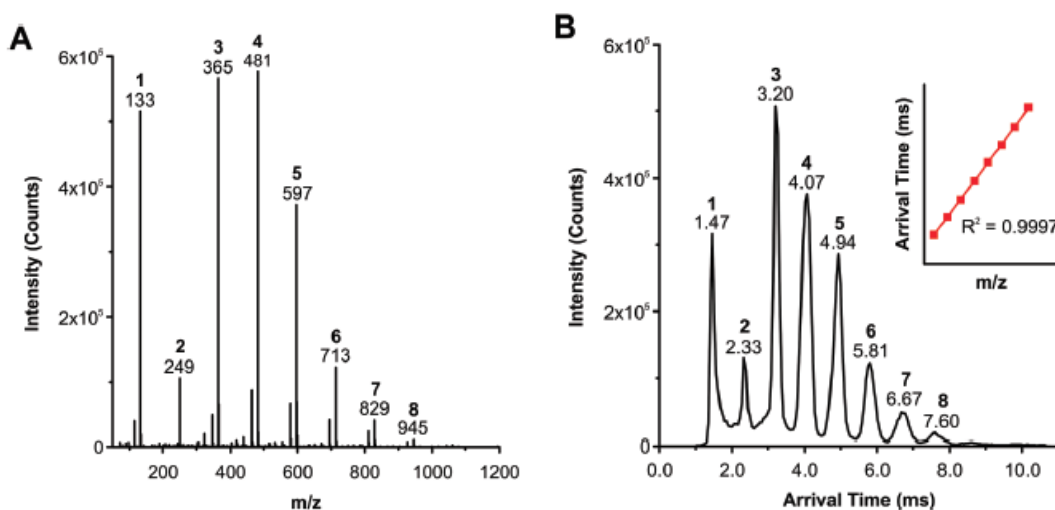
Forsythe a kol. se zabývali použitím dvou kalibrantů v negativním módu – polyalaninem a polyjablečnou kyselinou (Obr. 12). Negativní mód se používá při analýze v metabolomice, při analýze biopolymerů a při analýze životního prostředí, kde jsou analyty relativně kyselé a mohou být deprotonovány.[34]



Obr. 12 Struktury oligomerů kyseliny polyjablečné a DL-polyalaninu

Polyalanin je vhodným kalibrantem, jelikož poskytuje dostatek kalibračních bodů ($n = 3-14$ pro jednu nabitou částici), je odolný vůči hydrolyze, je levný a stabilní. Polyjablečná kyselina se dosud jako kalibrant velmi nepoužívala, poprvé byla použita Forsythem a kol. Možnou nevýhodou použití polyjablečné kyseliny jako kalibrantu je její náročnější příprava. Monomer L-jablečné kyseliny musí být zahříván 24 hodin při teplotě 85°C za účelem odstranění vody a tvorby esterové vazby.[34]

Kyselina polyjablečná má lineární závislost mezi hmotností a nábojem, její monomer je levný, snadno se polymeruje a je velmi dobře rozpustný ve vodě. Na obrázku 13 A je zobrazeno hmotnostní spektrum a na obrázku 13 B mobilogram kyseliny polyjablečné při rychlosti vlny 650 m/s a výšce 40 V.[34]



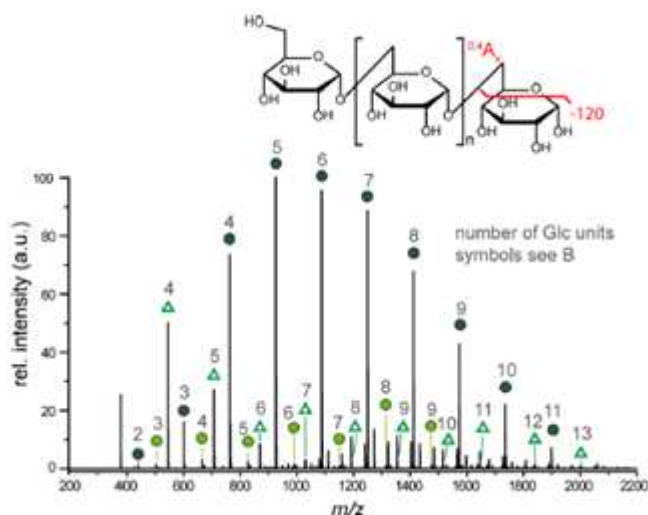
Obr. 13 Hmotnostní spektrum a mobilogram kyseliny polyjablečné (převzato z cit.[34])

Polyalanin poskytuje pro ion $[M-H]^-$ hodnoty CCS od 150,8 pro m/z 230,11 \AA^2 do 308 \AA^2 pro m/z 1011,52. Pro ion $[M-H]^-$ polyjablečné kyseliny jsou hodnoty CCS od 113,9 \AA^2 do 260,9 \AA^2 (m/z od 133,01 do 945,08). Všechny předešlé hodnoty se vztahovaly k dusíku jako driftovému plynu.[34]

Oba dva kalibranty jsou vhodné pro kalibraci řady látek, mohou být elektrosprejovány přímo z vody, ochotně poskytují $[M-H]^-$, pokrývají významnou část m/z a v neposlední řadě i rozsah CCS pro malé molekuly. Výhodou polyalaninu je větší stabilita vůči hydrolyze a širší kalibrační rozsah než v případě polyjablečné kyseliny, z tohoto důvodu je vhodnějším kalibrantem pro dlouhodobé a rozsáhlé studie např. v proteomice nebo metabolomice. Oproti tomu polyjablečná kyselina je vhodná pro analýzu záporně nabitých analytů pod 1 kDa a přítomnost vodíkových vazeb naznačuje vhodnost pro kalibraci kyselých nebo polárních sloučenin. Pro kalibraci v negativním módu mohou být také použity dextran, polystyren nebo fosfátové klastry. Dextran je vhodným kalibrantem pro oligosacharidy.[34]

Hofmann a kol. se zabývali dextranem jako kalibrantem pro záporně nabitě ionty, v tomto případě N-glykany. Autoři nejprve zjistili absolutní hodnoty CCS kalibrantu pomocí Synaptu G1 HDMS obsahující driftovou trubici a helium resp. dusík, jako driftový plyn. K ionizaci se použilo nanoESI a vzorky byly měřeny při osmi různých driftových potenciálech (50, 55, 60, 70, 80, 100, 125 a 150 V). K výpočtu CCS byla použita Mason-Schampova rovnice.[41]

Experimentální hodnoty CCS se také získaly měřením na Synaptu G2-S HDMS s iotovou mobilitou využívající putující vlnu při kalibraci na hodnoty změřené pomocí driftové trubice. Podmínky měření byly nastaveny takto: teplota zdroje 60 °C, výška vlny 40 V, rychlost vlny 500; 550; 600; 650 a 700 m/s, driftovým plynem byl dusík. MS spektra dextranu jsou snadno interpretovatelná a v případě negativního módu jsou dominantními signály fosfátové adukty, v případě pozitivního módu jsou to adukty se sodíkem. Dextran pokrývá rozsah CCS od 174 \AA^2 do 429 \AA^2 pro dusík jako driftový plyn. Na obrázku 14 je zobrazeno hmotnostní spektrum dextranu, kde tmavě zelená kolečka zobrazují fosfátové adukty, světle zelená kolečka jsou deprotonované částice a trojúhelníčky představují fragmentové ionty. Autoři v závěru shrnují, že TWIM/MS lze použít k zjištění CCS N-glykanů a jejich fragmentů, a potvrzují, že dextran je vhodným kalibrantem pro zjištění CCS negativních iontů.[41]



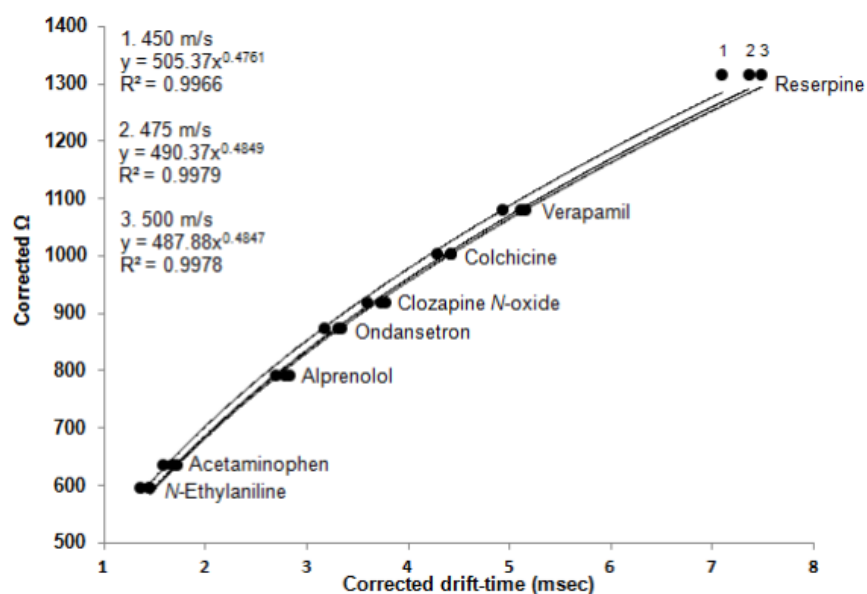
Obr. 14 Hmotnostní spektrum dextransu měřeného na Synaptu G2-S (převzato z cit. [41])

Dalším kalibrantem, který byl využit k získání CCS je směs následujících sloučenin: N-ethylanilin, acetaminofen, alprenolol, ondansetron, clozapin-N-oxid, colchicin, verapamil a reserpin. Tato směs byla použita *Campuzanem a kol.* k měření CCS dvou diastereoizomerů (dexamethason, betamethason), pokrývá rozsah m/z od 122,1 po 609,3. Absolutní hodnoty CCS potřebné ke kalibraci byly měřeny přístrojem s driftovou trubicí. Kalibrační směs o 1 μM koncentraci (50 % ACN, 0,1 % kyselina mravenčí) byla ionizována elektrosprejem za vzniku $[M+H]^+$ iontů. Analýza probíhala na přístroji Synapt G2 HDMS a měření bylo prováděno při třech rychlostech vlny 500, 475 a 450 m/s s amplitudou 40 V. Hodnoty CCS kalibrační směsi (pro N_2) se pohybují od 124,5 \AA^2 pro N-ethylanilin po 254,3 \AA^2 pro reserpin, relativní standardní směrodatná odchylka byla $\leq 0,6\%$. V tabulce (Tab. III) jsou uvedeny CCS všech složek kalibrační směsi.[42]

Tab. III Hodnoty CCS a m/z pro kalibrační směs látek

Látka	m/z	$\Omega \text{\AA}^2 (\text{N}_2)$	Látka	m/z	$\Omega \text{\AA}^2 (\text{N}_2)$
N-ethylanilin	122,1	124,5	Clozapin-N-oxid	343,2	180,6
Acetaminofen	152,1	130,4	Colchicin	400,2	196,2
Alprenolol	250,2	157,5	Verapamil	455,3	210,0
Ondansetron	294,2	172,7	Reserpin	609,3	254,3

Obrázek 15 ukazuje závislost driftového času korigovaného o dobu letu iontu mezi mobilitní celou a TOF analyzátozem na korigovaných hodnotách CCS. Data byla získána při rychlosti vlny 450 (křivka 1), 475 (křivka 2), 500 m/s (křivka 3) s výškou vlny 40 V.[42]



Obr. 15 Závislost korigovaných CCS na korigovaných driftových časech (převzato z cit. [42][41])

Bush a kol. měřili CCS 113 peptidových iontů, jako kalibranty použili polyalanin a polyglycin. K získání hodnot CCS potřebných ke kalibraci byl použit Synapt G1 HDMS, který obsahoval driftovou trubici. Samotné měření probíhalo na Synaptu G2 HDMS, ionty byly generovány nanoelektrosprejem. CCS peptidů byla měřena při různých rychlostech a výškách vlny (viz Tab. IV).[43]

Tab. IV Podmínky měření – výška a rychlost vlny

Výška vlny [V]	Rychlost vlny [m/s]
40	1200, 1000, 800, 600, 500, 400
35	1000, 800, 600, 500, 400, 350
30	800, 600, 500, 400, 350, 300
25	600, 500, 400, 350, 300, 250
20	350, 300, 250, 210

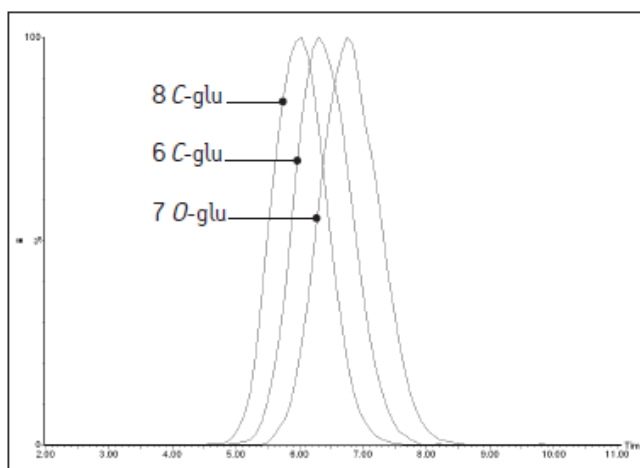
Jak bylo zmíněno dříve, kalibraci je vhodné provádět látkou s podobnými vlastnostmi a při stejných podmínkách, což odstraňuje potřebu znát např. teplotu driftového plynu či tlak.[43]

Campuzano a kol. využili CCS k odlišení strukturních izomerů flavanoidů glykosidu viz Tab. V. Výsledný mobilogram je zobrazen na obrázku 16. Kalibrantem byly jednou nabitě peptidy se známými hodnotami CCS, které lze použít k předpovězení CCS malých molekul.

Podmínky experimentu byly zvoleny takto: sprejovací napětí 1 kV, napětí na vstupním konusu 35 V, driftový plyn He, rychlost vlny 250 m/s a výška vlny od 5 do 6 V.[44]

Tab. V Hodnoty CCS pro glykosidy

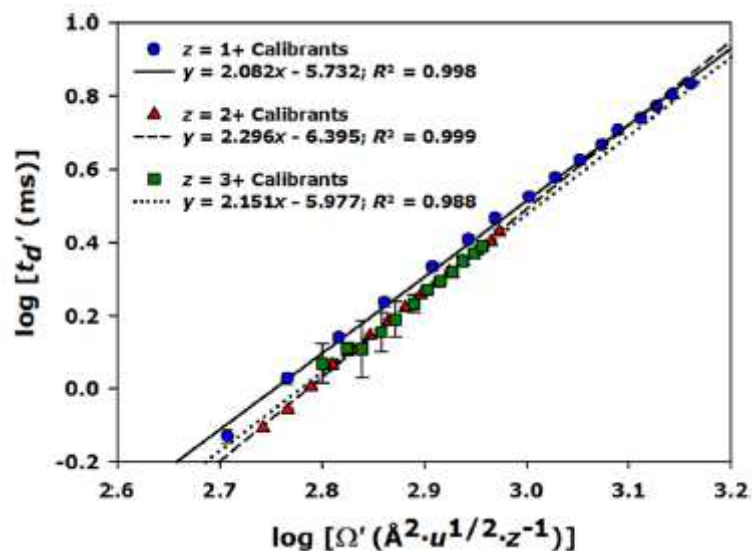
Glukosid flavanoidu	CCS získané pomocí TWIM (\AA^2)
Luteolin 8C-glykosid	129,6
Luteolin 6C-glykosid	132,9
Luteolin 7O-glykosid	136,7



Obř. 16 Mobilitogramy tří glykosidů (převzato z cit. [44])

Gelb a kol. studovali vliv kalibrantu na určení CCS pomocí TWIMS. Kalibrantem by měla být sloučenina podobného složení jako má analyzovaná látka. Dále kalibrace závisí i na náboji kalibrantu, který má vliv na přesnost CCS, jelikož může ovlivnit interakci iontu s driftovým plynem. To je velmi důležité při použití dusíku jako driftového plynu v TWIMS, protože dusík má větší polarizovatelnost než helium, které bývá častěji používáno v DTIM. Použitím plynu s vyšší polarizovatelností lze předpokládat intenzivnější interakce analytu s driftovým plynem, což může způsobit vyšší citlivost měření na náboj analyzovaných látek. Měření bylo prováděno na Synaptu G2-S HDMS s ionizací nanoESI při rychlosti vlny 650 m/s a s výškou vlny 40 V. Výsledná data byla zpracovávána pomocí programů MassLynx a DriftScope. Ke kalibraci byly použity různé látky, nejprve byl použit jednou protonovaný polyalanin s hodnotami CCS naměřenými Clemmerem a kol. (DTIM, He jako driftový plyn). Druhým kalibrantem byl vícenásobně protonovaný polyalanin s CCS získanými Bushem a kol. (DTIM a He jako driftový plyn). Posledním kalibrantem byl adukt sodíku s N-glykany

uvolněnými z thyroglobulinu, jehož CCS fragmentů byly změřeny Pagelem a Harveyem (DTIMS, He driftový plyn). Na obrázku 17 jsou zobrazeny kalibrační křivky jednou, dvakrát a třikrát nabitých oligomerů polyalaninu.[45]



Obr. 17 Kalibrační křivky polyalaninu (převzato z cit. [45])

Stanovení CCS peptidů při použití sacharidů jako kalibrantů a naopak vedlo typicky k chybě 1%, kalibrant s odlišným nábojem od analytu vnášel do měření chybu v průměru 3,5%. Oba uvedené vlivy uplatněné současně vedly k chybě v průměru 4,7%. [45]

2.7 MOBICAL

Mobilitu daného iontu lze modelovat na základě znalosti struktury látky a získat tak výpočtem hodnotu CCS. Momentálně se k určení teoretických CCS používá software MOBICAL. Jedná se o volně dostupný software (www.indiana.edu/~nano), který jako vstupní data využívá strukturu látky získanou pomocí rentgenové krystalografie, NMR či kvantově chemického výpočtu.[10], [33]

MOBICAL využívá tři metody k určení CCS: aproximace projekcí (projection approximation, **PA**), rozptyl při srážce pevných částic (hard sphere scattering method, **EHSS**) a metody trajektorie (trajectory method, **TM**), ve kterých je použito helium nebo dusík jako driftový plyn.[10]

Nejjednodušší metodou k určení CCS je PA, která je používána již 80 let. CCS jsou získány zprůměrováním geometrických projekčních ploch všech možných orientací molekuly. Nevýhodou metody je ignorace dálkových interakcí mezi ionty a driftovým plynem. Metoda je vhodná pro předpověď CCS malých molekul (20-100 atomů), protože pro molekuly větší jak 2 kDa vypočítává příliš nízké CCS.[5], [10], [11]

Další metoda EHSS vypočte CCS na základě úhlů rozptylu trajektorie přicházející a odcházející částice. Tento model sice počítá s rozptylem a procesem kolize s driftovým plynem, ale nezohledňuje interakce dalekého dosahu mezi plynem a ionty. Není vhodný pro výpočet CCS malých molekul.[5], [10], [11]

Nejspolehlivější metodou k výpočtu CCS pro velké molekuly je TM, jelikož počítá s interakcemi dalekého dosahu mezi plynem a ionty a kolizními efekty. Nevýhodou je dlouhý čas potřebný k výpočtu. Nedávná zlepšení týkající se TM s použitím dusíku, mohou zlepšit kalibrační závislost CCS, což je užitečné pro TWIMS, kde je dusík typickým driftovým plynem. K porovnání různých měření a výpočtů slouží např. protein data bank (dostupná i online: http://www.indiana.edu/~eclemmer/Research/cross%20section%20database/Proteins/protein_cs.htm).[5], [11]

Nedávno byla představena metoda PSA (projection superposition approximation). Pracuje na stejném principu jako PA, ale počítá navíc se superpozicí atomových potenciálů a zahrnuje i tvarový faktor. [11]

Postup porovnání teoreticky vypočtených hodnot CCS s experimentálně získanými lze shrnout do následujících kroků:

- 1) sestavení seznamu konformerů
- 2) hledání konformeru(ů) s minimální energií (kvantově chemický výpočet)
- 3) výpočet CCS pro vybraný konformer/konformery
- 4) srovnání vypočtené a experimentálně zjištěné hodnoty CCS.

První bodem je tedy sestavení seznamu konformerů, které se provádí tak, že se kvantově chemickými výpočty optimalizuje struktura a hledají se všechny možné konformery (lze využít i systematického hledání/navrhování struktur). Dále se opět pomocí kvantově chemických výpočtů hledají konformery s nejnižší strukturou. Předposledním bodem je vypočtení teoretických CCS softwarem MOBCAL.[5]

Dále jsou uvedeny příklady využití softwaru k analýze. IM/MS se používá ke zkoumání biologických systémů od separace složitých proteomických směsí až po určení konformace velkých makromolekul, proto se *Jurneczko a Barran* rozhodly využít IM/MS pro měření CCS monomerních proteinů. K ionizaci proteinů použily ESI a nanoESI. CCS byly počítány pomocí tří modelů dostupných v MOBCAL. K porovnání s teoreticky získanými CCS použily hodnoty získané rentgenovou krystalografií. Zjistily, že CCS určené metodou PA poskytovaly o 20% nižší hodnoty CCS než zbylé dvě metody. Tento jev je způsoben tím, že PA nepočítá s mnohonásobným rozptylem. Na druhou stranu EHSS poskytovalo hodnoty o něco málo vyšší obzvláště pro malé molekuly ve srovnání s TM.[10]

Druhým příkladem je využití CCS k analýze malých molekul. Důležité je si uvědomit, že i když metoda není vhodná k výpočtu CCS malých molekul, může být k zisku jejich CCS použita. Williams a kol. použili k výpočtu CCS izomerů rutheinových komplexů všechny tři metody. Ukázalo se, že PA a TM jsou v dobré shodě, zatímco EHSS poskytuje daleko vyšší hodnoty. [33]

Naproti tomu Scarff a kol. měřili CCS hemoglobinu, kde podobné výsledky poskytovaly metoda EHSS a TM.[33]

Zatím nelze jednoznačně doporučit některou z výpočetních metod.[33]

2.8 Nové syntetické drogy

Nové syntetické drogy (new designer drugs, NDDs) představují stále rostoucí skupinu zneužívaných látek. Vzhledem ke značné variabilitě struktur mohou selhávat klasické postupy forenzní analýzy a je nutné hledat nové přístupy k prokazování přítomnosti těchto látek, ať již v substancích zachycených na nelegálním trhu nebo v biologickém materiálu. Do skupiny NDDs patří např. syntetické kanabiody, katinony a fenylethylaminy.

Nejběžnější metodou užívanou k analýze a identifikaci je kapalinová chromatografie. K detekci a kvantifikaci katinonů v lidské krvi byla použita metoda LC/MS/MS. Vzorek byl připraven extrakcí kapalina-kapalina pomocí 1-chlorbutanu s 10% isopropanolu a k jeho ionizaci byl použit elektrosprej v pozitivním módu.[46]

Stejnou analytickou metodou byly studovány i syntetické kanabiody ve vzorcích krve. K extrakci byla opět použita L-L extrakce (1-chlorbutan s 10% isopropanolu) s tím rozdílem, že ke vzorku byl ještě přidán pufr. Dále byl vzorek centrifugován, roztok byl odpařen a vzniklý odparek byl rozpuštěn v methanolu.[47]

Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla použita i k identifikaci a charakterizaci drogy 4-MEC, bytulonou, fletedronu, methylonu či methedronu v sypkých práškových vzorcích. K identifikaci drog autoři použili i NMR, FT-IR a LC/TOF.[48]

Jinou možností identifikace syntetických kanabiodů je použití přímé analýzy v reálném čase – DART/MS. Tato technika byla autory použita k analýze NDDs v rostlinných vzorcích (bylinné směsi), k identifikaci nalezených látek byl použit analyzátor doby letu s vyšší rozlišovací schopností.[49]

Dalším materiálem, který může obsahovat NDDs, je moč. K její analýze lze využít spojení kapalinové chromatografie s hybridním hmotnostním spektrometrem QTOF (kvadrupól – analyzátor doby letu). [50]

Novou metodou, kterou lze využít k analýze katinonů, je micelární elektrokinetická chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.[51]

Další analytická metoda, kterou lze využít, je superkritická fluidní chromatografie, kterou autoři použili k analýze katinonů a fenylethylaminů.[52]

Zajímavou možností pro zlepšení identifikace nových syntetických drog může být právě využití iontové mobilní spektrometrie resp. CCS ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje, chemikálie

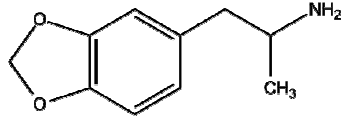
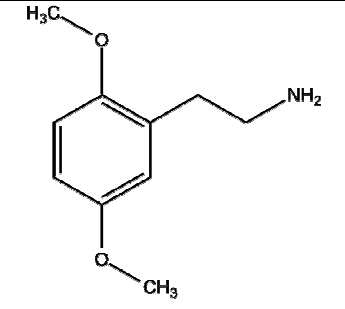
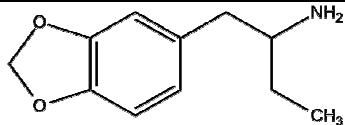
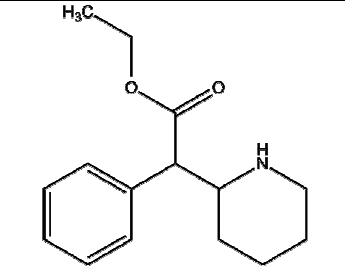
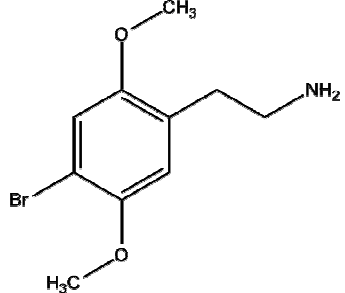
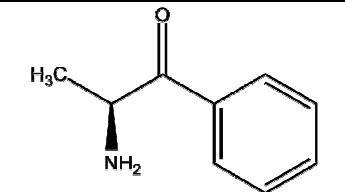
Všechny vzorky nových syntetických drog byly měřeny na přístroji *SYNAPT G2-S* (*Waters, Manchester, UK*) s iontovým zdrojem ESI. Vzorky standardů a kalibrantů se navažovaly na vahách *Mettler Toledo* (*Praha, Česká republika*).

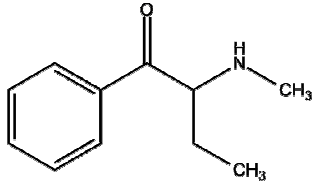
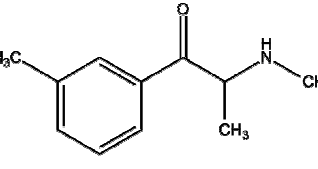
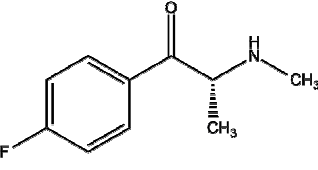
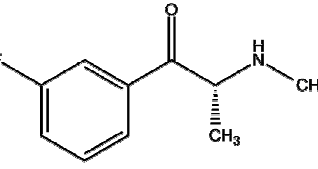
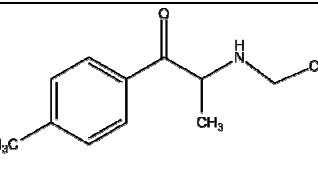
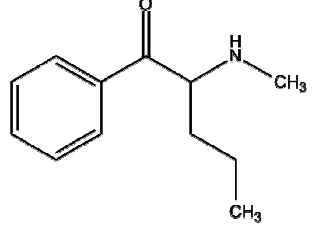
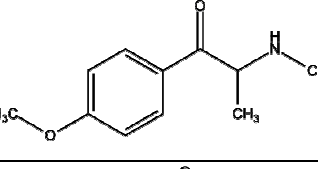
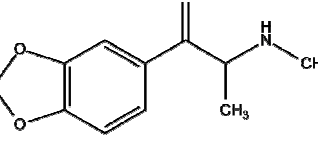
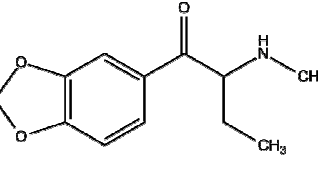
Použité chemikálie: methanol pro HPLC (*VWR International S.A.S., Francie*), acetonitril HPLC grade (*VWR International S.A.S., Francie*), kyselina mravenčí $\geq 95\%$ (*Sigma Aldrich, Praha, ČR*), voda (*upravená na přístroji Milli-Q Reference, MA, Bedford, USA*).

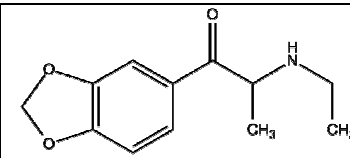
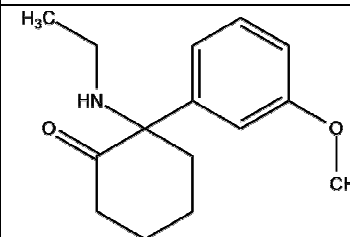
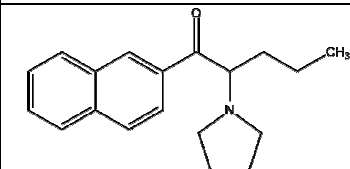
K analýze se použilo 18 standardů nových syntetických drog (Tab. VI), které byly obdrženy od společností *Lipomed AG (Arlesheim, Switzerland)* a *Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA)*. Pentedron, MEX a EPH byly poskytnuty Celní správou ČR.

Pro určení CCS byly jako kalibrační standardy využity DL-polyalanin (*Sigma Aldrich, Praha, ČR*) a směs látek: N-ethylanilin 98% (*Sigma Aldrich*), Acetaminofen min. 99,0% (*Sigma Aldrich*), Alprenolol hydrochlorid (*Council of Europe*), Ondansetron (*Sigma Aldrich*), Clozapin-N-oxid (*Sigma Aldrich*), Colchicin $\geq 95\%$ HPLC (*Sigma Aldrich*), Verapamil hydrochlorid $\geq 99\%$ (*Sigma Aldrich*) a Reserpin $\geq 99\%$ HPLC (*Fluka Analytical – Sigma Aldrich*).

Tab. VI Seznam měřených nových syntetických drog

Molekulová hmotnost [g/mol] Sumární vzorec	Zkratka	Triviální název	Systematický název	Struktura
179,220 C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	MDA	3,4-methylen-dioxyamfetamin	(R) 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)propan-2-amin	
181,232 C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	2-CH	-	2,5-dimethoxyfenethylamin	
193,242 C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	BDB	1,3-Benzodioxolylbutanamin	1-(1,3-benzodioxol-5-yl)butan-2-amin	
247,333 C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	EPH	Ethylfenidát	(RS)-ethyl 2-fenyl-2-piperidin-2-yl-acetát	
260,130 C ₁₀ H ₁₄ NO ₂ Br	2-CB	-	2-(4-bromo-2,5-dimethoxyfenyl)ethanamin	
149,190 C ₉ H ₁₁ NO	CAT	Katinon	(S)-2-amino-1-fenyl-1-propanon	

177,242 C ₁₁ H ₁₅ NO	MABP	Buphedron	2-(methylamino)-1-phenylbutan-1-on	
177,242 C ₁₁ H ₁₅ NO	3-MMC	3 – Methyl - methkatinon	2-(methylamino)-1-(3-methylphenyl)-1-propanon	
181,206 C ₁₀ H ₁₂ FNO	4-FMC	Flefedron	(<i>RS</i>)-1-(4-fluorofenyl)-2-methylaminopropan-1-on	
181,206 C ₁₀ H ₁₂ FNO	3-FMC	3 – Fluoro - methkatinon	(<i>RS</i>)-1-(3-fluorofenyl)-2-methylaminopropan-1-on	
191,270 C ₁₂ H ₁₇ NO	4-MEC	4-Methyl-ethylkatinon	(<i>RS</i>)-2-ethylamino-1-(4-methylphenyl)propan-1-on	
191,269 C ₁₂ H ₁₇ NO	-	Pentedron	(±)-1-fenyl-2-(methylamino) pentan-1-on	
193,242 C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	PMMC	Methedron	(<i>RS</i>)-1-(4-methoxyfenyl)-2-(methylamino)propan-1-on	
207,230 C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	bk-MDMA	Methylon	(±)-2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyfenyl)propan-1-on	
221,252 C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	bk-MBDB	Butylon	1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-on	

221,252 C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	MDEC	Ethylon	(<i>RS</i>)-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(ethylamino)propan-1-on	
247,330 C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	MXE	Methoxetamin	(<i>RS</i>)-2-(3-methoxyfenyl)-2-(ethylamino)cyclohexan-on	
281,391 C ₁₉ H ₂₃ NO	NRG-1	Nafyron	(<i>RS</i>)-1-naftalen-2-yl-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-on	

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Analýzy na Synaptu G2-S

Roztoky standardů nových syntetických drog o koncentraci 1 µg/ml byly dávkovány do iontového zdroje přímou infuzí s průtokem 10 µl/min. Jako iontový zdroj sloužil elektrosprej. Analýza probíhala při následujícím nastavení (není-li uvedeno jinak): rychlost vlny **700 m/s**, výška vlny **40 V**, rozsah m/z od **50** do **1200 Da**, napětí na kapiláře **1,25 kV**, teplota zdroje **100 °C**, napětí na vzorkovacím konusu **30 V**, offset zdroje **80 V**, teplota desolvatace **400 °C**.

3.2.2 Příprava roztoků nových syntetických drog

Zásobní roztoky všech standardů (c = 1 mg/ml) se připravily rozpuštěním navážky v odpovídajícím objemu roztoku CH₃OH:H₂O (50:50, v/v). Postupným ředěním byly následně připraveny *pracovní roztoky* o koncentraci 1 µg/ml.

3.2.3 Příprava kalibrantů

Nejprve se připravil *zásobní roztok* polyalaninu o koncentraci 1 mg/ml ve směsi H₂O:ACN (1:1, v/v). Poté bylo připraveno 10 ml *pracovního roztoku* (2 µg/ml), který

obsahoval 20 μl zásobního roztoku polyalaninu, 1 μl 0,1 % HCOOH , odměrná baňka se nakonec doplnila po rysku směsí $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (1:1, v/v).

Druhý kalibrant – směs látek se připravoval obdobným způsobem. Prvně byly připraveny *zásobní roztoky* ($c = 1 \text{ mg/ml}$) všech šesti látek (acetaminophen, alprenolol, N-ethylanilin, clozapin-N-oxid, colchicin, ondansetron, reserpin a verapamil). Z nich se připravil *pracovní roztok* o výsledné koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ obsahující zmíněné látky.

3.2.4 Průběh měření

Měření jednotlivých nových syntetických drog a kalibrantu (polyalanin nebo směs 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 kalibrant (II). Označení I a II značí pořadí měření, nikoli konkrétní kalibrační směs.

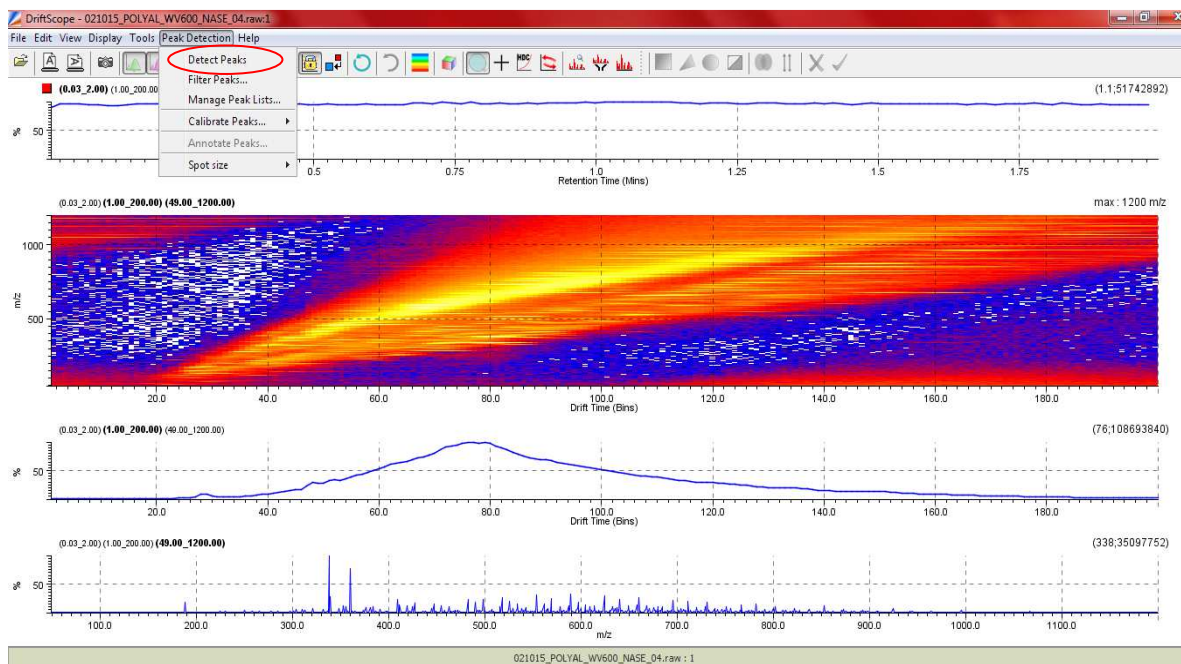
3.2.5 Zpracovávání dat v programu DriftScope

Před samotným zpracováváním naměřených dat v programu DriftScope je nutné nastavit v počítači jako výchozí jazyk angličtinu. Nastavení se provádí přes ovládací panely, kde v *Oblast a jazyk – formáty, klávesnice a jazyky*, nastavíme ANGLIČTINA (Spojené království).

DriftScope je součástí softwaru MassLynx. Po otevření DriftScopu načteme změřená data kliknutím na *File – Open data file*, kde si nejprve otevřeme kalibrant a provedeme detekci přítomných píků, kterým je přiřazena kalibrační hodnota CCS. Následně jsou zpracována data analyzovaných látek.

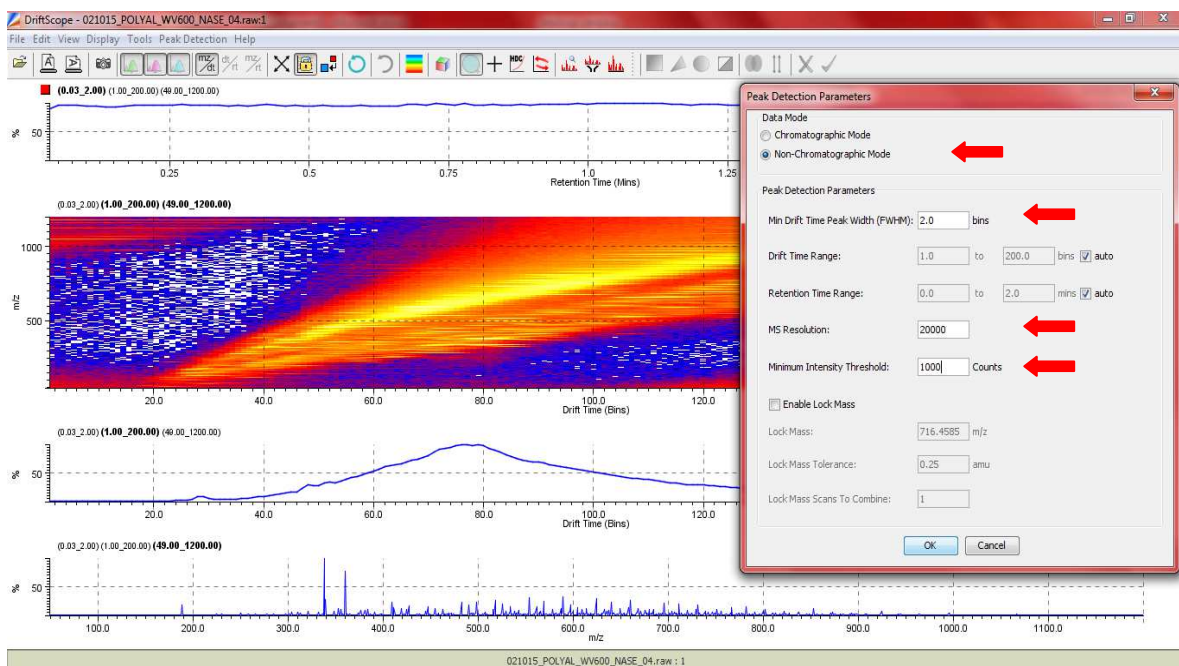
V následujících obrázcích bude přehledně zobrazen postup kalibrace a její následná aplikace na drogy.

Vytváření kalibrace začíná otevřením souboru kalibrantu, po jeho otevření detekujeme píky. Detekce se provádí přes *Peak Detection* \rightarrow *Detect Peaks* (Obr. 18), kde se po zvolení zobrazí tabulka s detekčními parametry.



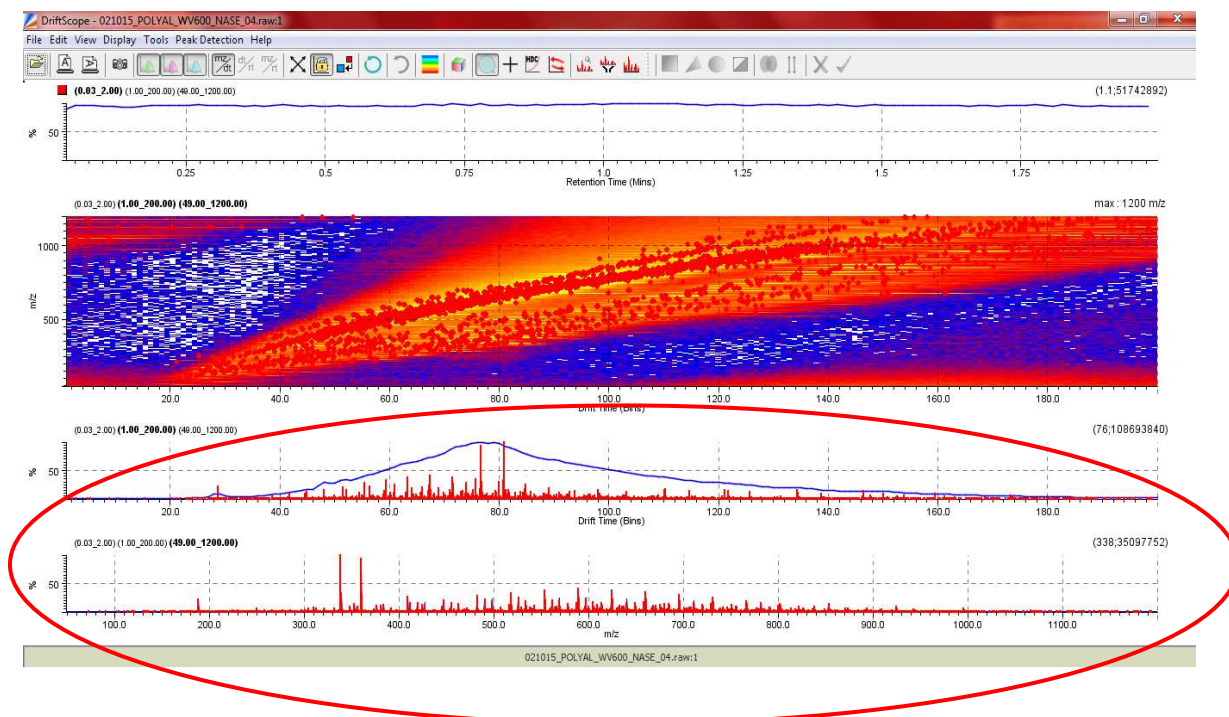
Obr. 18 Detekce píkú

Na obrázku 19 jsou znázorněny parametry, které jsou měněny. V této práci je prováděna nechromatografická detekce, z toho důvodu ji vybereme. Dále kontrolujeme minimální šířku mobilního píku, MS rozlišení a minimální intenzitu (práh).



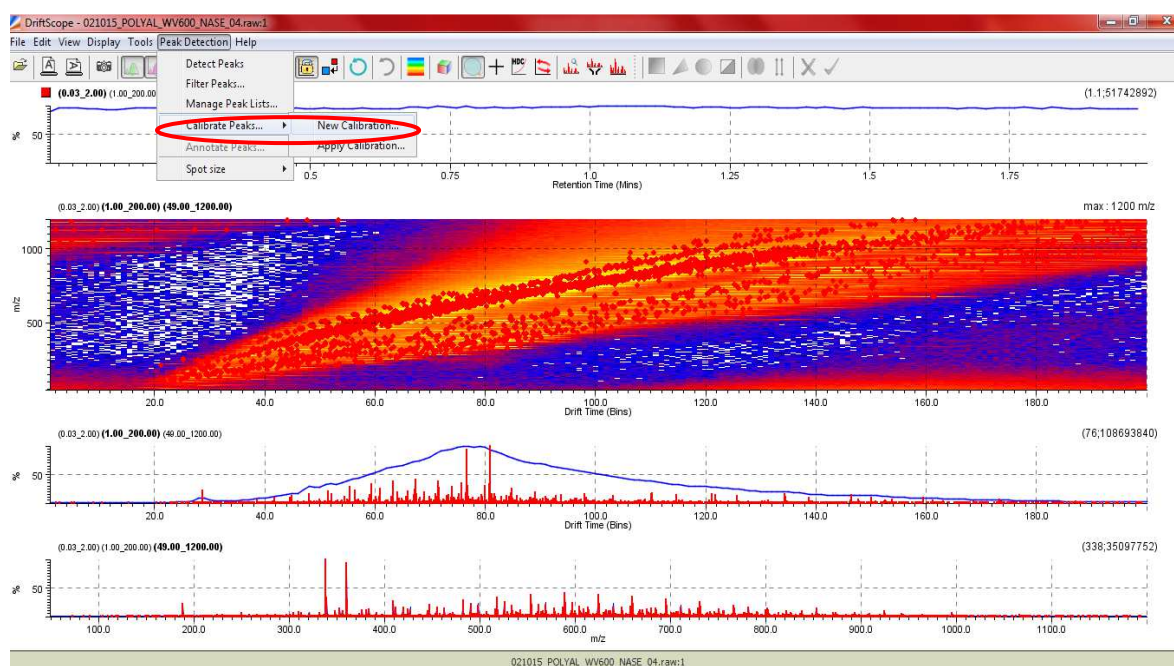
Obr. 19 Změna detekčních parametrů

Po odsouhlasení parametrů probíhá detekce píků, příklad detekovaných píků kalibrantu je na obrázku 20.



Obr. 20 Detekované píky v kalibrantu

Dalším krokem je otevření záložky *Peak Detection*, kde zvolíme *Calibrate Peaks* -> *New Calibration* (Obr. 21).



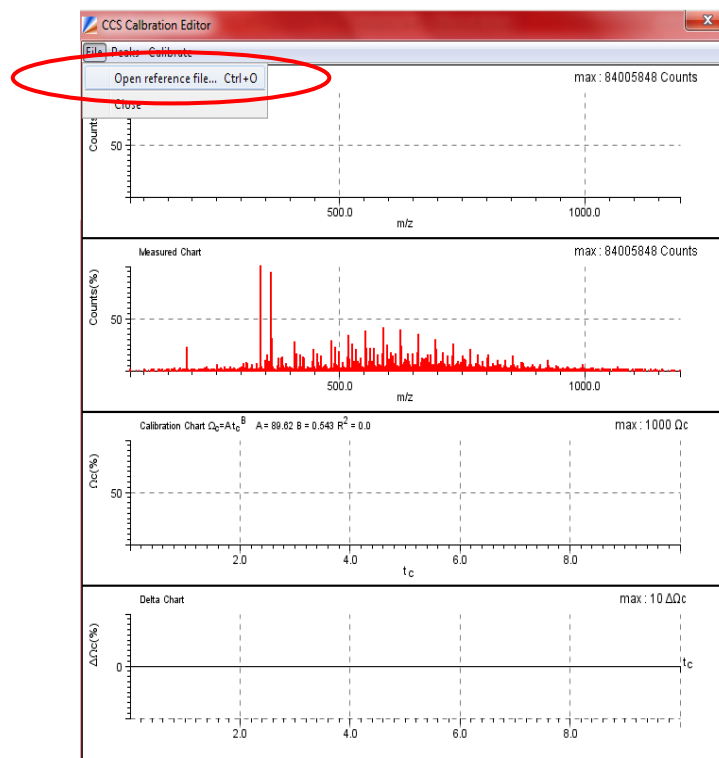
Obr. 21 Kalibrace píků

Otevře se CCS Calibration Editor, kde probíhá samotná kalibrace. Před kalibrací by měl být ještě vytvořen csv soubor, který obsahuje tři sloupce (m/z jednotlivých jednotek polyalaninu, jejich teoretická hodnota CCS a náboj). Přesné hodnoty a způsob jejich získání je popsán v kapitole 4.1. Soubor se ukládá do složky cal, do které je přístup přes C:\DriftScope\docs\cal. Příklad csv souboru, se kterým jsme prováděli kalibrace, najdete na obrázku 22.

CCS (Lit.)	m/z	z
150	232.13	1
165	303.167	1
179	374.204	1
195	445.241	1
209	516.278	1
223	587.315	1
238	658.352	1
253	729.39	1
267	800.427	1
279	871.464	1
294	942.501	1
307	1013.54	1
320	1084.58	1
333	1155.61	1
345	1226.65	1
357	1297.69	1
369	1368.72	1
381	1439.8	1
393	1510.8	1
405	1581.9	1
417	1652.9	1
429	1723.9	1
440	1795	1
452	1866	1
464	1937.1	1

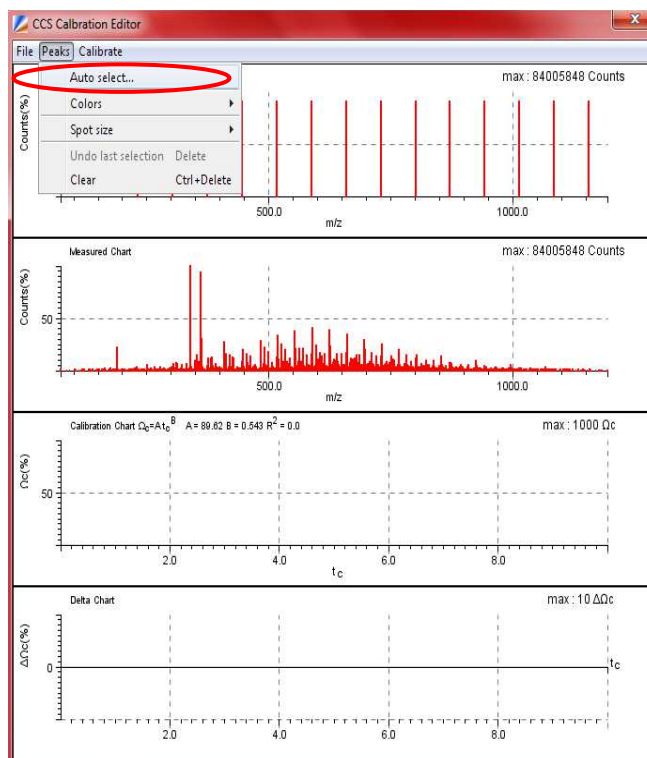
Obr. 22 Csv soubor – polyalanin

V CCS kalibračním editoru zvolíme, *File – Open reference file* a vybereme csv soubor, který odpovídá danému kalibrantu (Obr. 23).

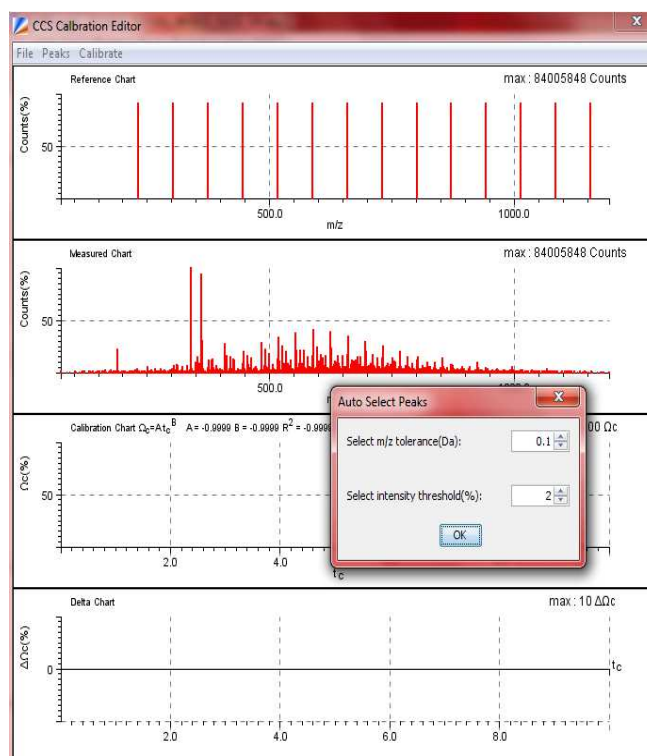


Obr. 23 Otvírání referenčního souboru

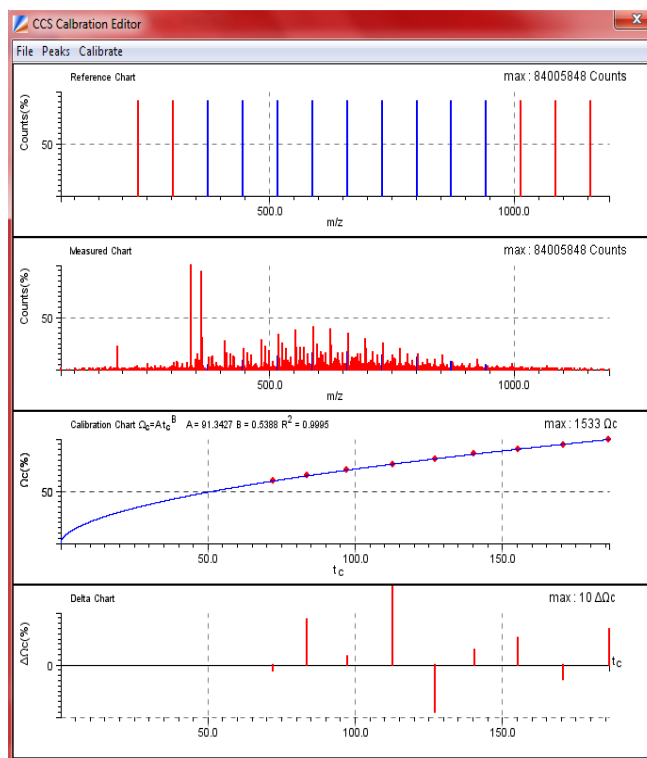
Po otevření se zobrazí píky, které odpovídají referenčním hodnotám (červené píky). Jako další krok klikneme na *Peaks – Auto select* a zvolíme si požadovaný práh intenzity (v našem případě byl volen práh 2). Barva vybraných píků se mění z červené na modrou. V dalších rámečcích se objeví kalibrační křivka s hodnotou koeficientu determinace, která by měla být vyšší jak 0,99 ($R^2 > 0,99$) a chybové úsečky (Obr. 24, Obr. 25 a Obr. 26).



Obr. 24 Automatické vybrání píků

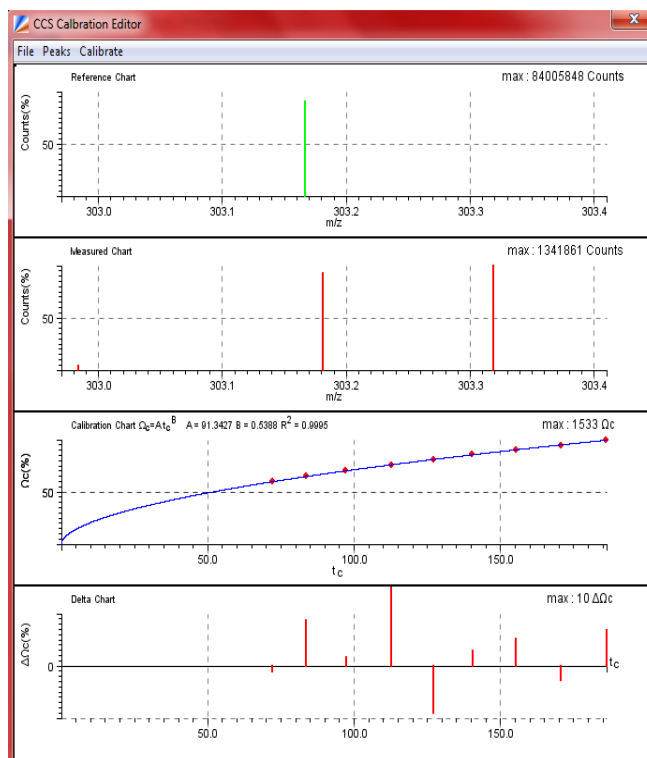


Obr. 25 Automatické vybrání píků – volba prahu

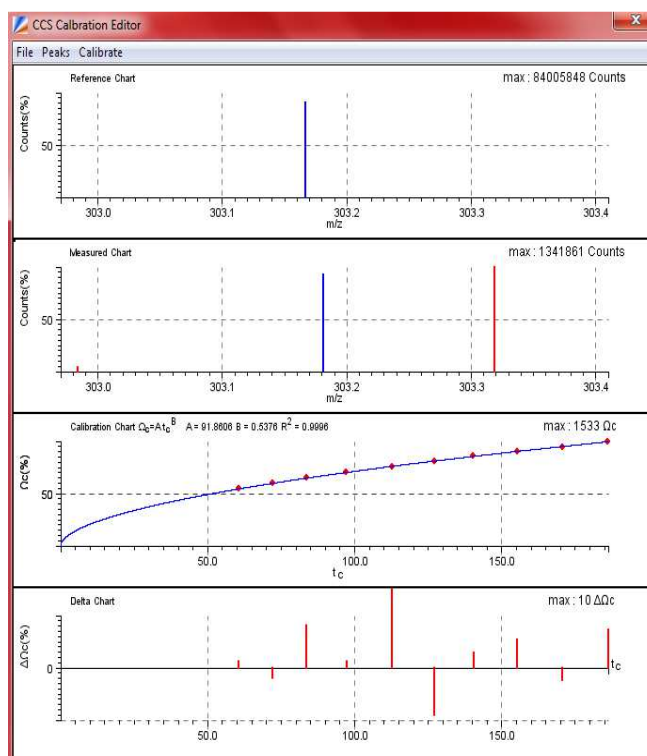


Obr. 26 Automatické vybrání píků – výsledná kalibrace

Jak lze vidět na obrázku 27, píky, které nebyly vybrány např. z důvodu nízké intenzity, lze dodatečně přidat. Přidání se provádí kliknutím na pík, který má být přidán, v okně s názvem *Counts (%) Reference Chart*, vybraný pík zezelená. Poté v okně *Counts (%) Measured Chart* kliknutím na odpovídající pík provedeme jeho přidání do kalibrační řady (oba píky zmodrají => jsou součástí kalibrační řady). Jestliže námi zvolený pík není vhodný do kalibrační řady (klesne R^2), provedeme jeho odstranění pomocí tlačítka *Delete*. Postup je znázorněn na obrázku 27 a 28. Po přidání došlo k nárůstu R^2 z hodnoty 0,9995 na hodnotu 0,9997. Další možností ke zlepšení špatné hodnoty R^2 může být změna prahové intenzity.



Obr. 27 Přidání píků 1

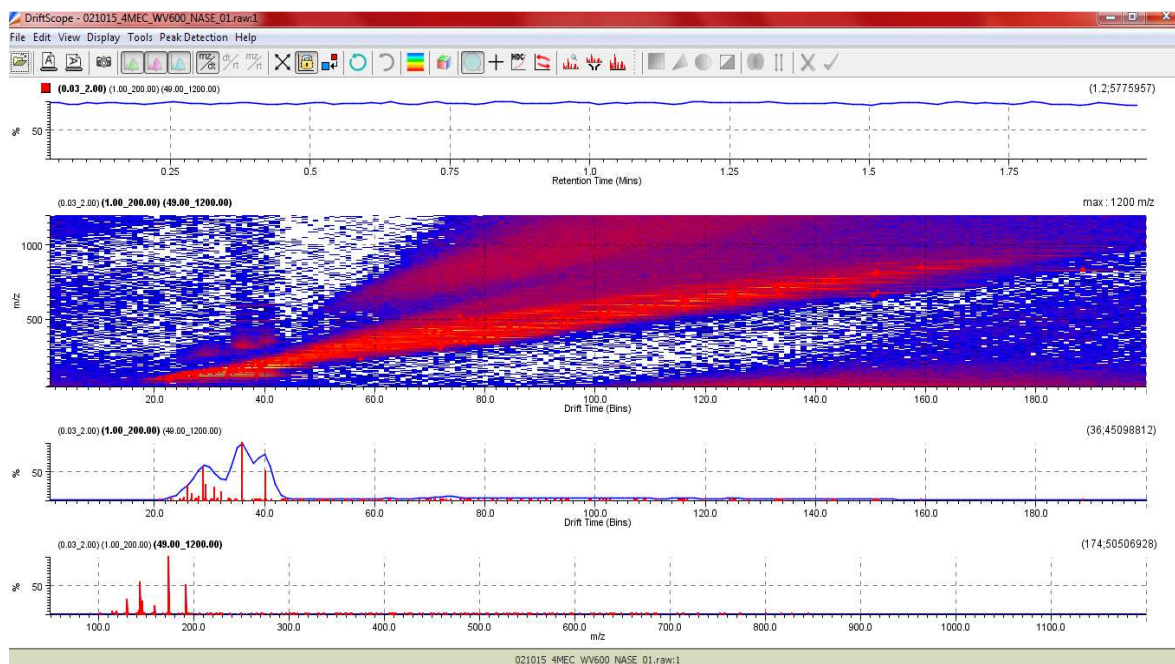


Obr. 28 Přidání píků 2

Posledním krokem k provedení správné kalibrace je její uložení vybráním záložky *Calibrate – Save Calibration*.

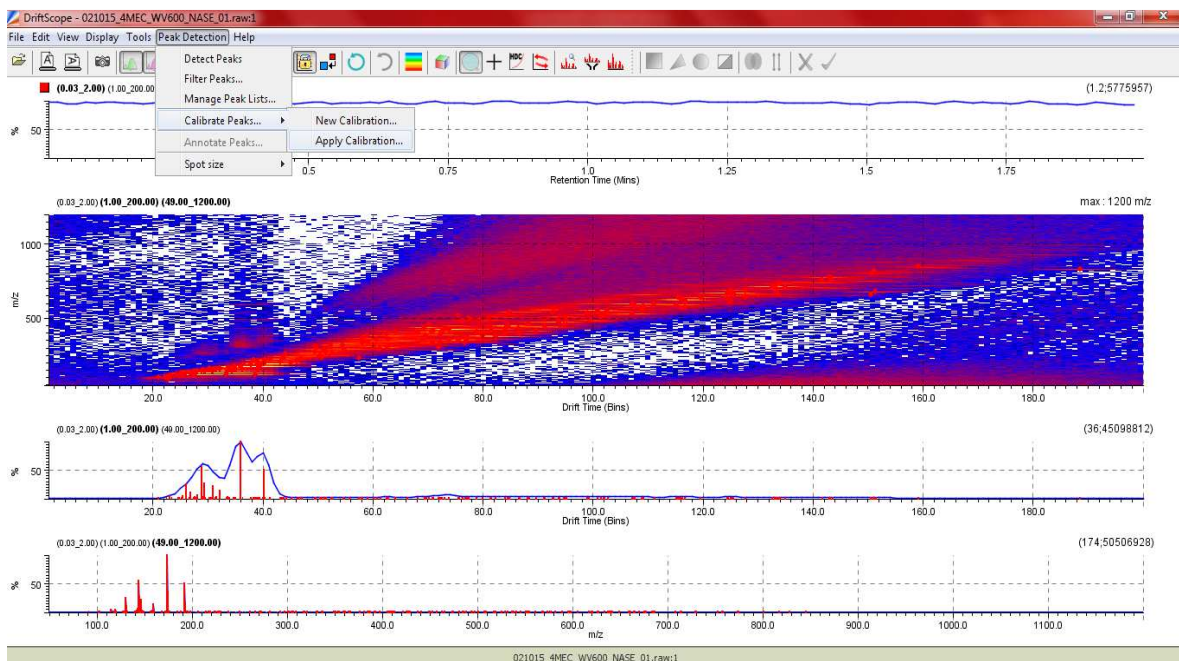
Pro každou měřenou drogu byly vytvořeny dvě kalibrace, a to pomocí kalibrantu I a kalibrantu II. Takto vytvořené kalibrace se použily k získu hodnot CCS pro všechna opakování měření dané drogy.

K aplikaci kalibrace je nutno otevřít data měřené drogy. Otevření se provede stejně jako v případě kalibrantu, tedy *File – Open Data File* a také se musí provést detekce píků, viz kalibrant. Na obrázku 29 je zobrazen soubor pro drogu 4-MEC s detekovanými píky.

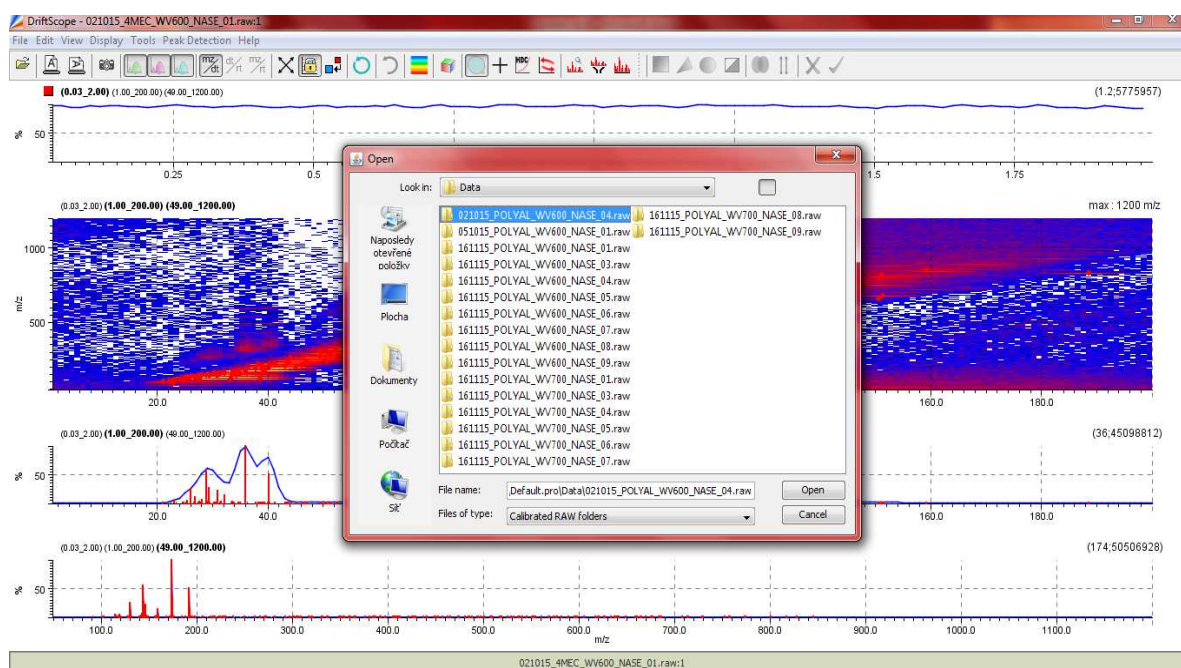


Obr. 29 Detekované píky pro analyt 4-MEC

Abychom mohli aplikovat vytvořenou kalibraci, musíme otevřít záložku *Peak Detection – Calibrate peaks – Apply Calibration* (Obr. 30), kde si zvolíme odpovídající kalibraci (Obr. 31).

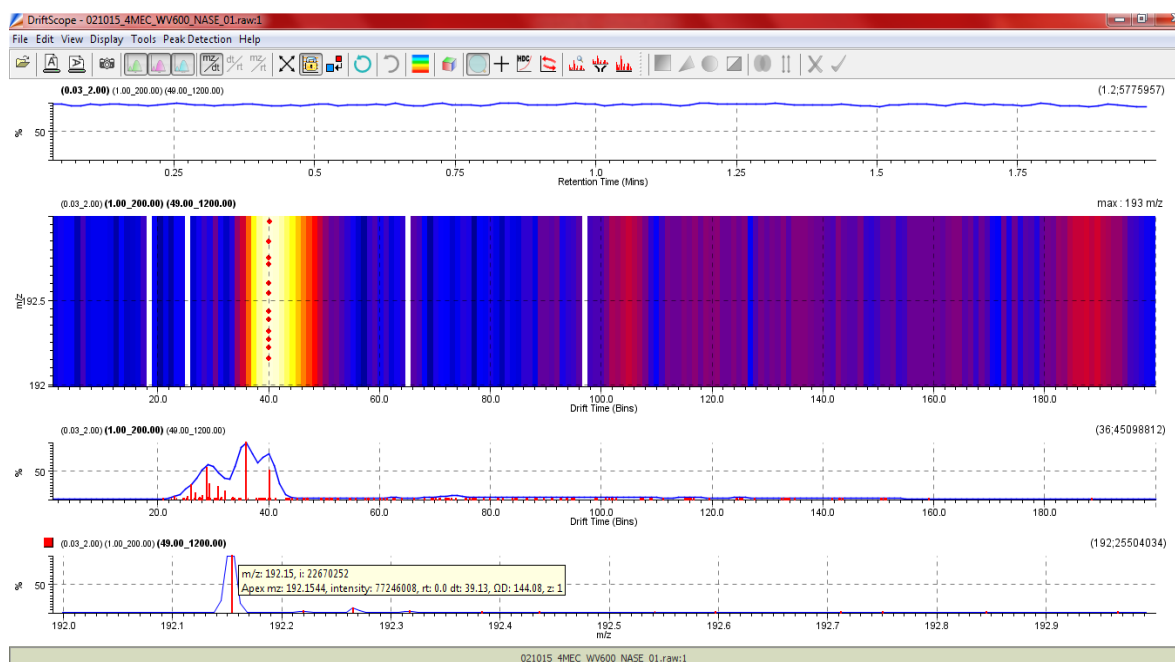


Obr. 30 Aplikace vytvořené kalibrace



Obr. 31 Aplikace vytvořené kalibrace – zvolení odpovídajícího kalibrantu

Úplně posledním krokem k zjištění hodnoty CCS dané drogy kliknutí na její hodnotu m/z při současném přidržení klávesy *Ctrl* (Obr. 32).

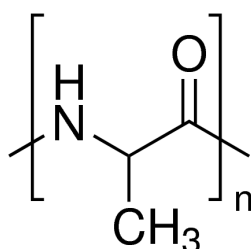


Obr. 32 Zjištění hodnoty CCS

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Polyalanin a volba rychlosti vlny

Prvním kalibrantem, který se použil pro zjištění CCS nových syntetických drog, byl polyalanin. Polyalanin je nejčastěji používaným kalibrantem jak pro pozitivní, tak i pro negativní mód.[34] Poskytuje jednonásobně nabitě oligomery (Obr. 33), které pokrývají rozsah m/z od 231 do 799. Námi použité hodnoty CCS polyalaninu byly získány od firmy Waters, viz Tab. VII.



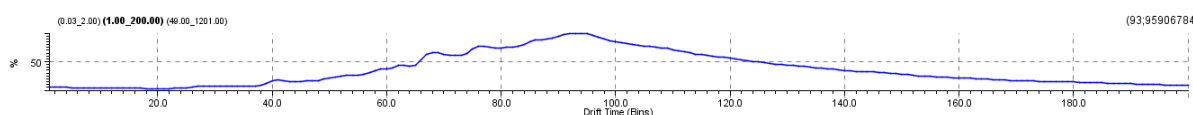
Obr. 33 Řetězec polyalaninu

Tab. VII Hodnoty CCS a příslušné m/z pro polyalanin

CCS Å ²	m/z	CCS Å ²	m/z
150	232,1297	333	1155,612
165	303,1668	345	1226,649
179	374,2039	357	1297,686
195	445,241	369	1368,723
209	516,2782	381	1439,800
223	587,3153	393	1510,800
238	658,3524	405	1581,900
253	729,3895	417	1652,900
267	800,4266	429	1723,900
279	871,4637	440	1795,000
294	942,5008	452	1866,000
307	1013,538	464	1937,100
320	1084,575		

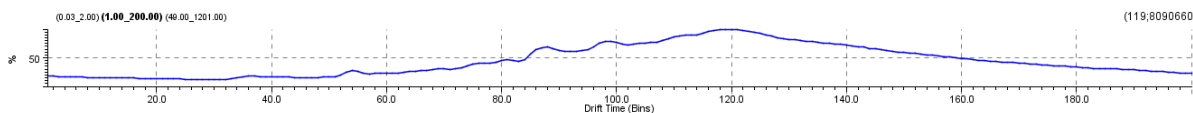
Prvním krokem, je určení rychlosti vlny (wv), a to z toho důvodu, aby se celá obálka polyalaninu (všechny mobilní píky) nacházela v jednom mobilním okně. Při špatně zvolené wv dochází k posunu obálky polyalaninu do druhého mobilního okna, což vede k chybným výsledkům.

Ukázky vlivu různých rychlostí vlny jsou zobrazeny níže. Na obrázku 34 je polyalanin s rychlostí vlny 700 m/s, jedná se o wv , která byla použita při našich experimentech.



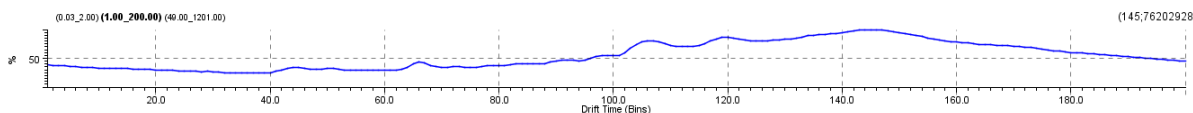
Obr. 34 Polyalanin s rychlostí vlny 700 m/s

Při rychlosti vlny vyšší (900 m/s) je už patrný posun polyalaninu směrem ven z mobilního okna (Obr. 35) a pro určování CCS kalibrací na polyalanin ji tedy nelze použít.



Obr. 35 Polyalanin s rychlostí vlny 900 m/s

Na obrázku 36 je už velmi zřetelné, že obálka polyalaninu je rozdělena do dvou mobilních oken.



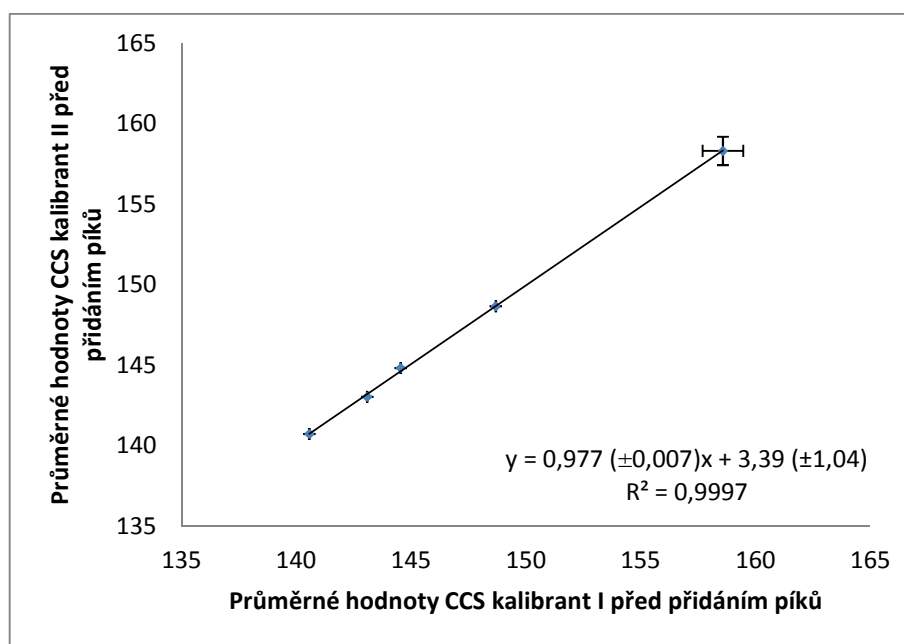
Obr. 36 Polyalanin s rychlostí vlny 1100 m/s

Na základě výše uvedeného probíhalo měření drog a kalibrantů při rychlosti vlny 700 m/s. Při vyhodnocování v programu DriftScope bylo prováděno dvojí vyhodnocování, první před přidáním píků kalibrantu a druhé po jejich přidání. Přidávány byly píky, které program DriftScope z důvodu jejich malé intenzity nevybral automaticky. Byly testovány dva kalibranty polyalanin (kapitola 4.2) a kalibrant směs látek (kapitola 4.3).

4.2 Určování účinného srážkového průřezu nových syntetických drog na kalibrant polyalanin

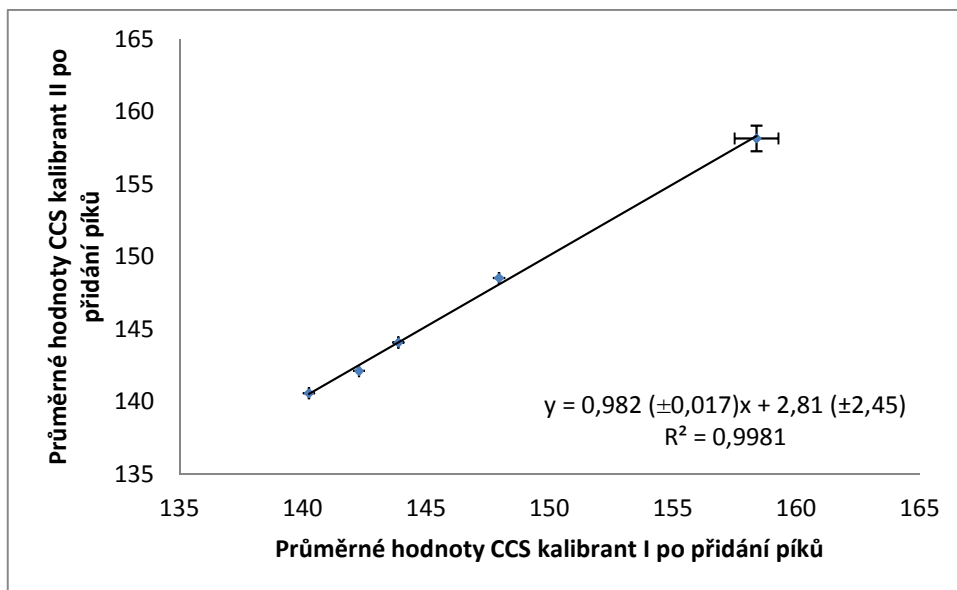
Prvním kalibrantem, pomocí kterého byly zjišťovány hodnoty CCS nových syntetických drog (fenylethylaminy, katinony), byl polyalanin. Průměrné hodnoty CCS z šesti měření před přidáním a po přidání píků pro kalibrant I a II jsou shrnuty v Tab. XII a Tab. XIII (viz přílohy kapitola 8.1), hodnoty jsou uváděny se směrodatnou odchylkou. V grafech 1-8 jsou vyneseny korelace hodnot CCS daných drog zobrazených v tabulkách (Tab. XII a Tab. XIII).

V grafu 1 je zobrazena korelace hodnot CCS fenylethylaminů určených pomocí kalibrantu I a pomocí kalibrantu II, v obou případech před přidáním píků. Lineární závislost je potvrzením, že systém je stabilní a během měření fenylethylaminů nedošlo k žádné změně. Malé chybové úsečky značí dobrou opakovatelnost měření.



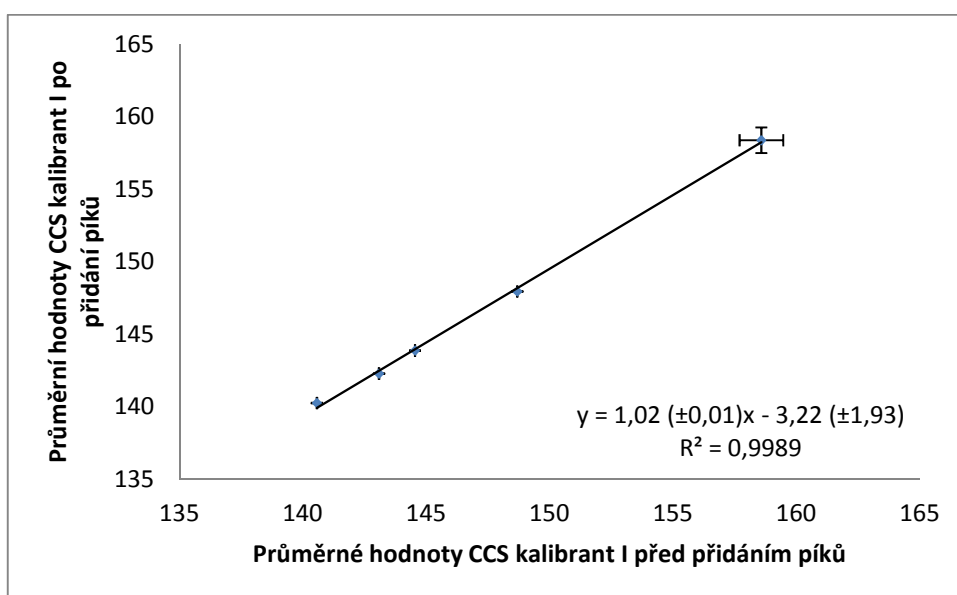
Graf 1 Průměrné hodnoty CCS fenylethylaminů pro kalibrant I a II před přidáním píků

Jak bylo zmíněno dříve, píky kalibrantu se přidávají ručně z důvodu jejich malých intenzit. V grafu 2 je zobrazena korelace hodnot CCS fenylethylaminů po jejich přidání. Opět vidíme lineární závislost s vysokou hodnotou spolehlivosti (0,9981) a malými chybovými úsečkami.

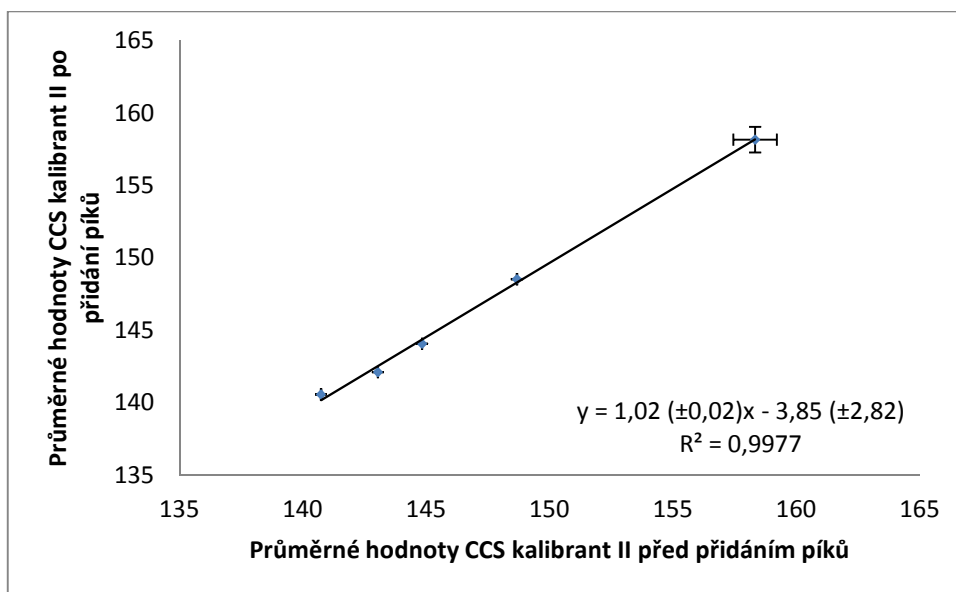


Graf 2 Průměrné hodnoty CCS fenylethylaminů pro kalibrant I a II po přidání píků

V grafu 3 a grafu 4 je zobrazena korelace hodnot CCS fenylethylaminů pro kalibrant I resp. kalibrant II před a po přidání píků. V obou případech je patrné, že přidání či nepřidání píků významně neovlivňuje linearitu kalibrační závislosti. Mezi kalibrací pomocí kalibrantu I a pomocí kalibrantu II je rozdíl patrný z úseku na ose. Hodnoty CCS se pak budou lišit o systematický posun.

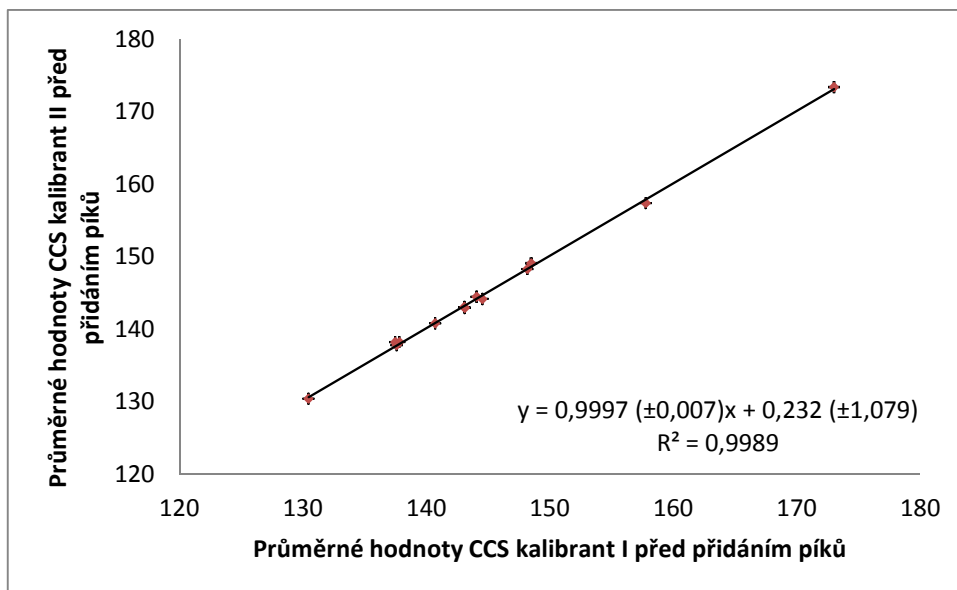


Graf 3 Korelace průměrných hodnot CCS pro fenylethylaminy pro kalibrant I před a po přidání píků

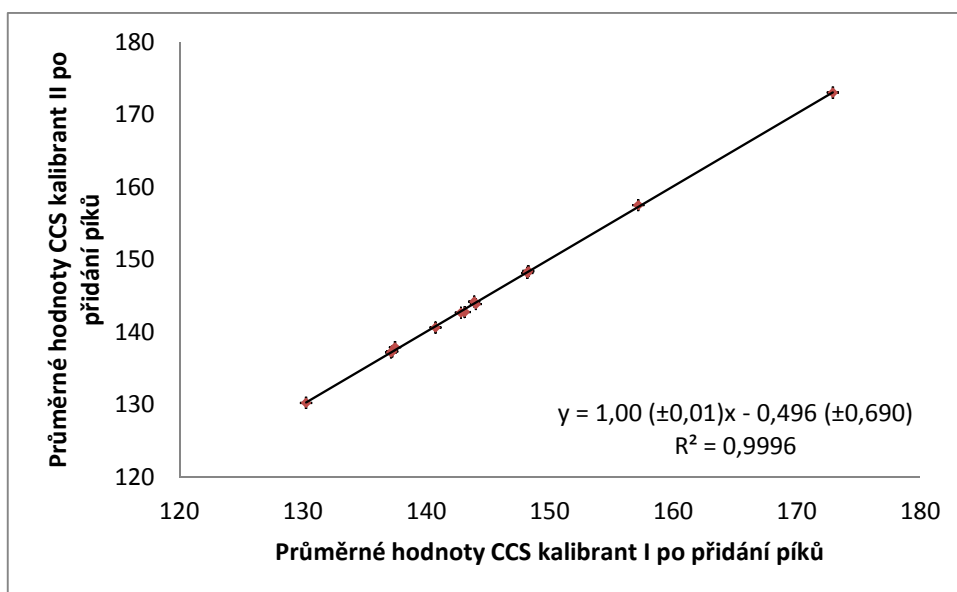


Graf 4 Korelace průměrných hodnot CCS pro fenylethylaminy pro kalibrant II před a po přidání píků

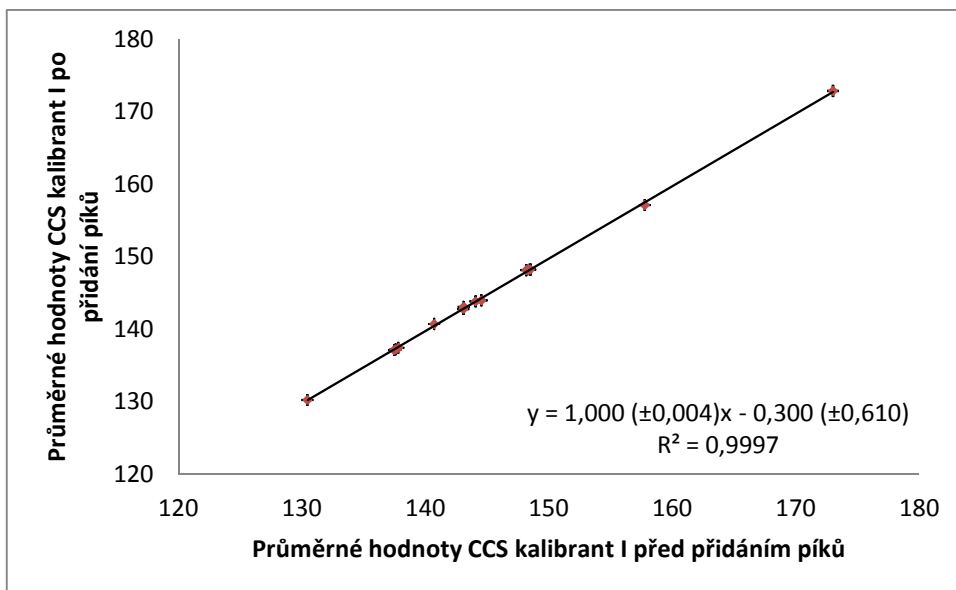
Na následujících grafech (Graf 5-Graf 8) jsou zobrazeny analogické korelace hodnot CCS pro katinony. Opět zde vidíme, že kalibrační závislost je lineární s vysokou hodnotou spolehlivosti a malými chybovými úsečkami. Oproti fenylethylaminům jsou úseky na ose menší a použití jednoho nebo druhého kalibrantu bude dávat menší rozdíl hodnot CCS. V případě fenylethylaminů se směrnice liší od jedné v jednotkách procent, což dále přispívá k rozdílu hodnot získaných kalibrantem I resp. II. Ve výsledku lze očekávat rozdíly v CCS v jednotkách procent, což je však přijatelná chyba jejich měření. Pro katinony byly zjištěny směrnice prakticky rovné jedné.



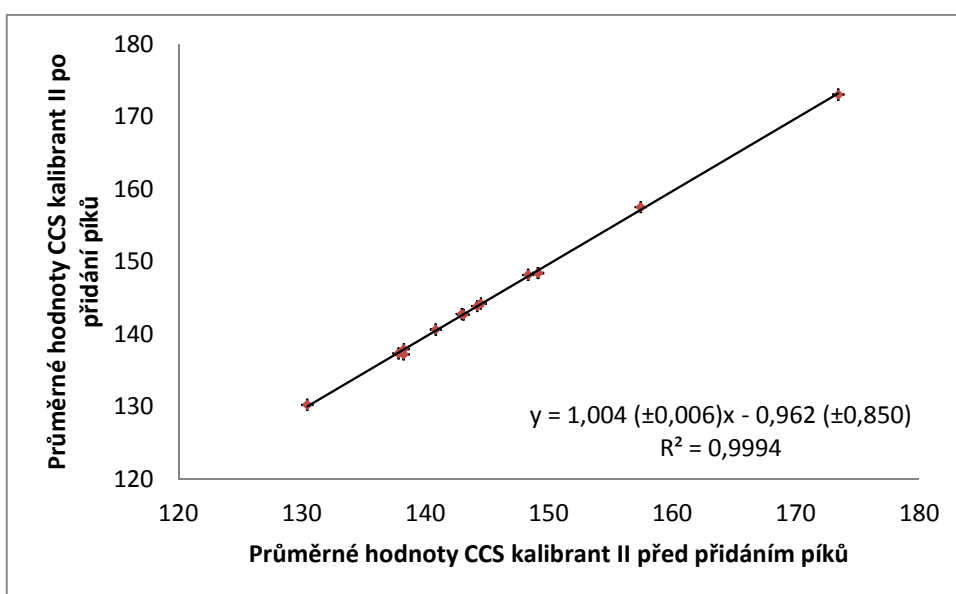
Graf 5 Průměrné hodnoty CCS kationů pro kalibrant I a II před přidáním píků



Graf 6 Průměrné hodnoty CCS kationů pro kalibrant I a II po přidání píků



Graf 7 Korelace průměrných hodnot CCS pro katinony pro kalibrant I před a po přidání píků

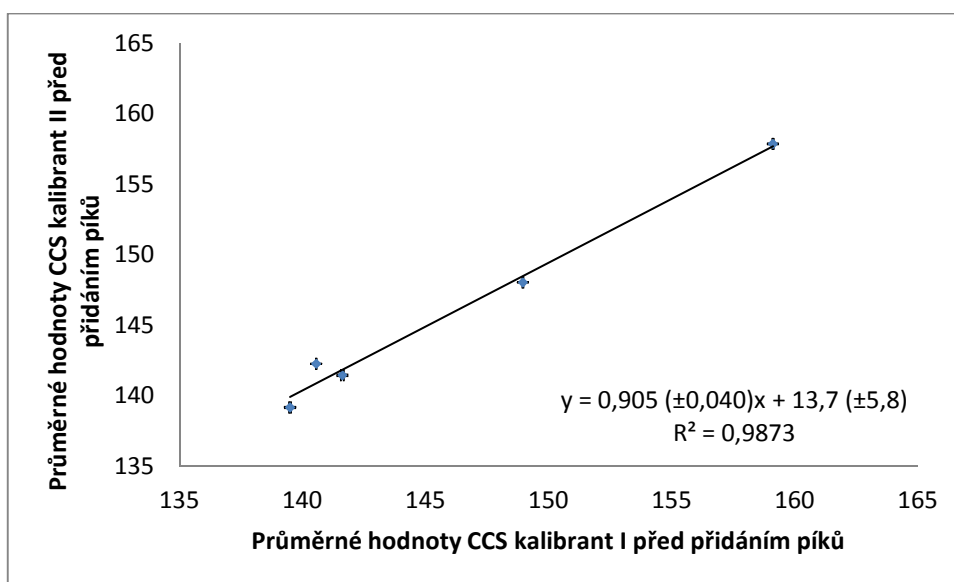


Graf 8 Korelace průměrných hodnot CCS pro katinony pro kalibrant II před a po přidání píků

4.3 Určování účinného srážkového průřezu nových syntetických drog pomocí kalibrace směsí látek

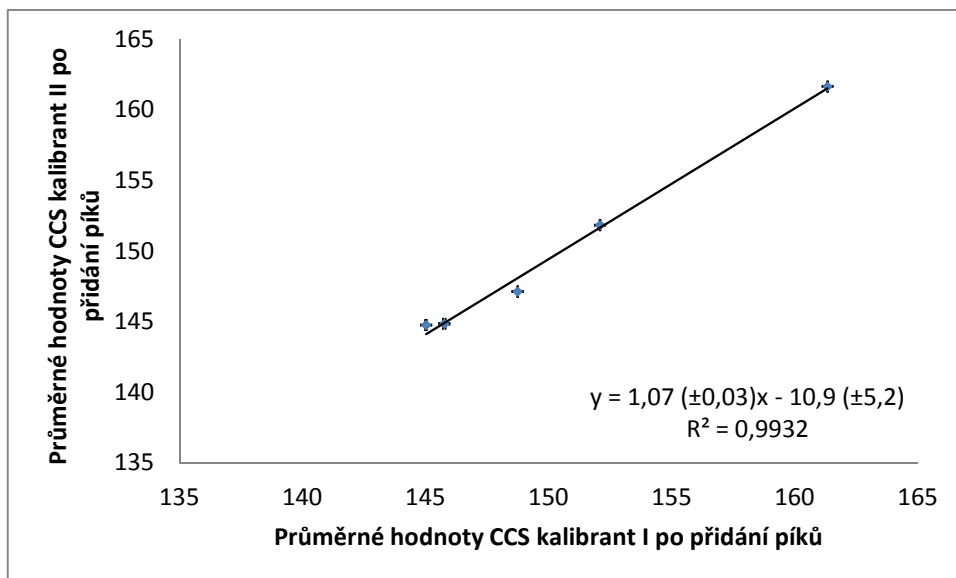
Druhým testovaným kalibrantem byla směs látek, jejichž rozsah m/z lépe pokrývá m/z testovaných drog. Měření se provádělo stejným způsobem, jako tomu bylo v případě kalibrace polyalaninem. V Tab. XIV a Tab. XV (viz přílohy kapitola 8.2) jsou uvedeny hodnoty CCS fenylethylaminů a katinonů získané pomocí kalibrantu I a kalibrantu II.

V grafu 9 je zobrazena korelace mezi hodnotami CCS získaných pomocí kalibrantu I a pomocí kalibrantu II. Korelace je vykreslena přímkou, která odpovídá lineární závislosti. Oproti závislosti získané kalibrací na polyalanin vidíme, že hodnota R^2 je menší. Hodnoty CCS do jisté míry závisí na použitém kalibrantu (viz směrnice a úsek na ose).



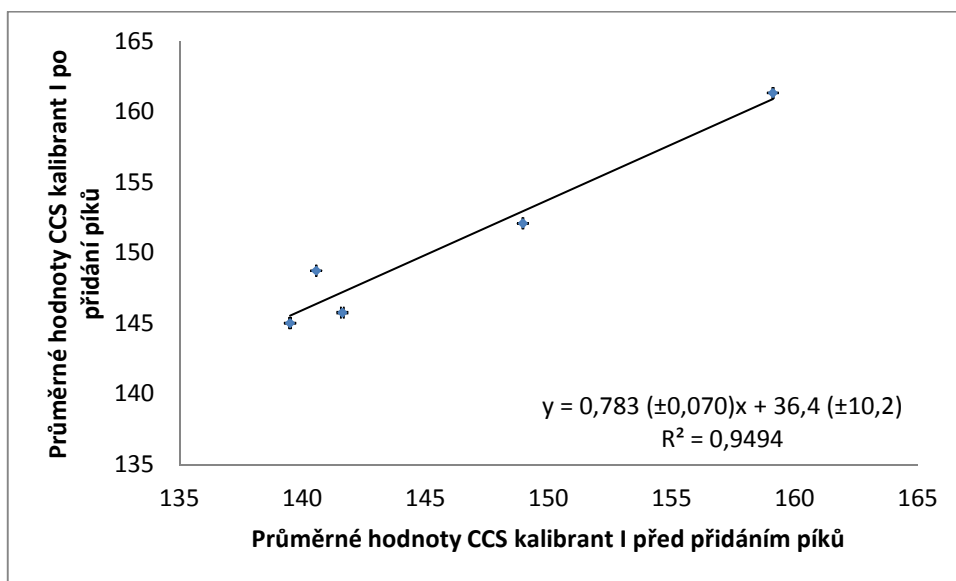
Graf 9 Průměrné hodnoty CCS fenylethylaminů pro kalibrant I a II před přidáním píků

V grafu 10 je zobrazena stejná závislost jako v předešlém grafu, ale po přidání píků. Je patrné, že došlo k zvýšení R^2 , přidání píků mělo větší vliv, než tomu bylo v případě polyalaninu.

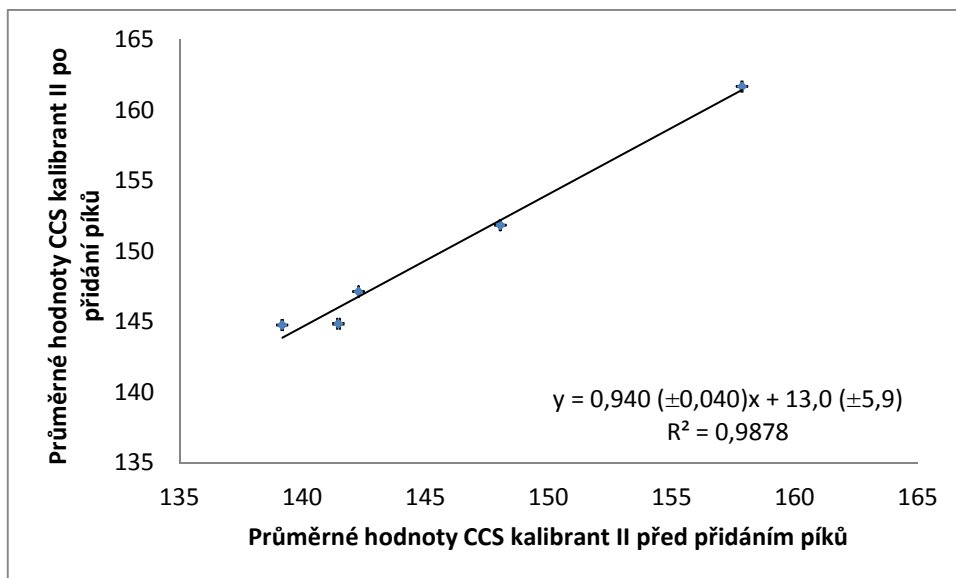


Graf 10 Průměrné hodnoty CCS fenylethylaminů pro kalibrant I a II po přidání píků

Stejný trend můžeme pozorovat i v grafu 11 a grafu 12. Opět lze tedy tvrdit, že přidání dvou píků více ovlivňuje kalibrační závislost, směrnice se více liší od 1.

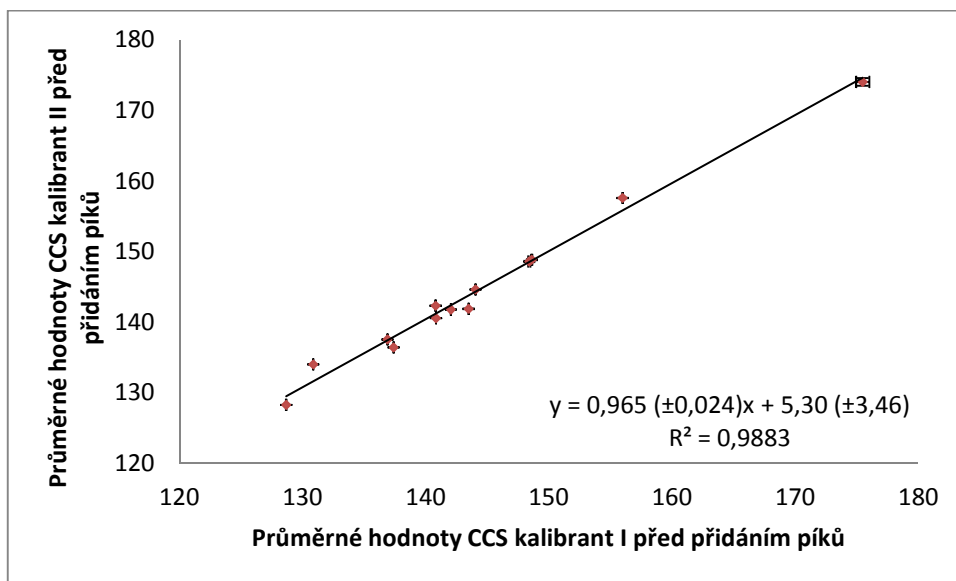


Graf 11 Korelace průměrných hodnot CCS pro fenylethylaminy pro kalibrant I před a po přidání píků

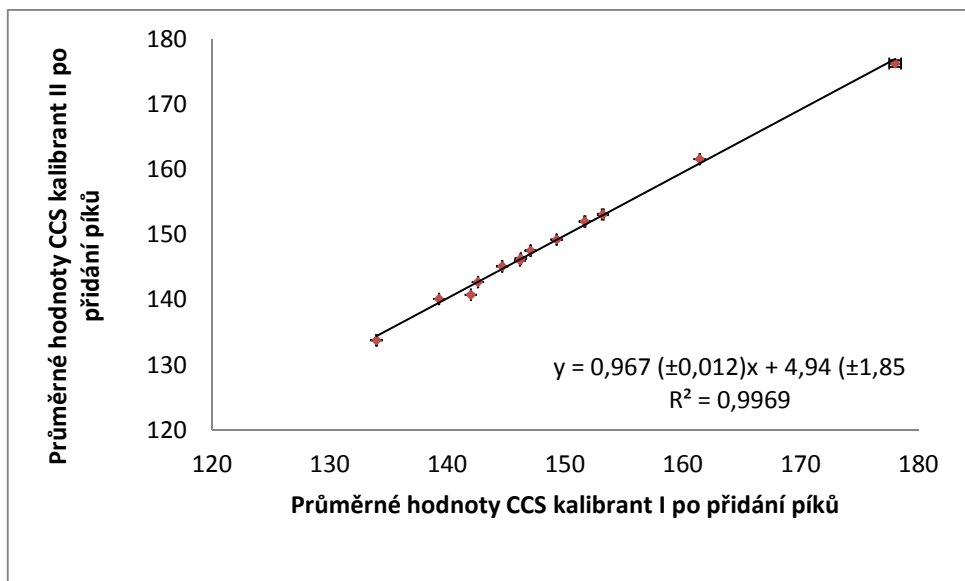


Graf 12 Korelace průměrných hodnot CCS pro fenylethylaminy pro Kalibrant I před a po přidání píků

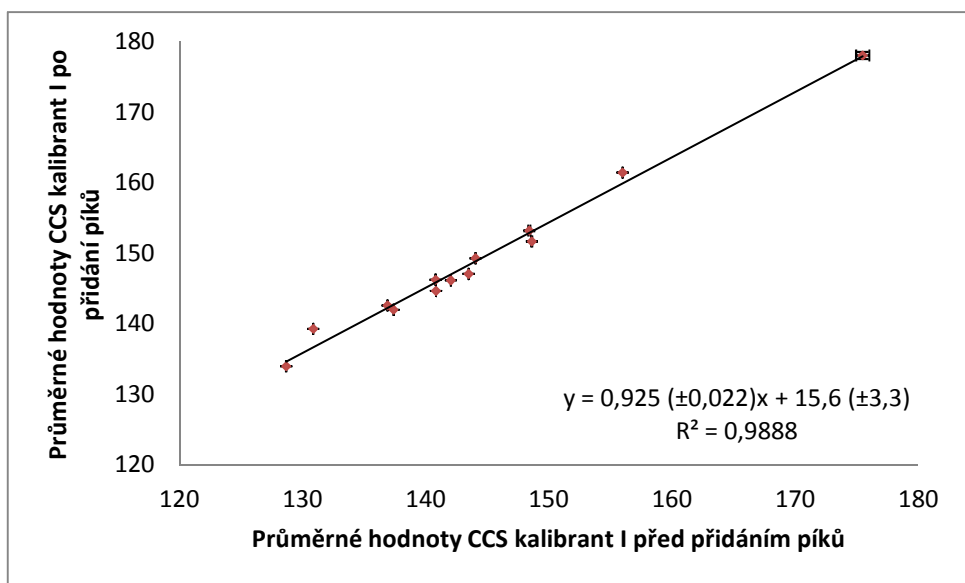
Stejně závěry jako u fenylethylaminů lze učinit pro katinony (viz Graf 13-Graf 16).



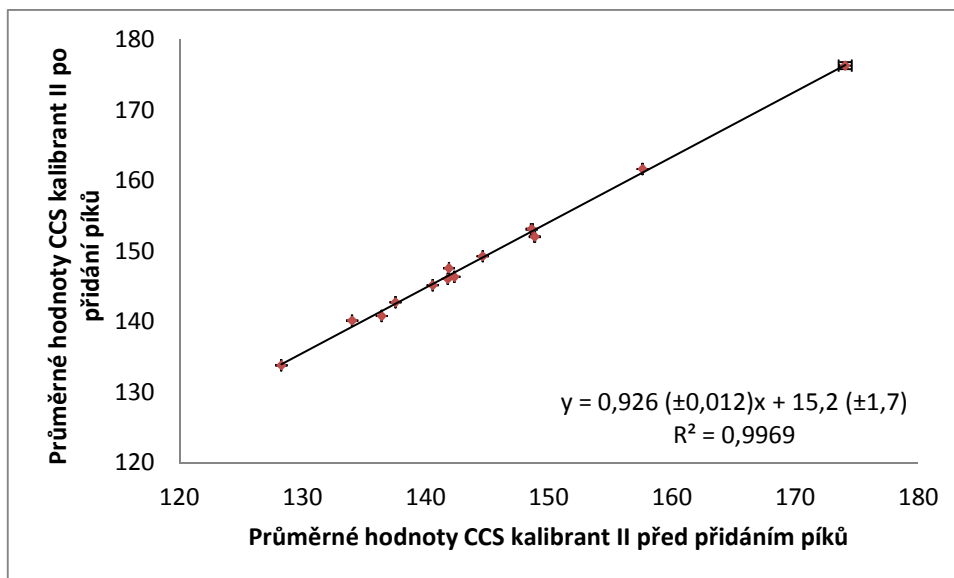
Graf 13 Průměrné hodnoty CCS katinonů pro kalibrant I a II před přidáním píků



Graf 14 Průměrné hodnoty CCS kationů pro kalibrant I a II po přidání píků



Graf 15 Korelace průměrných hodnot CCS pro kationy pro kalibrant I před a po přidání píků

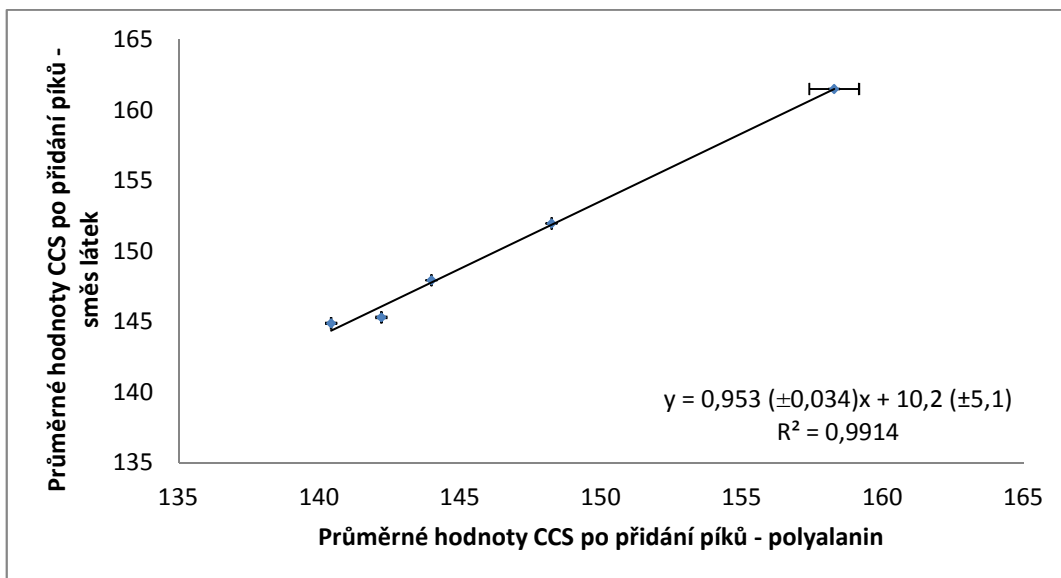


Graf 16 Korelace průměrných hodnot CCS pro katinony pro kalibrant II před a po přidání píků

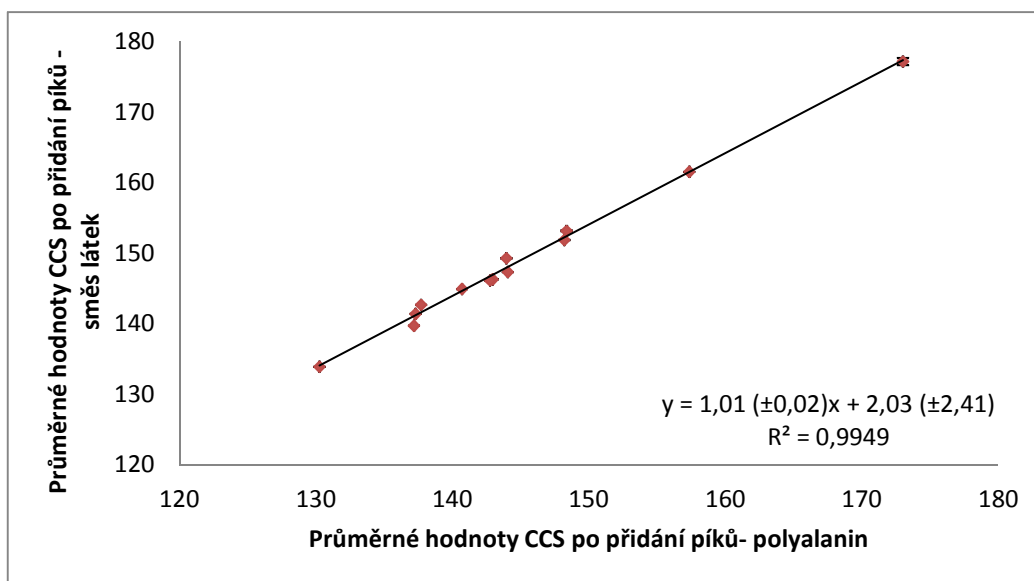
U polyalaninu byly pozorovány menší rozdíly pro jednotlivé kalibrační postupy, což by mohl být důsledek většího počtu iontů, které polyalanin pro kalibraci poskytuje (oproti kalibrační směsi malých molekul).

4.4 Porovnání hodnot CCS drog získaných na kalibrant polyalanin a směs látek

V grafu 17 a grafu 18 je zobrazena korelace průměrných hodnot CCS po přidání píků získaných kalibrací na polyalanin a CCS po přidání píků získaných kalibrací na směs látek. Závislost pro fenylethylaminy je přímková, ale směrnice se liší od jedné a spolu s úsekem na ose přispívá k systematickému rozdílu CCS hodnot pro různé kalibranty. U katinonů je rozdíl mezi kalibranty výrazně menší (směrnice je bližší jedné, úsek na ose je menší). Při porovnání obou skupin drog je třeba poznamenat, že počet měřených fenylethylaminů (5) byl menší oproti katinonům (13).



Graf 17 Průměrné hodnoty CCS pro fenylethylaminy



Graf 18 Průměrné hodnoty CCS pro katinony

Tab. VIII zobrazuje průměrné hodnoty CCS po přidání píků jak pro kalibrant polyalanin, tak pro kalibrant – směs látek. V tabulce je též uveden relativní rozdíl zjištěných hodnot CCS. Data potvrzují systematický posun CCS mezi dvěma kalibračními směsmi (1,8 až 3,6%).

Tab. VIII Průměrné hodnoty CCS po přidání píků, relativní rozdíly (hodnoty CCS zjištěné na kalibrant směs látek ~ 100 %)

	Droga	Průměrná hodnota CCS po přidání píků – polyalanin \AA^2	Průměrná hodnota CCS po přidání píků – směs látek \AA^2	Relativní rozdíl (%)
Fenylethylaminy	MDA	140,4	144,9	3,1
	2CH	142,2	145,3	2,1
	BDB	144,0	147,9	2,7
	EPH	158,3	161,5	2,0
	2CB	148,3	152,0	2,5
Katinony	CAT	130,3	133,9	2,7
	BUPHEDRON	137,7	142,7	3,5
	3MMC	140,7	144,9	2,9
	FLEPHEDRON	137,2	139,7	1,8
	3FMC	137,3	141,4	2,9
	PENTEDRON	143,0	146,3	2,3
	4MEC	144,0	149,3	3,6
	METHEDRON	142,8	146,1	2,3
	METHYLON	144,1	147,3	2,2
	BUTYLON	148,4	153,2	3,1
	ETHYLON	148,2	151,9	2,4
	MXE	157,4	161,5	2,6
	NRG1	173,0	177,2	2,4

4.5 Měření účinného srážkového průřezu látek z kalibrační směsi na kalibrant polyalanin

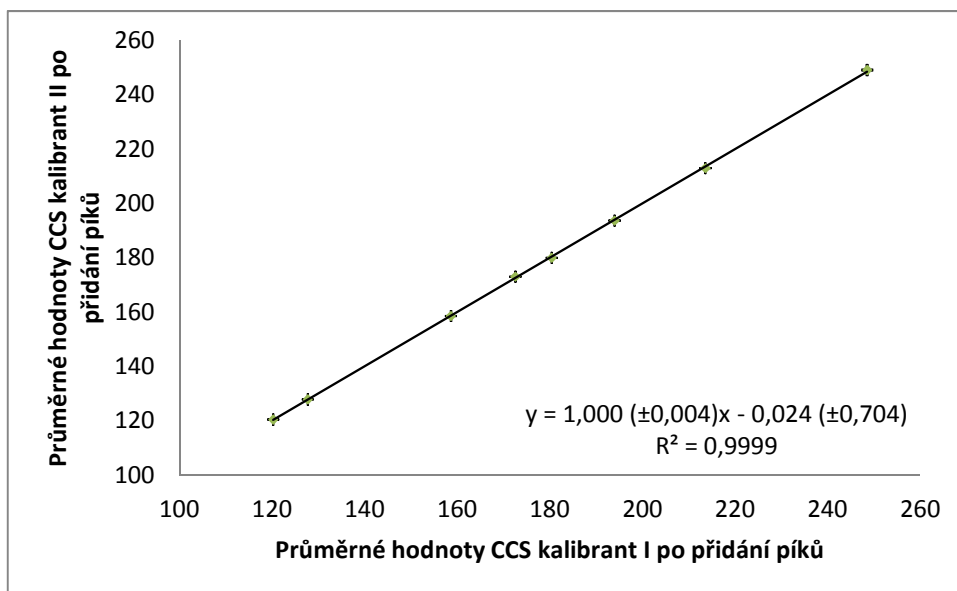
Dalším prováděným experimentem bylo ověření hodnot CCS uváděných v článku (*Campuzano a kol. [42]*) pro látky použité jako další kalibrant. Postup měření byl stejný jako v případě drog, kalibrace se prováděla na polyalanin při rychlosti vlny 700 m/s. V Tab. IX jsou uvedeny hodnoty CCS z článku a námi zjištěné hodnoty CCS pro kalibrant I a II. Jsou uváděny pouze hodnoty CCS po přidání píků, protože tato kalibrace lépe pokrývá rozsah m/z, ve kterém pozorujeme signály sledovaných drog.

Tab. IX Hodnoty CCS a m/z pro látky ze směsi

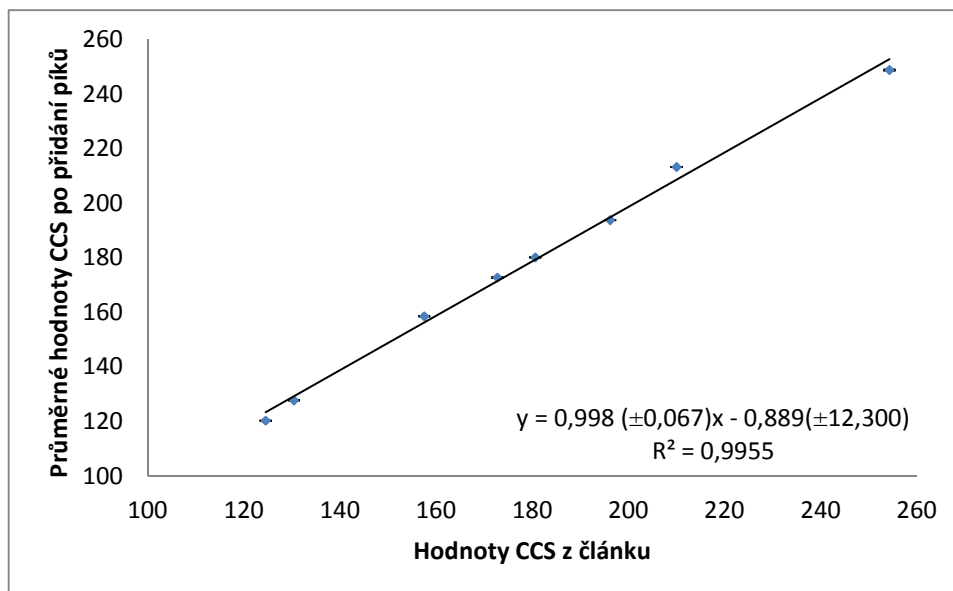
Analyzovaná látka	CCS z článku Å ² (cit [42])	m/z	Kalibrant I		Kalibrant II	
			CCS po přidání píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å	R ²
N-ethylanilin	124,5	122,2	120,24±0,03	0,9996	120,49±0,03	0,9995
Acetaminophen	130,4	152,2	127,72±0,01	0,9994	127,92±0,01	0,9994
Alprenolol	157,5	250,4	158,63±0,06	0,9997	158,60±0,06	0,9997
Ondansetron	172,7	294,4	172,56±0,03	0,9997	173,10±0,03	0,9997
Clozapine-N-oxid	180,6	343,8	180,40±0,03	0,9997	180,01±0,03	0,9997
Colchicin	196,2	400,4	193,99±0,01	0,9997	193,73±0,01	0,9997
Verapamil	210,0	455,6	213,61±0,03	0,9997	213,05±0,03	0,9997
Reserpin	254,3	609,7	248,56±0,13	0,9997	249,16±0,23	0,9997

Největší rozdíl v hodnotách CCS byl zjištěn pro N-ethylanilin, což by mohlo být způsobeno tím, že jeho m/z je nejvzdálenější od m/z prvního oligomeru polyalaninu (je mimo kalibrovaný rozsah). Dále zde, musíme uvažovat i dvojitou chybu měření, jelikož námi zjištěné hodnoty CCS byly porovnávány s experimentálními hodnotami z článku.

V grafu 19 vidíme vynikající shodu mezi kalibrantem I a II.

**Graf 19** Průměrné hodnoty CCS pro látky ze směsi látek po přidání píků

V grafu 20 je zobrazena korelace hodnot CCS uváděných v článku a námi zjištěných průměrných hodnot CCS po přidání píků. Vidíme opět lineární závislost s vysokou spolehlivostí a dobrou opakovatelností. Směrnice je blízká jedné. Z grafu je patrná dobrá shoda experimentálních hodnot CCS a hodnot CCS uváděných v článku.



Graf 20 Korelace hodnot CCS z článku (cit [42]) na průměrných hodnotách CCS po přidání píků pro látky z mixu

V Tab. X jsou zobrazeny relativní chyby pro hodnoty CCS látek ze směsi látek. Jako referenční hodnota se použila hodnota CCS uváděná v článku (cit [42]).

Tab. X Relativní chyba

Látka	Relativní chyba po přidání píků (%)
N-ethyanilin	3,3
Acetaminophen	2,0
Alprenolol	0,7
Ondansetron	0,1
Clozapine-N-oxid	0,2
Colchicin	1,2
Verapamil	1,6
Reserpin	2,1

4.6 Modelové směsné vzorky drog

Těmito experimenty byla demonstrována možnost určování CCS pro látky ve směsi. V Tab. XI jsou shrnuty výsledky pro modelové směsi. Jak můžete vidět, získané hodnoty např. pro 3-FMC jsou prakticky stejné, ať už je látka přítomná ve směsi či je měřena samostatně. Při analýze všech modelových směsí drog byly zjištěné hodnoty CCS v dobré shodě s hodnotami získanými pro jednotlivé drogy. Relativní chyba se pohybovala v rozmezí od do. (100 % 141,40). Modelové směsi představují „neznámé“ vzorky, jednotlivé drogy pak standardy. Výsledky tak dokládají použitelnost CCS při identifikaci drog v neznámých vzorcích.

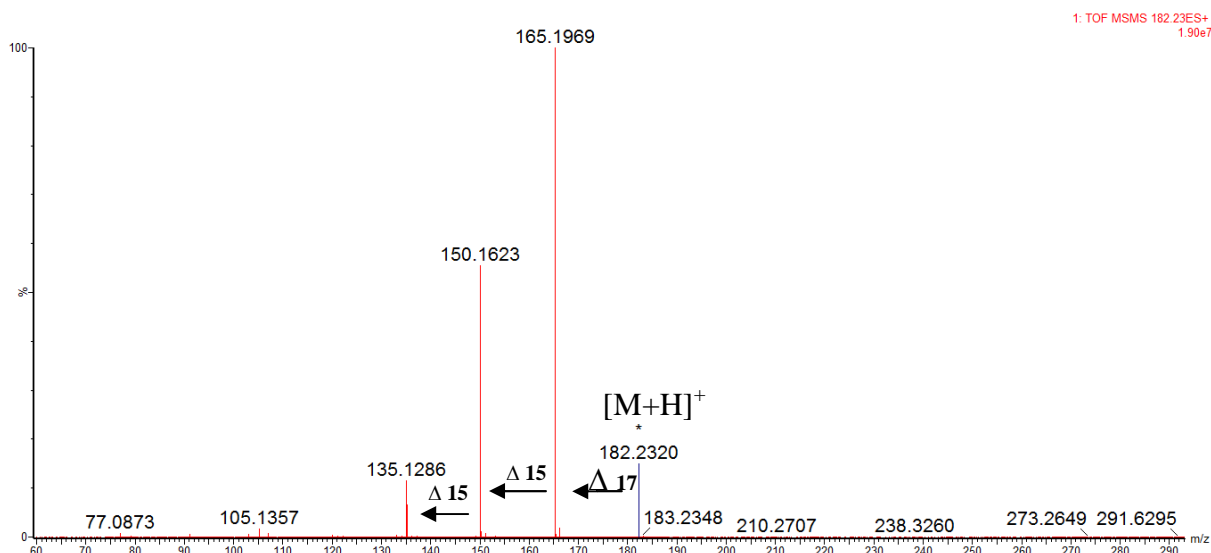
Tab. XI Hodnoty CCS látek měřených ve směsi

	Analyzovaná droga	m/z	CCS (\AA^2) pro standardy jednotlivých drog	CCS (\AA^2) zjištěné při analýze ve směsi Kalibrant I	R^2	CCS (\AA^2) zjištěné při analýze ve směsi Kalibrant II	R^2
Dvojice 1	3FMC	182, 206	141, 40	141,11±0,01	0,9885	140,63±0,01	0,9975
	2CH	182, 232	145, 31	146,23±0,10		145,52±0,09	
Dvojice 2	METHYLONE	208, 230	147, 33	147,24±0,01	0,9875	147,07±0,01	0,9909
	PENTEDRONE	192, 269	146, 30	145,97±0,01		145,82±0,01	
Směs 5-ti látek	3FMC	182, 206	141, 40	140,01±0,02	0,9985	138,83±0,02	0,9906
	BUTYLONE	222, 252	153, 17	151,89±0,03		150,79±0,03	
	CAT	150, 190	133, 90	134,26±0,12		133,03±0,12	
	NRG1	281, 391	177, 17	177,81±0,12		176,98±0,12	
	EPH	248, 333	161, 50	161,62±0,08		160,63±0,08	

4.7 Fragmentační spektra nových syntetických drog

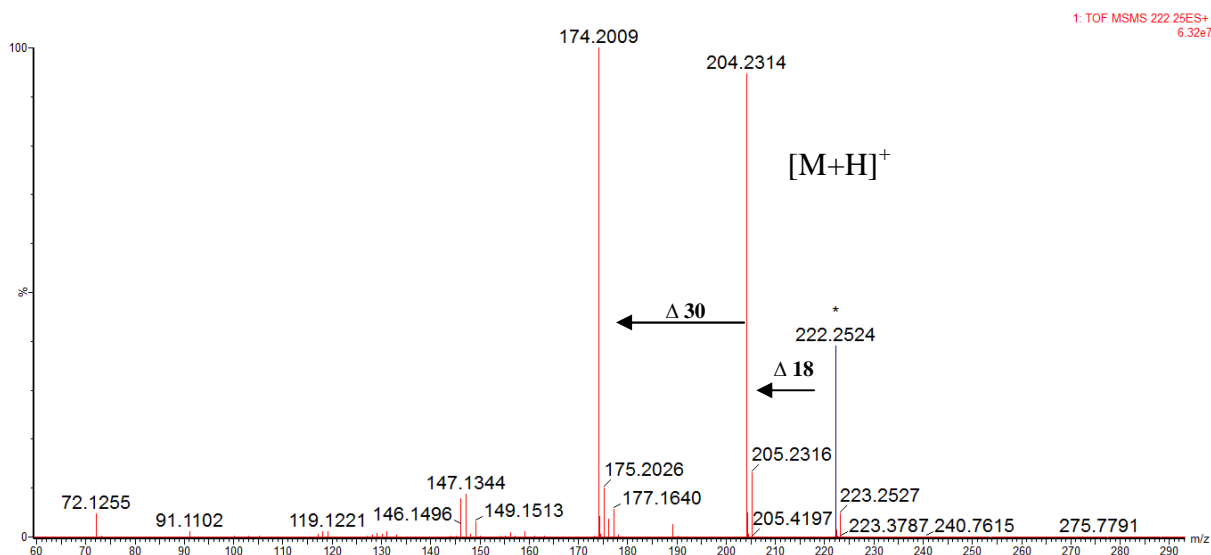
Fragmentační spektra byla měřena na Synaptu G2-S při různých kolizních energiích tak, aby hodnota intenzity prekurzorového iontu byla mezi 30-50 % původní intenzity. Na obrázcích Obr. 37 a Obr. 38 jsou zobrazena fragmentační spektra pro vybrané zástupce fenylethylaminů a kationů, konkrétně se jedná o 2-CH a ethylon. Fragmentační spektra zbylých analyzovaných nových syntetických drog jsou uvedena v příloze, kapitola 8.3 a 8.4.

Jako zástupce fenylethylaminů byla vybrána droga 2-CH, kde se jako první odštěpuje amino skupina ve formě NH_3 a poté alifatická část, kdy dojde dvakrát k odštěpení methylového zbytku.



Obr. 37 Fragmentační spektrum – 2-CH ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 2 V

Vybraným kationem je ethylon, kde vidíme pík představující ztrátu vody a dále pík s diferencí 30 od tohoto píku, který odpovídá ztrátě CH_3CH_3 skupiny.



Obr. 38 Fragmentační spektrum – ETHYLON ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 17

Obecně lze říci, že pro skupinu nových syntetických drog odvozených od fenylethylaminů lze pozorovat fragmenty vznikající štěpením alfa popř. beta vazby vzhledem k amino skupině a pro zástupce z řad kationů je typickou ztrátou odštěpení vody.

5. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývala měřením CCS kationů a fenylethylaminů na přístroji s mobilní celou typu TWIMS. K zjišťování hodnot účinného srážkového průřezu (charakterizuje míru interakce iontu s neutrálními molekulami driftového plynu) daných drog byly použity dva kalibranty.

Nejdříve řešenou problematikou v experimentální části bylo objasnění zpracování naměřených dat v programu DriftScope. Důležitým parametrem nastavení pro získání správně naměřených dat byla volba vhodné rychlosti vlny pro daný kalibrant i měřené drogy. V měření této diplomové práce byla použita rychlost vlny 700 m/s.

Prvním testovaným kalibrantem k zjištění CCS nových syntetických drog byl polyalanin, který je široce používaným kalibrantem pro měření CCS. Byly použity různé přístupy ke kalibraci. Byla provedena kalibrace s automatickou detekcí píků, kde k vybraným píkům byly přidány další dva píky (kalibrace po přidání píků). Další kalibrace byly prováděny před a po měření vzorků. Na základě všech kalibrací byly získány hodnoty, které dobře korelovaly.

Druhým kalibrantem byla směs látek, jež byla použita z důvodu pokrytí rozsahu m/z měřených drog. Opět se na experimentální hodnoty CCS aplikovaly stejné kalibrační závislosti jako v případě prvního kalibrantu a stejně jako v předešlém případě byly zjištěny stejné závěry.

Závěrem lze však říci, že přidání píků při kalibraci směsí látek hraje větší roli než je tomu v případě kalibrace pomocí polyalaninu. Dále je výhodné použít všechny kalibrační body, které máme k dispozici. Při kalibraci na polyalanin byly hodnoty CCS drog nižší o jednotky procent (nejvýše 3,6%). Rozdíl lze přičíst odlišnému pokrytí intervalu měřených hodnot CCS kalibrantem. Některé drogy mají nižší hodnotu CCS než odpovídá prvnímu bodu v případě kalibrace na polyalanin. Na druhou stranu polyalanin poskytuje více kalibračních bodů.

Dalším prováděným experimentem bylo ověření hodnot CCS uváděných v článku (cit [42]) pro látky z kalibrační směsi (acetaminofen, alprenolol, N-ethylanilin, clozapin-N-oxid, colchicin, ondansetron, reserpin a verapamil). K tomuto ověření sloužil jako kalibrant polyalanin. Zjistili jsme, že námi zjištěné experimentální hodnoty CCS se liší od hodnot CCS uváděných v článku, ale rozdíl jsou v jednotkách procent (nejvýše 3,3 %). V případě N-

ethylanilinu a acetaminofenu může k chybě přispívat skutečnost, že jsou mimo kalibrační rozsah polyalaninu. V případě všech látek se mohou uplatnit chyby obou experimentů, kterými byly hodnoty CCS zjišťovány. Korelace obou souborů experimentálních hodnot je však vysoká, příslušný koeficient determinace má hodnotu 0,9955.

Na vybraných dvojicích a směsi 5-ti drog bylo testováno určení CCS pro směsné vzorky. Získané hodnoty byly v dobré shodě s výsledky měření pro jednotlivé drogy, což naznačuje potenciál využití CCS pro identifikaci látek, kdy je možné porovnávat CCS neznámé látky s hodnotou pro standard.

Hodnoty CCS mohou být vhodnou dodatečnou charakteristikou látky doplňující informace získané z hmotnostního spektra.

6. Seznam použité literatury

- [1] Hill, Jr., H. H., Siems W. F., Louis R., H., St.: Analytical chemistry, 62 (1990).
- [2] Baumbach J.I.: Anal Bional Chem, 384, 1059-1070 (2006).
- [3] Collins D., C., Lee M., L.: Anal Bioanal Chem, 372, 66-73 (2002).
- [4] Eiceman G. A., Karpas Z.: *Ion Mobility Spectrometry, Second Edition*. CRC Press, Florida 2005.
- [5] Laphorn C., Pullen F., Chowdhry B. Z.: Mass Spectrometry Reviews 32, 43-71 (2013).
- [6] Kanu A. B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., Hill H. H. Jr: Journal of Mass spectrometry 43, 1-22 (2008).
- [7] Eiceman G. A.: Trends in analytical chemistry, 4 (2002).
- [8] Eiceman G. A., Karpas Z., Hill H. H. Jr.: *Ion Mobility Spectrometry, Third Edition*. CRC Press, Florida 2014.
- [9] Cumeras R., Figueras E., Davis C. E., Baumbach J. I., Grácia I.: Analyst 140, 1376-1390 (2015).
- [10] Jurneckzo E., Barran P. E.: Analyst 136, 20-28 (2011).
- [11] Lanucara F., Holman S. W., Gray Ch. J., Evers C. E.: Nature Chemistry 6 (2014).
- [12] Konijnenberg A., Butterer A., Sobott F.: Biochimica et Biophysica Acta 1834, 1239-1256 (2013).
- [13] Kliman M., May C. M., McLean J. A: Biochimica et Biophysica Acta 1811, 935-945 (2011).
- [14] Balm M.A, Hill H. H. Jr: Analytical Chemistry 54, 38-43 (1982).
- [15] Snyder A. P., harden C. S.: Analytical Chemistry 65, 299-306 (1993).
- [16] Morrissey M. A., Hill H. H. Jr: Journal of Chromatographic Science 27, 529-533 (1989).
- [17] Huang M. X., Markides K. E., Lee M. L: Chromatographia 31, 163-167 (1991).
- [18] Fuché C., Deseille J.: Actualite Chimique, 91-95 (2010).
- [19] Hilton Ch. K., Krueger C. A., Midey A. J., Osgood M., Wu J., Wu Ch.: International Journal of Mass Spectrometry 298, 64-71 (2010).
- [20] Verkouteren J. R., Staymates J. L.: Forensic Science International 206, 190-196 (2011).

- [21] Mäkinen M. A., Anttalainen O. A., Sillanpää M. E.: *Analytical Chemistry* 82, 9594-9600 (2010).
- [22] Baumbach J. I.: *Journal of Breath Reserch* 3, (2009).
- [23] Xie Z., Sielemann S., Schmidt H., Baumbach J. I.: *International Journal of Ion Mobility Spectrometry* 4, 77-83 (2001).
- [24] Snyder A. P., Shoff D. B: *Analytical Chemistry* 63, 526-529 (1991).
- [25] Prybylko A. R. M., Thomas C. L. P., Anstice P. J., Fielden P. R, Brokenshire J.: *Analytical Chemica Acta* 77, (1995).
- [26] Strege M. A., Kozerski J., Juarbe N., Mahoney P.: *Analytical Chemistry* 80, 3040-3044, (2008).
- [27] Qin C., Granger A., Papov V., McCaffrey J., Norwood D. L.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 107-113 (2010).
- [28] Wu C., Siems W. R., Klasmeier J., Hill H. H.: *Analytical Chemistry* 72, (2000).
- [29] Dwivedi P., Wu Ch., Matz L. M., Clowers B. H., Siems W. F., Hill Jr. H. H.: *Analytical Chemistry* 78, (2006).
- [30] Momoh P. O., El-Shall M. S.: *Physical Chemistry Chemical Physics* 10, 4827-4834 (2008).
- [31] Harry E. L., Bristow A. W., Wilson I. D., Creaser C. S.: *Analyst* 136, (2011).
- [32] dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004749en.pdf>
- [33] Knapman T. W., Berryman J. T, Campuzano I., Harris S. A., Ashcroft A. E.: *International Journal of Mass Spectrometry* 298, 17-23 (2010).
- [34] Forsythe J. G., Petrov A. S., Walker Ch. A., Allen S. J., Pellissier J., S., Bush M. F., Hud N. V., Fernández F., M.: *Analyst*, 140, 6653-6861 (2015).
- [35] Gelb A. S., Jarratt R. E., Huang Y., Dodds E. D.: *Analytical Chemistry* 86, 11396-11402 (2014).
- [36] Fernández-Maestre R., Harden Ch. S., Ewing R. G., Crawford Ch. L., Hill Jr. H., H: *Analyst*, 135, 1433-1442 (2010).
- [37] Baker E. S., Bushnell J. E., Wecksler S. R., Lim M. D., Manard M. J., Dupuis N. F., Ford P. C., Bowers M. T.: *Journal of American Chemical Society* 127, 18222-18228 (2005).
- [38] Dear G. J., Munoz-Muriedas J., Beaumont C., Roberts A., Kirk J., Williams J. P., Campuzano I.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 3157-3162 (2010).

- [39] Lietz Ch. B., Yu Q., Li L.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25, 2009-2019 (2014).
- [40] Paglia G., Williams J. P., Menikarachchi L., Thompson J. W., Tyldesley-Worster R., Halldórsson S., Rolfsson O., Moseley A., Grant D., Langridge J., Palsson B. O., Astarita G.: *Analytical Chemistry* 86, 3958-3993 (2014).
- [41] Hofmann J., Struwe W. B., Scarff Ch. A., Scrivens J. H., Harvey D. J., Pagel K.: *Analytical Chemistry* 86, 10789-10795 (2014).
- [42] Campuzano I., Bush M. F., Robinson C. V., Beaumont C., Richardson K., Kim H., Kim H. I.: *Analytical Chemistry* 84, 1026-1033 (2012).
- [43] Bush M. F., Campuzano I. D. G., Robinson C. V.: *Analytical Chemistry* 84, 7124-7130 (2012).
- [44] dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002915en.pdf> (přečteno 26.2. 2016)
- [45] Gelb A. S., Jarrat R. E, Huang Y., Dodds E. D.: *Analytical Chemistry* 86, 11396-11402 (2014).
- [46] Ammann J., McLaren M. J., Gerostamoulos D., Beyer J.: *Journal of Analytical Toxicology* 36, 372-380 (2012).
- [47] Ammann D., McLaren M. J., Gerostamoulos D., Beyer J.: *Journal of Analytical Toxicology* 36, 381-389 (2012).
- [48] Jankovics P., Váradi A., Tölgyesi L., Lohner S., Németh-Palotás J., Kőszegi-Szalai H.: *Forensic Science International* 210, 213-220 (2011).
- [49] Musah R. A., Domin M. A., Walling M. A., Shepard J. R. E.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26, 1109-1114 (2012).
- [50] Paul M., Ippish J., Herrmann Ch.: *Analytical Bioanalytical Chemistry* 406, 4425-4441 (2014).
- [51] Švidrnoch M., Lněníčková L., Válka I., Ondra P., Maier V.: *Journal of Chromatography A* 1356, 258-265 (2014).
- [52] Pauk V., Žihlová V., Borovcová L., Havlíček V., Schug K., Lemr K.: *Journal of Chromatography A* 1423, 169-176 (2015).

7. SEZNAM ZKRATEK

ACN – acetonitrile, acetonitril

CCS – collision cross section, účinný srážkový průřez

CIMS – chiral ion mobility separation, chirální iontová mobilitní chromatografie

DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

DTIM – drift tube ion mobility, iontová mobilita s využitím driftové trubice

EHSS – hard sphere scattering method, rozptyl při srážce pevných částic

ESI – electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

FAIM – field waveforming ion mobility, iontová mobilita s využitím asymetrické vlny s vysokou intenzitou elektrického pole

IMS – ion mobility spectrometry, iontová mobilitní spektrometrie

LC – liquid chromatography, kapalinová chromatografie

MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization, laserem asistovaná desorpce/ionizace

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

nanoESI – nanoelectrospray ionization, ionizace nanoelektrosprejem

NMR – nuclear magnetic resonance, nukleární magnetická rezonance

PA – projection approximation, aproximace projekcí

TM – trajectory method, metoda trajektorie

TWIM – travelling ion mobility, iontová mobilita s využitím putující vlny

UHPLC/UPLC – ultra high performance liquid chromatography, ultra účinná kapalinová chromatografie

8. PŘÍLOHY

8.1	Tabulky - polyalanin	I
8.2	Tabulky - mix.....	II
8.3	Fragmentační spektra – fenylethylaminy.....	III
8.4	Fragmentační spektra – katinony	V

8.1 Tabulky - polyalanin

Tab. XII Hodnoty CCS pro FENYLETHYLAMINY

Analyzovaná droga	m/z	Kalibrant I				Kalibrant II			
		CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²	CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²
MDA	180,220	140,57±0,01	0,9996	140,25±0,01	0,9997	140,73±0,01	0,9995	140,59±0,01	0,9997
2CH	182,232	143,09±0,01	0,9997	142,28±0,01	0,9998	143,04±0,004	0,9997	142,13±0,01	0,9997
BDB	194,242	144,55±0,01	0,9995	143,87±0,01	0,9997	144,83±0,004	0,9995	144,10±0,01	0,9997
EPH	248,333	158,58±0,89	0,9996	158,39±0,89	0,9997	158,33±0,88	0,9996	158,18±0,88	0,9997
2 CB	261,130	148,69±0,01	0,9997	147,95±0,01	0,9997	148,68±0,01	0,9997	148,55±0,01	0,9997

Tab. XIII Hodnoty CCS pro KATINONY, pozn. u pentedronu a ethylonu nebylo možné přidat další píky -> všechny byly vybrány v prvním kroku

Analyzovaná droga	m/z	Kalibrant I				Kalibrant II			
		CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²	CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²
PENTHEDRONE	192,269	143,11±0,01	0,9997	-	-	142,95±0,01	0,9996	142,81±0,01	0,9997
CAT	150,190	130,45±0,02	0,9996	130,25±0,02	0,9997	130,43±0,02	0,9996	130,27±0,02	0,9997
BUPHEDRONE	178,272	137,81±0,02	0,9995	137,46±0,01	0,9997	138,25±0,02	0,9995	137,95±0,01	0,9997
3 MMC	178,272	140,71±0,01	0,9995	140,74±0,01	0,9997	140,84±0,01	0,9995	140,67±0,01	0,9997
FLEPHEDRONE	182,206	137,47±0,01	0,9992	137,14±0,01	0,9994	138,23±0,01	0,9994	137,23±0,02	0,9994
3 FMC	182,206	137,59±0,02	0,9995	137,23±0,02	0,9997	137,82±0,02	0,9995	137,37±0,02	0,9997
4 MEC	192,270	144,54±0,02	0,9995	144,01±0,02	0,9997	144,20±0,02	0,9995	143,90±0,02	0,9997
METHEDRONE	194,242	143,07±0,004	0,9996	142,80±0,01	0,9997	143,09±0,01	0,9996	142,71±0,01	0,9997
METHYLONE	208,230	144,07±0,01	0,9996	143,87±0,01	0,9997	144,50±0,01	0,9996	144,25±0,01	0,9997
BUTYLONE	222,252	148,49±0,05	0,9995	148,26±0,04	0,9997	149,12±0,06	0,9995	148,46±0,05	0,9997
ETHYLONE	222,252	148,18±0,02	0,9997	-	-	148,33±0,02	0,9996	148,21±0,02	0,9997
MXE	247,330	157,77±0,02	0,9994	157,16±0,02	0,9997	157,44±0,02	0,9994	157,55±0,02	0,9997
NRG 1	281,391	173,02±0,02	0,9995	172,92±0,02	0,9997	173,45±0,02	0,9993	173,10±0,02	0,9996

8.2 Tabulky - mix

Tab. XIV Hodnoty CCS pro FENYLETHYLAMINY

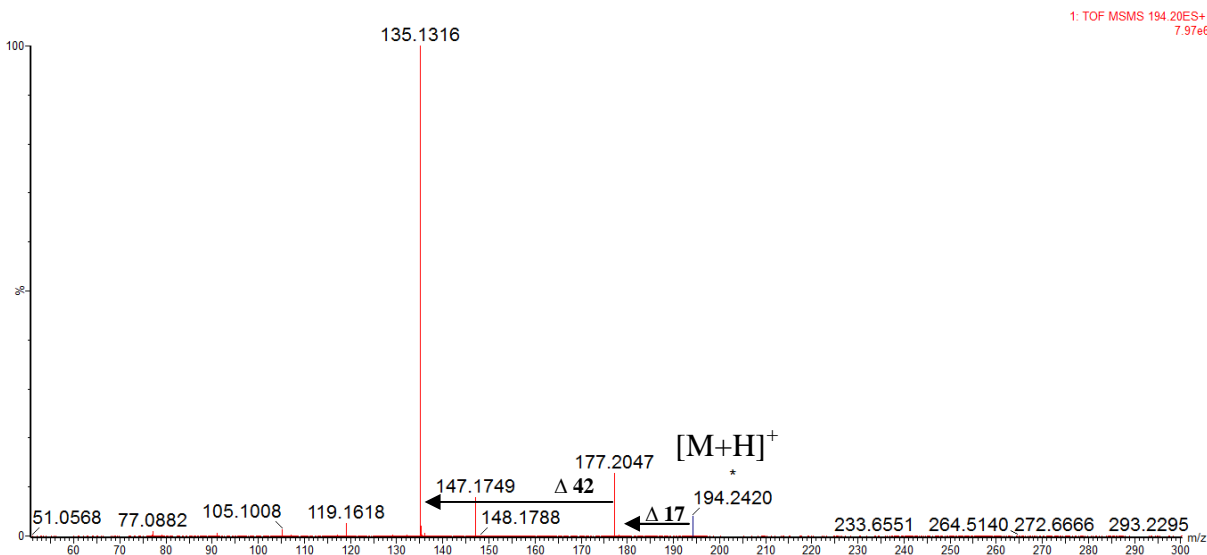
Analyzovaná droga	m/z	Kalibrant I				Kalibrant II			
		CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²	CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²
MDA	180,220	139,49±0,03	0,9997	145,02±0,03	0,9976	139,18±0,04	0,9994	144,76±0,03	0,9975
2CH	182,232	141,62±0,06	0,999	145,76±0,05	0,9985	141,46±0,06	0,9991	144,85±0,05	0,9987
BDB	194,242	140,56±0,01	0,9936	148,74±0,01	0,991	142,27±0,01	0,9998	147,14±0,01	0,9983
EPH	248,333	159,11±0,02	0,9951	161,33±0,02	0,9968	157,86±0,03	0,9825	161,68±0,02	0,9891
2 CB	261,130	148,95±0,02	0,999	152,09±0,02	0,9986	148,04±0,02	0,9996	151,85±0,02	0,9983

Tab. XV Hodnoty CCS pro KATINONY

Analyzovaná droga	m/z	Kalibrant I				Kalibrant II			
		CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²	CCS před přidáním píků Å ²	R ²	CCS po přidání píků Å ²	R ²
PENTHEDRONE	192,269	140,80±0,02	0,9844	146,23±0,02	0,9897	142,33±0,01	0,9996	146,36±0,02	0,9984
CAT	150,19	128,66±0,02	0,9998	133,97±0,01	0,9984	128,27±0,01	0,9998	133,83±0,01	0,9981
BUPHEDRONE	178,272	136,89±0,01	0,9993	142,59±0,01	0,9972	137,55±0,01	0,9992	142,76±0,01	0,9978
3 MMC	178,272	140,83±0,01	0,9993	144,65±0,01	0,9986	140,57±0,01	0,9976	145,18±0,01	0,9967
FLEPHEDRONE	182,206	130,87±0,01	0,9901	139,28±0,01	0,9902	134,02±0,01	0,988	140,16±0,01	0,9913
3 FMC	182,206	137,39±0,01	0,9965	141,99±0,01	0,9966	136,42±0,01	0,998	140,81±0,01	0,9977
4 MEC	192,270	144,04±0,03	0,9991	149,28±0,03	0,9976	144,63±0,03	0,999	149,28±0,03	0,9977
METHEDRONE	194,242	142,04±0,01	0,9996	146,16±0,01	0,9985	141,79±0,01	0,9995	146,09±0,01	0,9985
METHYLONE	208,230	143,48±0,02	0,9994	147,07±0,02	0,9985	141,88±0,02	0,9851	147,56±0,02	0,990
BUTYLONE	222,252	148,40±0,09	0,9996	153,20±0,08	0,9975	148,61±0,09	0,9971	153,14±0,08	0,9966
ETHYLONE	222,252	148,61±0,05	0,9994	151,67±0,05	0,9986	148,85±0,05	0,9991	152,06±0,05	0,9986
MXE	247,330	155,99±0,01	0,9873	161,43±0,01	0,9901	157,61±0,01	0,9966	161,66±0,01	0,9963
NRG 1	281,391	175,48±0,53	0,9991	178,03±0,50	0,9979	174,06±0,54	0,9996	176,31±0,50	0,9984

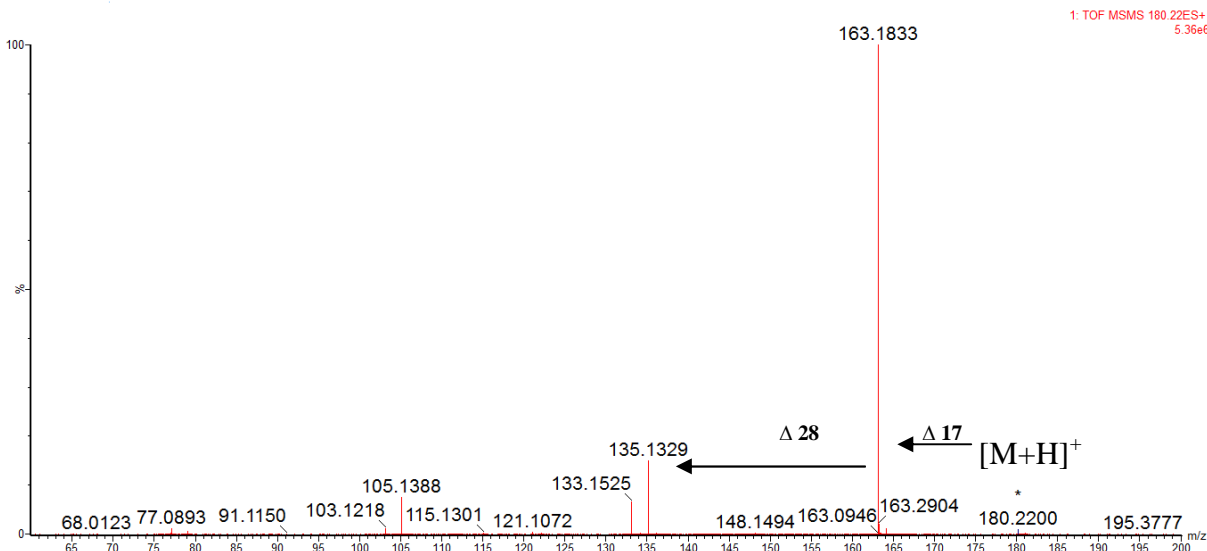
8.3 Fragmentační spektra – fenylethylaminy

První látkou, která byla podrobena fragmentaci bylo BDB poskytující dva výraznější fragmenty. První fragment s diferencí 17 od $[M+H]^+$ vznikl nejspíše odštěpením amoniaku, druhý fragment s $\Delta 42$, což odpovídá $CH_3-CH=CH_2$.



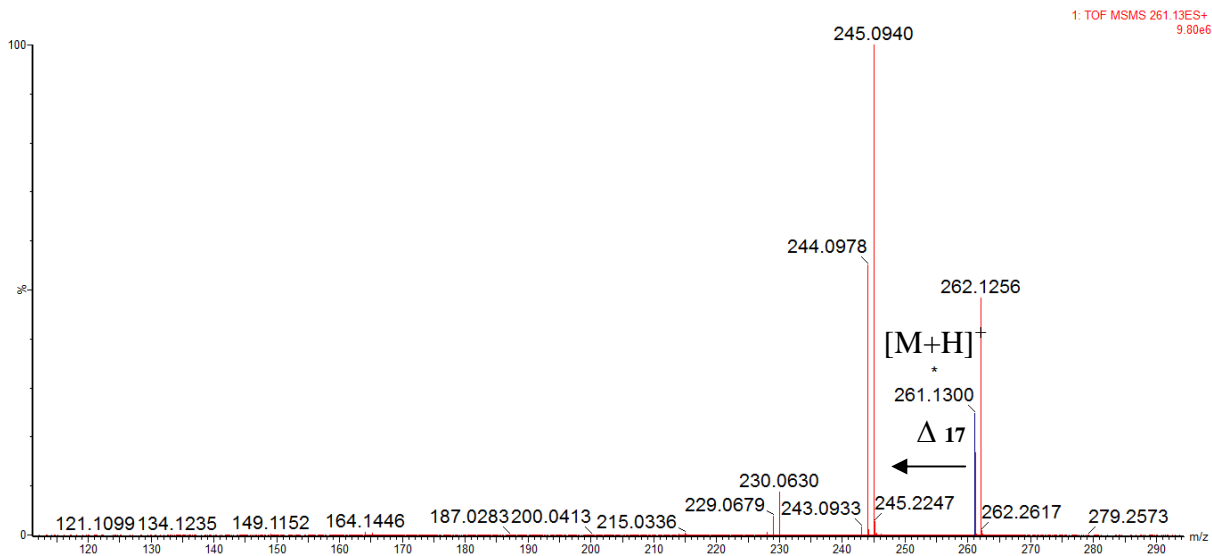
Obr. 39 Fragmentační spektrum – BDB ve směsi $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu g/ml$, kolizní napětí 4

Stejná situace nastává i v případě MDA, kdy dochází též k odštěpení NH_3 a poté vzniká fragment $CH_2=CH_2$.



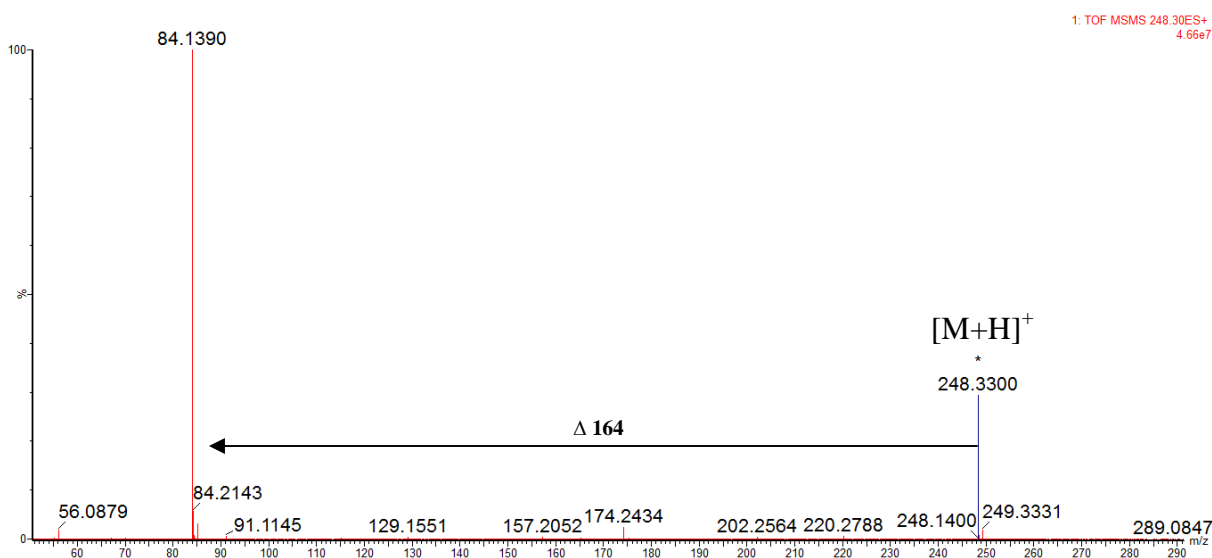
Obr. 40 Fragmentační spektrum – MDA ve směsi $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu g/ml$, kolizní napětí 3

Droga 2-CB ve své struktuře obsahuje Br, což se nám potvrzuje i přítomností isotopických píků v MS spektru. Prakticky jediným fragmentem, který lze pozorovat je fragment ve kterém došlo k odštěpení amoniaku.



Obr. 41 Fragmentační spektrum – 2-CB ve směsi CH₃OH:H₂O (1:1, v/v), c = 1 µg/ml, kolizní napětí 4

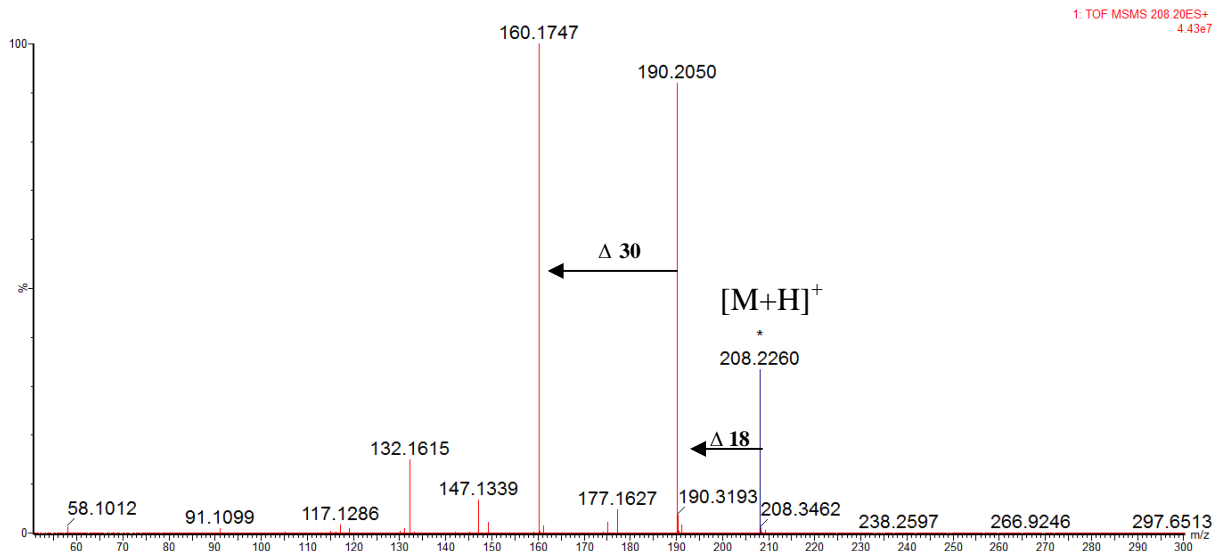
V případě EPH došlo k odštěpení velkého fragmentu s diferencí 164 od [M+H]⁺. Tento fragment vznikl odštěpením pyrolidinu.



Obr. 42 Fragmentační spektrum – EPH ve směsi CH₃OH:H₂O (1:1, v/v), c = 1 µg/ml, kolizní napětí 23

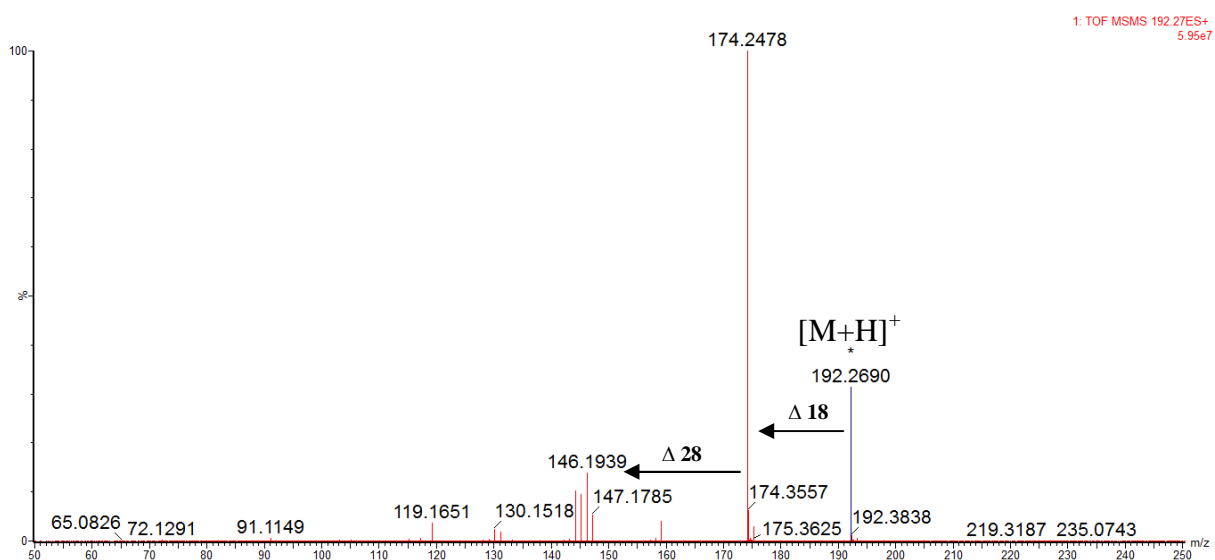
8.4 Fragmentační spektra – kationony

Methylon patří již do skupiny kationů, takže vidíme první fragment, který odpovídá odštěpení vody a od tohoto fragmentu vznikl štěpením alifatické části další.



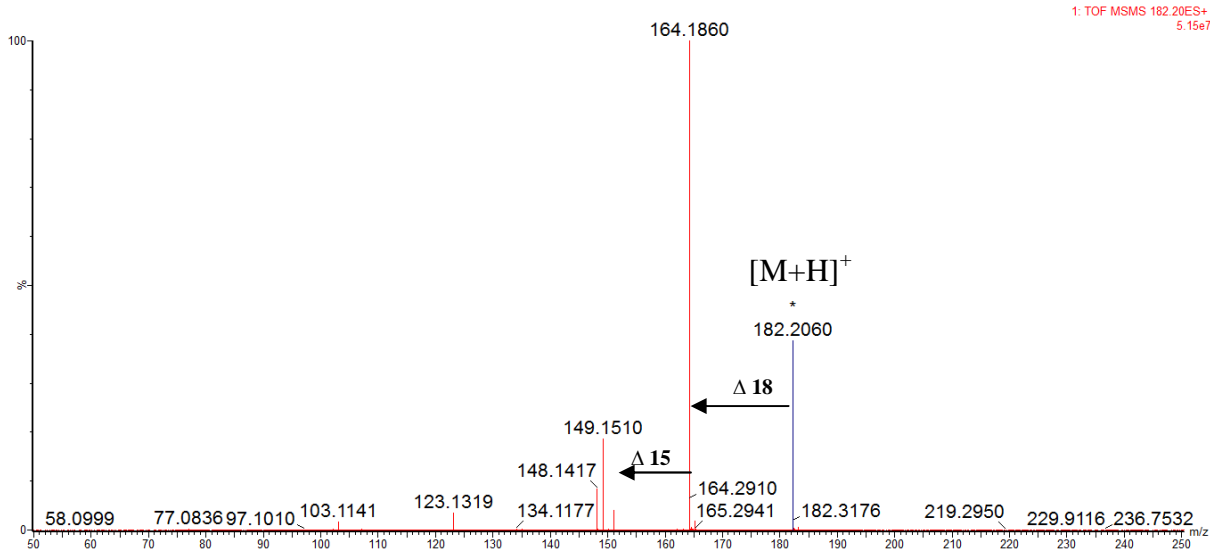
Obr. 43 Fragmentační spektrum – METHYLON ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1$ $\mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 15

Stejně jako v předešlém případě je dominantní ztrátou ztráta vody a další fragment vzniká odštěpením $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ skupiny z alifatické části.



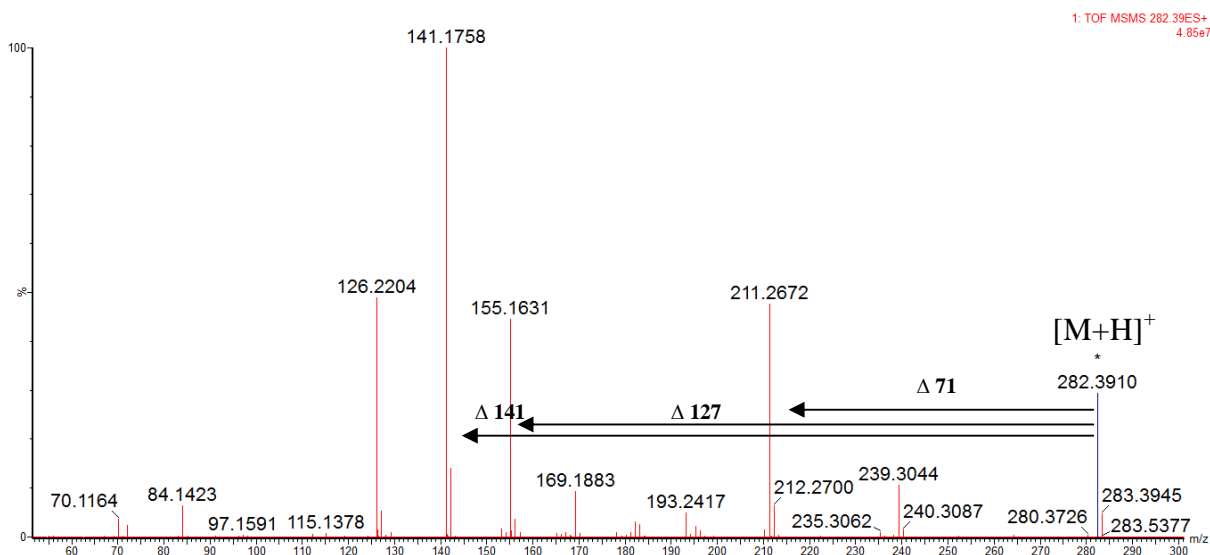
Obr. 44 Fragmentační spektrum – 4-MEC ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1$ $\mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 14

Flefedron poskytuje pík s dominantní ztrátou 18, což opět ukazuje na ztrátu vody a dále pík fragmentu s $\Delta 15$ od 164,1860, kdy došlo k odštěpení methylové skupiny z alifatické části.



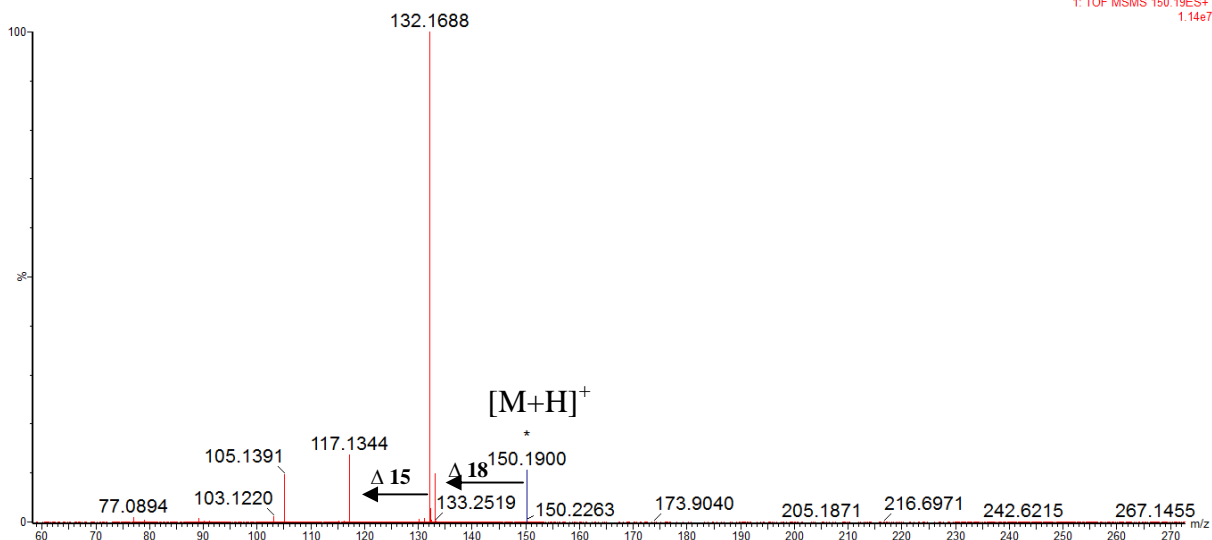
Obr. 45 Fragmentační spektrum – FLEFEDRON ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v),
 $c = 1 \mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 10

Droga NRG-1 poskytuje bohaté fragmentační spektrum. Dominantní ion 141,1758 a ion 155,1631 vznikají štěpením v alfa resp beta poloze vůči karbonylové skupině. Fragment s diferencí 71 odpovídá ztrátě pyrolidinu.



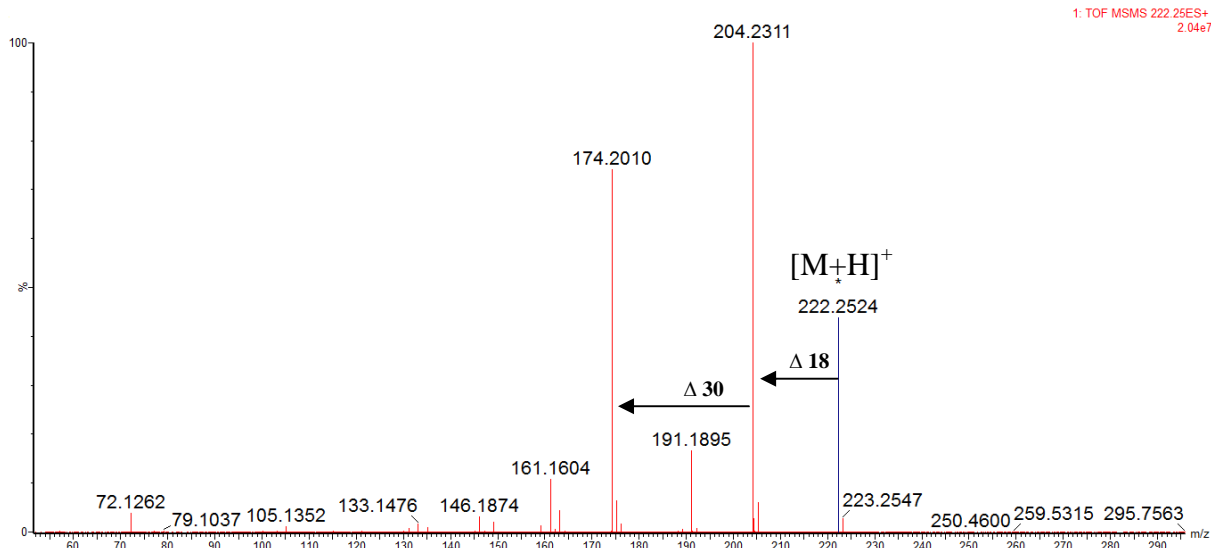
Obr. 46 Fragmentační spektrum – NRG-1 ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu\text{g/ml}$,
kolizní napětí 30

Další drogou je kation, kde je dominantní ztrátou ztráta vody. Od vzniklého fragmentu vzniká další fragment odštěpením $-CH_3$ skupiny.



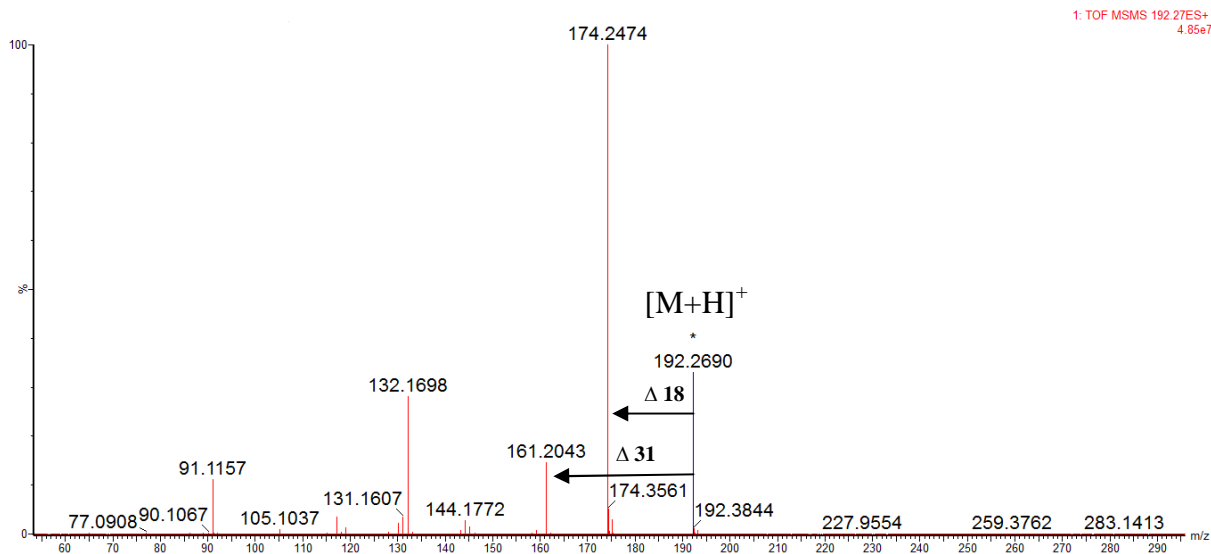
Obr. 47 Fragmentační spektrum – CAT ve směsi $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu g/ml$, kolizní napětí 4

Droga butylon poskytuje naprosto stejné ztráty jako tomu bylo v případě ethylonu.



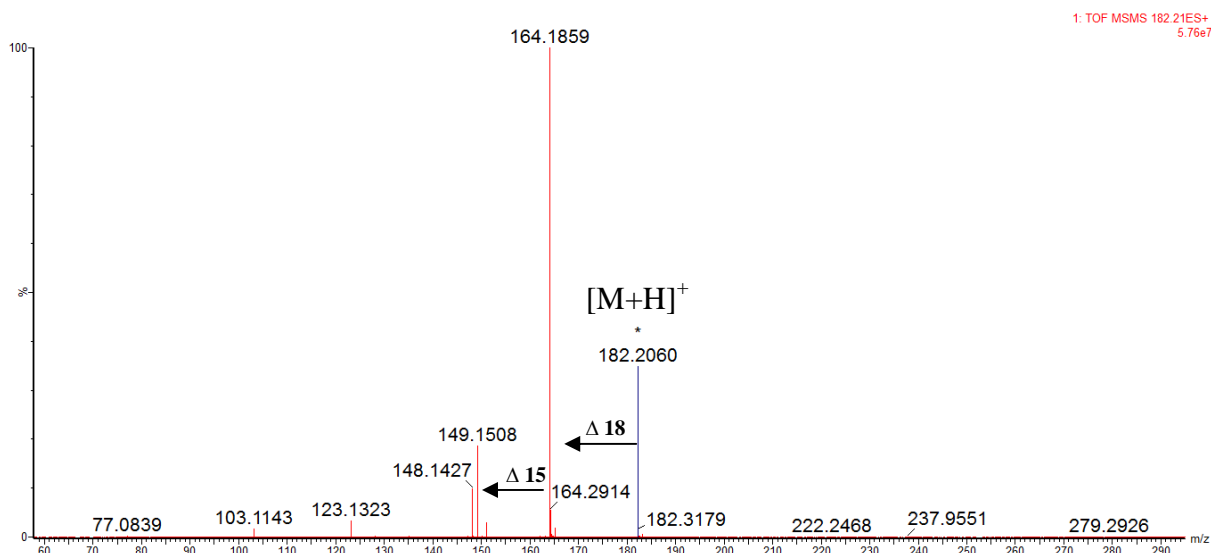
Obr. 48 Fragmentační spektrum – BUTYLON ve směsi $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu g/ml$, kolizní napětí 16

Dominantní ztrátu ve fragmentačním spektru pentedronu opět představuje voda a dále byla pozorována ztráta NH_2CH_3 .



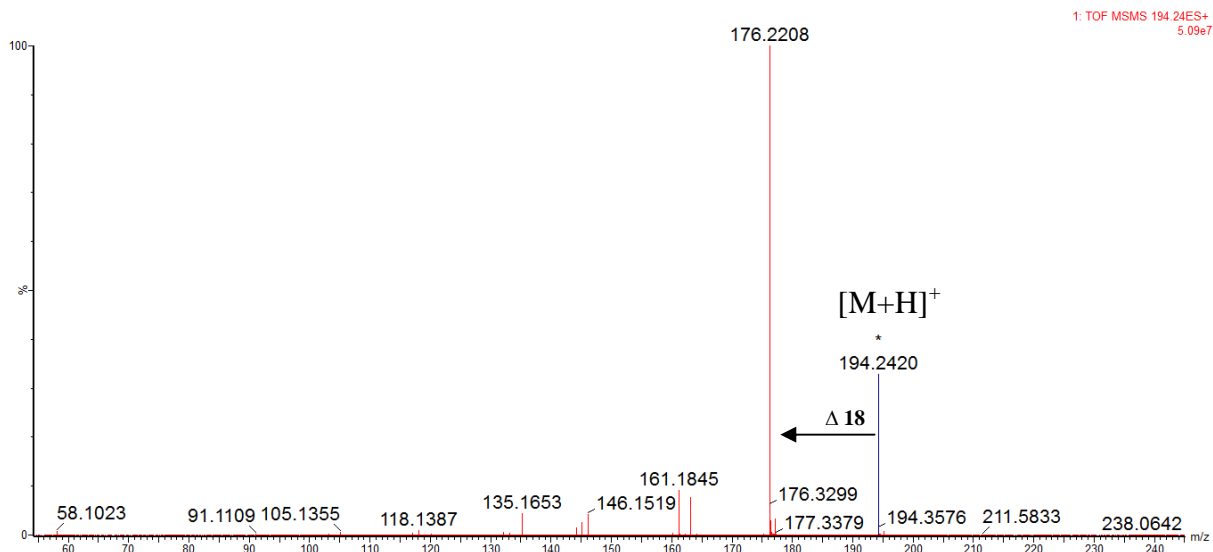
Obr. 49 Fragmentační spektrum – PENTEDRON ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v),
 $c = 1 \mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 15

Píkem s největší intenzitou, ve spektru 3-FMC, je fragment představující ztrátu vody a dále od tohoto fragmentu vzniká další s diferencí 15 představující ztrátu $-\text{CH}_3$ skupiny.



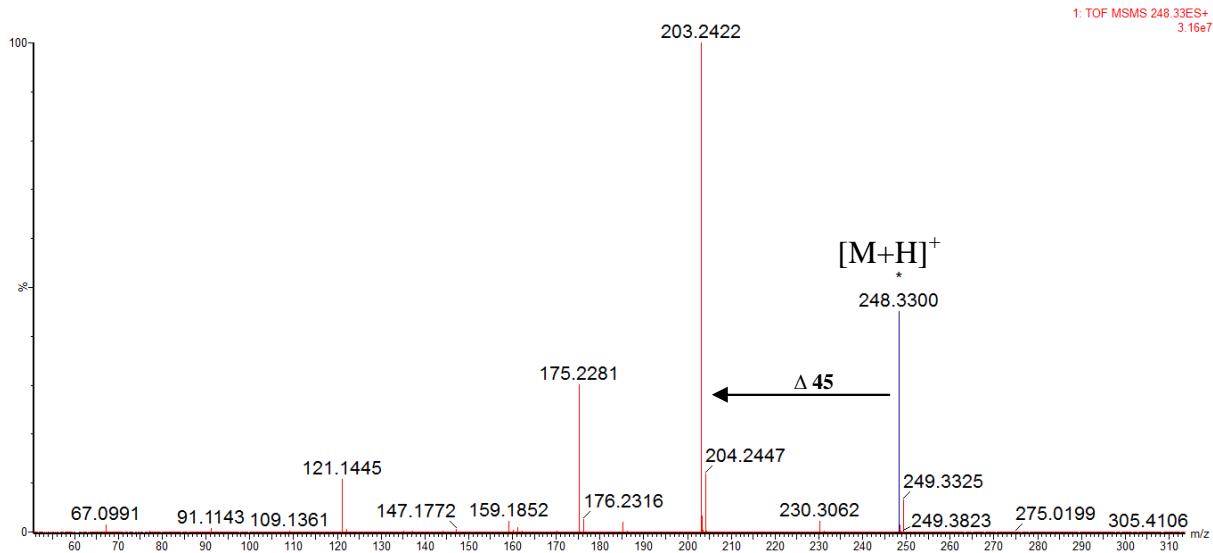
Obr. 50 Fragmentační spektrum – 3-FMC ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu\text{g/ml}$,
kolizní napětí 13

Stejně jako u většiny kationů došlo i v případě metedronu k dominantní ztátě vody.



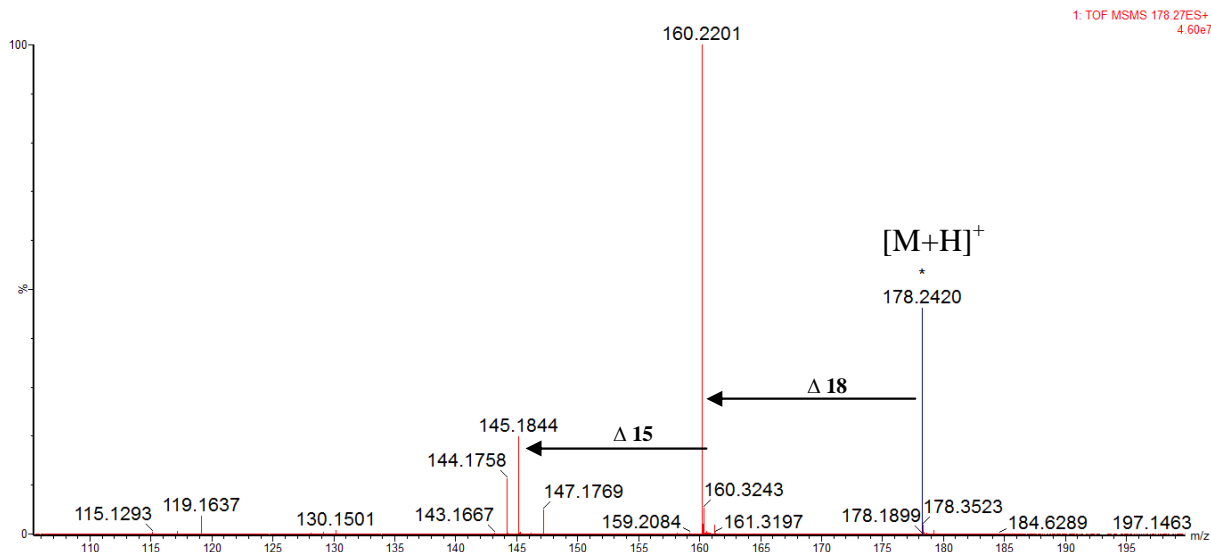
Obr. 51 Fragmentační spektrum – METHEDRON ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v),
 $c = 1 \mu\text{g/ml}$, kolizní napětí 11

Dominantním fragmentem u drogy MXE byl fragment s diferencí 45 od $[\text{M}+\text{H}]^+$, který představuje ztrátu celé alifatické části ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ve struktuře drogy.

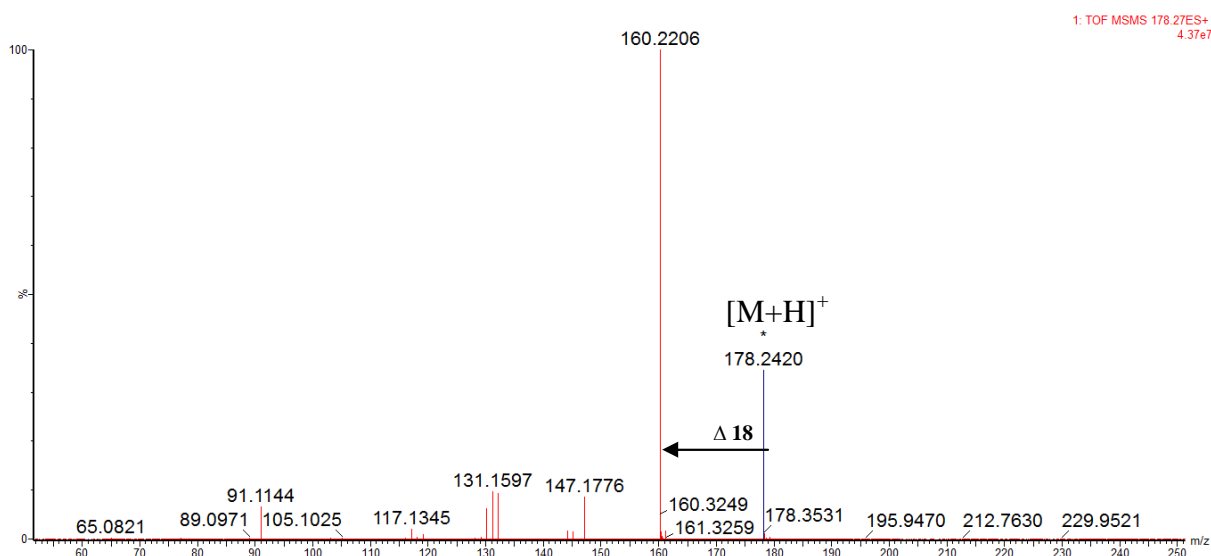


Obr. 52 Fragmentační spektrum – MXE ve směsi $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu\text{g/ml}$, kolizní
napětí 15

U obou drog 3-MMC a buphedronu byla dominantní ztráta vody, ale u 3-MMC došlo navíc k odštěpení $-CH_3$ skupiny od tohoto fragmentu.



Obr. 53 Fragmentační spektrum – 3-MMC ve směsi $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu g/ml$, kolizní napětí 9



Obr. 54 Fragmentační spektrum – BUPHEDRON ve směsi $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v/v), $c = 1 \mu g/ml$, kolizní napětí 12