

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**PŘÍMÁ IDENTIFIKACE DROG HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Michal Petreň

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2013

SOUHRN

Diplomová práce nabízí obecný popis metody hmotnostní spektrometrie, iontové mobilitní spektrometrie a ambientních ionizačních technik. Dále pojednává o možnostech využití ambientních ionizačních technik MS/IMS/MS ve forenzních vědách. Velký podíl teoretické části je věnován problematice „new designer drugs“- nových syntetických drog. V práci je zpracován přehled nejznámějších skupin nových syntetických drog, jejich účinky na lidský organismus a analytické přístupy sloužící k identifikaci popř. stanovení těchto látek.

Experimentální část práce je zaměřena na hmotnostně spektrometrickou analýzu standardů a reálných vzorků nových syntetických drog s využitím kombinace iontové mobilitní separace a hmotnostní spektrometrie za použití dvou různých iontových zdrojů – elektrosprej (ESI) a přímá sonda (ASAP). Na základě ESI-MS/IMS/MS analýz standardů drog byla vypracována přehledná tabulka obsahující všechna náležitá data (hodnoty m/z protonovaných molekul, jejich fragmentů a hodnoty drift-time) sloužící k jednoznačné identifikaci těchto látek. Hmotnostní spektra a fragmentační spektra jednotlivých látek jsou součástí přílohy. Diskutovány byly hlavní fragmentační cesty studovaných látek. Kombinace iontové mobility a hmotnostní spektrometrie bylo využito k identifikaci drog (dvou vzorků kationů) v substancích vyšetřovaných na Ústavu soudního lékařství a medicínského práva FN Olomouc. Přípravené roztoky byly analyzovány pomocí přímé sondy ASAP, na kterou byly aplikovány v množství 1 μl (koncentrace 0,5 mg/ml). Výsledky potvrdily potenciál ASAP-MS/IMS/MS např. pro screening drog zajištěných policií.

Postup QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) vyvíjený na Katedře analytické chemie pro účely identifikace opiátů v moči byl aplikován při identifikaci těchto kationů v moči. Na přečištění vzorku navazovalo měření technikou ESI-MS/IMS/MS. Již při koncentraci analyzované látky 0,1 $\mu\text{g/ml}$ moči bylo možné v hmotnostním spektru pozorovat protonovanou molekulu analytů a pořádkem fragmentační spektrum využitelné při identifikaci. Výsledky prokázaly použitelnost přístupu QuEChERS ESI-MS/IMS/MS pro analýzu vzorků moči. Testovaný postup analýzy je jednoduchý a rychlý, mohl by se stát základem metody pro průkaz studovaných nových syntetických drog v moči. Práce tak přispívá k vývoji analytických přístupů k identifikaci látek a potenciálně závažným dopadem na lidské zdraví.

SUMMARY

The thesis offers a general description of the mass spectrometry, ion mobility and ambient ionization techniques. Applications of ambient ionization techniques in forensic science are described. An important part of the thesis is focused on new designer drugs. Overview of known groups of new designer drugs, their effects on the human organism, and analytical approaches to their determination and quantitation is provided.

The experimental part describes a procedure of mass spectrometric analysis of standards and real samples of new designer drugs using a combination of ion mobility separation and mass spectrometry. Analyses were performed using two ion sources - electrospray (ESI) and atmospheric solids analysis probe (ASAP). Using ESI-MS/IMS/MS analysis of the drug standards a table containing mass of protonated molecules, their fragments and drift time values of the ions was created. All these data can be useful for identification of analyzed substances. Main fragmentation pathways are described and discussed. Mass spectra and fragmentation spectra of individual compounds are included in appendix of the thesis. Combination of ion mobility and mass spectrometry allowed identification of drugs (two cathinones) in samples investigated by Institute of Forensic Medicine and Medical Law University Hospital Olomouc. Dissolved samples were analyzed using direct probe ASAP applying 1 μ l of solution at the probe (0.5 mg/ml). The results confirm potential of ASAP-MS/IMS/MS, e.g. for screening of samples of substances collected by police.

The procedure QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) tested at Department of Analytical Chemistry UP Olomouc for identification of opiates in urine was applied for identification of mentioned cathinones in urine. After purification, ESI-MS/IMS/MS was carried out. Protonated molecules of the analytes were observed in samples at concentration level 1 μ g/ml urine. For urine samples, isolation of protonated molecules, their ion mobility separation from matrix components followed by fragmentation provided the evidence of the presence of analytes in samples. The results proved applicability of QuEChERS ESI-MS/IMS/MS approach to urine sample analysis. The thesis contributes to development of analytical methods for identification of substances with potential severe effects on human health.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Karla Lemra, Ph.D.. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne

.....

Michal Petreň

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, připomínky, cenné rady a především za čas strávený v laboratoři při řešení experimentální části této práce.

Doc. RNDr. Petrovi Ondrovi, CSc. děkuji za poskytnutí vzorků kationů, Mgr. Lucii Borovcové za spolupráci při využití metody QuEChERS.

Obsah

1.	ÚVOD.....	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Hmotnostní spektrometrie.....	9
2.2	Ambientní ionizační techniky	10
2.3	Ambientní techniky v odhalování trestné činnosti	14
2.4	Iontová mobilitní spektrometrie.....	19
2.4.1	Iontová mobilitní spektrometrie-hmotnostní spektrometrie.....	20
2.4.2	Iontová mobilitní spektrometrie v analýze drog	22
2.5	Nové syntetické drogy	23
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	Přístroje, chemikálie	34
3.2	Postup analýz na přístroji Synapt G2 S	35
3.3	Postup přípravy standardních roztoků a roztoků reálných vzorků.....	35
3.4	Extrakce metodou „QuEChERS“	36
3.5	Podmínky měření drog.....	36
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
4.1	Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie vybraných „new designer drugs“	38
4.1.1	Ionizace elektrosprejem.....	38
4.2	Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie vzorků zadržovaných drog	51
4.2.1	Ionizace elektrosprejem.....	51
4.2.2	Přímá sonda	55
4.3	Identifikace vzorků zadržovaných drog v moči.....	59
5.	ZÁVĚR.....	63
6.	POUŽITÁ LITERATURA	64
7.	SEZNAM ZKRATEK	68

8.	PŘÍLOHY	69
----	---------------	----

1. ÚVOD

Novou a zajímavou aplikací hmotnostní spektrometrie v oblasti klinické a forenzní toxikologie je analýza nových syntetických drog s využitím tzv. „ambientních ionizačních technik“, pracujících za atmosférického tlaku a teploty. Obrovskou výhodou těchto technik je možnost analýzy vzorku bez jeho předchozí úpravy nebo s velmi jednoduchou úpravou.

Dosud rutinně používané separační metody v toxikologické a forenzní praxi představují značnou časovou náročnost při úpravě vzorku, kterou ambientní ionizační techniky eliminují a ušetří tak čas, který může být v akutních případech (např. při otravách) drahocenný.

Diplomová práce nabízí obecný přehled a popisuje analytické přístupy k identifikaci popř. stanovení nových syntetických drog. Práce dále pojednává o ambientních ionizačních technikách v hmotnostní spektrometrii, iontové mobilitní spektrometrii a jejich aplikaci ve forenzních vědách. Cílem diplomové práce je ověřit možnosti identifikace „new designer drugs“ s využitím hmotnostní spektrometrie a iontové mobilitní spektrometrie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hmotnostní spektrometrie

Od vzniku hmotnostní spektrometrie uplynulo více než sto let, přičemž dlouhou dobu nebyla její budoucnost v praxi příliš příznivá a dokonce byla několikrát označována za mrtvou metodu. Až v osmdesátých letech minulého století došlo k rozvoji hmotnostní spektrometrie, která přispěla ke vzniku zcela nových, především biologických oborů a aplikací.¹ V současnosti lze hmotnostní spektrometrii považovat za velmi populární instrumentální metodu, neboť se její použití rozšířilo téměř do všech oblastí přírodních věd, např. geologie, fyziky, farmacie, chemie, toxikologie, životního prostředí, astronomie, ale i medicíny, kde se metody úspěšně využívá v nádorové diagnostice apod.²

Učebnicová definice říká, že hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická instrumentální metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na iontovou formu.^{3,4} Základním principem hmotnostní spektrometrie je separace nabitých částic, produkovaných iontovým zdrojem, v magnetickém a elektrickém poli hmotnostního analyzátoru dle jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z).

Hlavní předností této metody je možnost analyzovat vzorek různého skupenství (pevná látka, kapalina, plyn, plazma) a umožňuje analýzu čisté látky i komplikované směsi, jakou je např. biologický materiál (moč, krev, plazma, tkáň). Dalšími výhodami hmotnostní spektrometrie je nízká spotřeba vzorku při analýze, nízké detekční limity, vysoké rozlišení, rychlost analýzy a bezesporu snižující se pořizovací cena a miniaturizace přístrojů.⁵

Hmotnostní spektrometrie se dokonce prostřednictvím kriminálních seriálů dostává byť trochu zjednodušenou formou do podvědomí laické veřejnosti. Tato skutečnost poukazuje na pevné a stále se rozšiřující postavení hmotnostní spektrometrie ve forenzních vědách obecně. Metoda v této oblasti analýzy dovoluje např. zjištění prvkového zastoupení v materiálu střel, odhalení dopingu u sportovců a padělání bankovek, pančování potravin, požití a distribuci drog nebo zobrazení chemického otisku prstu s prokreslením papilárních linií.⁶ Vhodnou volbou iontového zdroje nebo s využitím kombinovaných systémů plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS, LC/MS), lze výrazně zvýšit selektivitu a umožnit identifikovat komponenty vzorku ve složité matici. Doménou hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na

zjištění jejich chemické struktury. V posledních letech se hmotnostní spektrometrie hojně využívá v proteomice, kde slouží jako nástroj pro studium struktury proteinů.⁵

2.2 Ambientní ionizační techniky

Ambientní ionizační techniky jsou techniky hmotnostní spektrometrie umožňující přímou a rychlou ionizaci látek za atmosférických podmínek (teploty a tlaku) bez předchozí úpravy vzorku nebo po jeho jednoduché úpravě. Nabízejí možnost analýzy látek různé polaroty, z široké škály matric a povrchů.^{7,8} V současné době nacházejí uplatnění v mnoha oborech (chemie, biologie, medicína, toxikologie atd.), např. při analýze drog a výbušnin,⁹ monitorování průběhu organických reakcí¹⁰ a kvality životního prostředí, v proteomice i při hmotnostně spektrometrickém zobrazování (mass spectrometry imaging, MSI).^{11,12}

Řada technik tohoto typu byla vyvinuta až v posledních několika letech, přičemž většina z nich je založena na principu elektrospreje (electrospray ionization, ESI), nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Velký počet z nich je neinvazivních a díky tomu se stávají ideálním nástrojem pro studium složení povrchů biologických vzorků. Za průlomovou techniku je považován desorpční elektrosprej (desorption electrospray, DESI), jehož princip a aplikace byly poprvé publikovány v časopise Science v roce 2004.¹³ Do dnešní doby bylo vyvinuto a popsáno více než 30 ambientních ionizačních technik, např. desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku (desorption atmospheric pressure chemical ionization, DAPCI), desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku (desorption atmospheric photoionization, DAPPI), extraktivní elektrosprej (extractive electrospray, EESI), přímá analýza v reálném čase (direct analysis in real time, DART), MALDI za atmosférického tlaku (atmospheric MALDI).

Ambientní ionizační techniky lze rozdělit do skupin dle různých parametrů. Jedním z nich může být dělení na základě způsobu desorpce/ionizace do tří základních skupin. Do první skupiny patří techniky přímé desorpce (Tabulka I), kde jsou molekuly analyzované látky v kapalině přímo ionizovány elektrickým polem bez předchozího přečištění vzorku. Druhou skupinu tvoří techniky přímé desorpce/ionizace (Tabulka II), u kterých se využívá elektricky nabitých kapek rozpouštědla nebo metastabilních iontů produkovaných ambientním ionizačním zdrojem, zprostředkovávající desorpci a ionizaci molekul z povrchu vzorku. Do třetí a zároveň poslední skupiny patří ambientní techniky s tzv. dvoustupňovou ionizací

(Tabulka III), kde je nejdříve k desorpci molekul analytu použito např. laseru, termální energie nebo aerosolu, poté jsou desorbované molekuly vedeny k post-ionizaci do ambientního zdroje.¹ Pro některé anglické názvy ionizačních technik prozatím neexistují české ekvivalenty, proto jsou v tabulkách uvedeny pouze anglické názvy.

Tabulka I – Přehled ionizačních technik přímé desorpce⁷

Název	Zkratka	Vzorek	Polarita analytu
Direct electrospray probe	DEP	kapalina	polární
Probe electrospray ionization	PESI	kapalina	polární
Paper spray ionization	PSI	kapalina	polární
Droplet electrospray ionization	Droplet ESI	kapalina	polární
Field-induced droplet ionization	FIDI	kapalina	polární
Ultrasound ionization	USI	kapalina	polární

Tabulka II – Přehled ionizačních technik přímé desorpce/ionizace⁷

Název	Zkratka	Vzorek	Polarita analytu
Desorption electrospray ionization	DESI	pevná l., kapalina	polární
Electrode-assisted desorption electrospray ionization	EADESI	pevná l., kapalina	polární
Easy ambient sonic spray ionization	EASI	pevná l., kapalina	polární
Desorption atmospheric pressure chemical ionization	DAPCI	pevná l., kapalina	polární
Low temperature plasma probe	LTP	pevná l., kapalina, plyn	polární/nepolární
Laser spray ionization	LSI	pevná l., kapalina	polární

Tabulka III – Přehled ionizačních technik dvoustupňové ionizace⁷

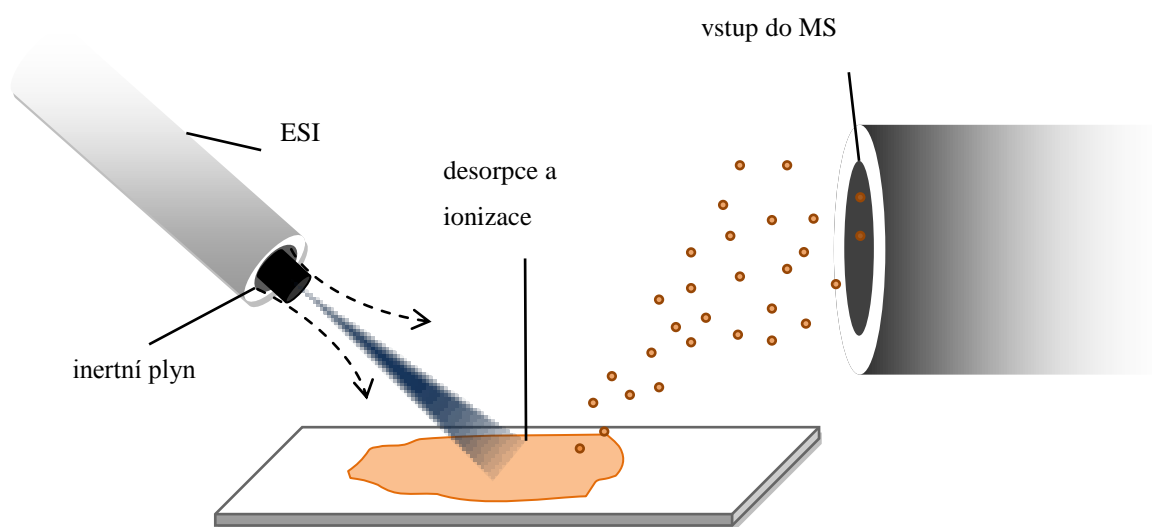
Název	Zkratka	Vzorek	Polarita analytu
Extractive electrospray ionization	EESI	kapalina, plyn	polární
Electrospray laser desorption ionization	ELDI	pevná l., kapalina	polární
Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization	MALDESI	pevná l., kapalina	polární
Atmospheric pressure thermal desorption/electrospray ionization	AP-TD/ESI	pevná l., kapalina	polární
Atmospheric pressure solids analysis probe	ASAP	pevná l., kapalina	polární/nepolární
Direct analysis in real time	DART	pevná l., kapalina, plyn	polární/nepolární

Popis jednotlivých ambientních ionizačních technik přesahuje rámec této práce, proto bude v následujícím textu pojednáno pouze o vybraných technikách se zaměřením na ty, které jsou významněji využívány na Katedře analytické chemie PŘF UP, nebo budou použity v experimentální části práce.

Desorpční elektrosprej (desorption electrospray ionization, DESI)

Desorpční elektrosprej (Obr. 1) je měkkou ionizační technikou, která vychází z principu elektrospreje. Při atmosférickém tlaku a teplotě je za pomoci elektrospreje, umístěného pod určitým úhlem a v určité vzdálenosti od vzorku, sprejována kapalina (často směs voda – methanol v poměru 1:1), která vytváří nabitě kapičky. Při styku nabitých kapiček se vzorkem dochází k desorpci a následné ionizaci molekul analyzovaných látek. Po stranách sprejovací kapiláry proudí inertní plyn (zpravidla N₂), který napomáhá procesu desorpce/ionizace.¹⁴

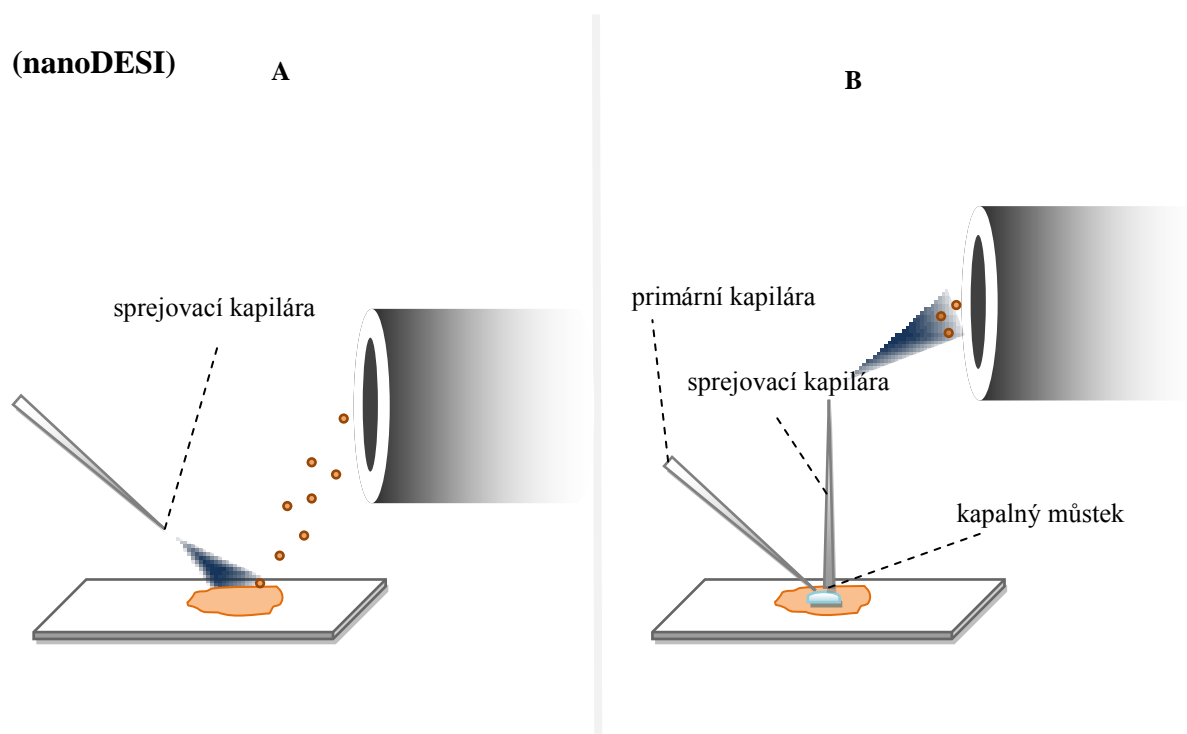
(DESI)



Obr. 1 – Schéma desorpčního elektrospreje (DESI)

Modifikací DESI s odlišnou geometrií, která nevyužívá zmlžujícího plynu je tzv. desorpční nanoelektrosprej (desorption nano-electrospray ionization, nanoDESI). Existují dvě odlišné verze této techniky, mající jiné geometrické uspořádání (Obr. 2).^{15,16} První z nich je

konstrukčně podobný klasickému desorpčnímu elektrospreji s absencí inertního plynu. Používaná kapilára dosahuje průměru jednotek μm a samotný elektrosprej je pohyblivý ve všech směrech. Druhá varianta nanoDESI využívá dvou kapilár navzájem propojených tzv. kapalným můstkem. Jedna kapilára (primární) přivádí rozpouštědlo k desorpci analytů z povrchu vzorku a udržuje kapalnou můstek mezi kapilárami, zatímco druhá kapilára (nanosprej) sprejuje desorbované molekuly za jejich ionizace. Pomocí vloženého napětí mezi primární kapilárou a vstupem do hmotnostního analyzátoru odsává sprejovací kapilára desorbované molekuly zcela nezávisle.



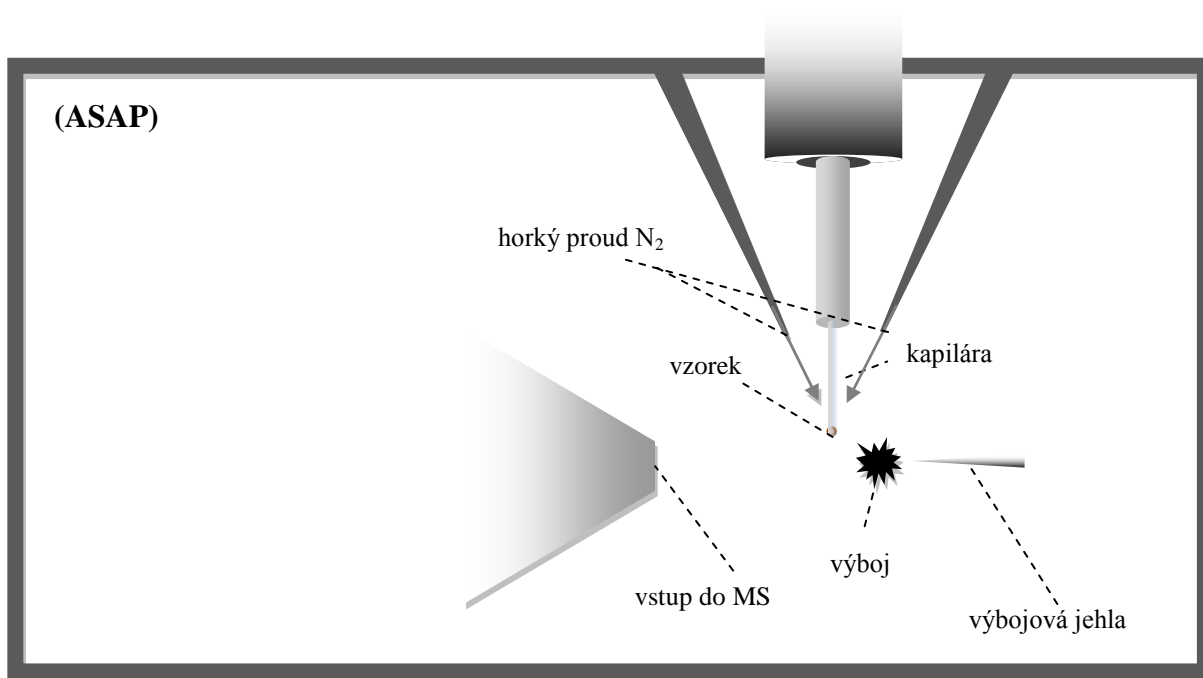
Obr. 2 - Schématické znázornění dvou možných uspořádání nanoDESI

Atmospheric solids analysis probe (ASAP)

Tato ambientní ionizační technika byla vyvinuta pro rychlou analýzu málo těkavých a těkavých organických látek v kapalných či pevných vzorcích. ASAP využívá horkého proudu N_2 , který dopadá na povrch vzorku a napomáhá desorpci analytu (Obr. 3). Poté proud dusíku vede desorbované analyty k hrotu APCI jehly, kde dochází k jejich ionizaci za pomoci koronového výboje. Technika disponuje možností analyzovat nepolární látky, které pomocí ESI, APCI a APPI nelze ionizovat s vysokou citlivostí, a také umožňuje analyzovat složité směsi látek bez

předchozí úpravy vzorku. Doba analýzy je velmi krátká (i několik sekund, což ale může být nevýhodou z důvodu vyčerpání vzorku pro složitější měření) a stačí i 1 μl vzorku.

Pomocí této techniky bylo analyzováno několik typů látek, jako např. částice vzduchu, polymery, steroidy, drogy, výbušniny nebo biologické tekutiny.⁷



Obr. 3 – Schéma iontového zdroje ASAP

2.3 Ambientní techniky v odhalování trestné činnosti

Forenzní, soudní či kriminalistická chemie je nedílnou součástí multidisciplinární forenzní vědy, která prostřednictvím dostupných analytických, biologických, biochemických, fyzikálních a dalších metod napomáhá účinnému a efektivnímu dosažení spravedlnosti při vyšetřování trestné činnosti.

Metody vhodné pro forenzní účely by měly být citlivé, specifické a poskytovat co nejméně falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Tyto vlastnosti jsou důležité zejména při odhalování organizované trestné činnosti, jako jsou teroristické útoky, kde je ohroženo mnoho lidských životů. Dále je pro forenzní chemii důležité, aby důkaz získaný při analýze byl akceptovatelný i při soudním řízení. Metody by tedy měly zajišťovat přesnost a opakovatelnost analýzy, aby nedocházelo k nespravedlivému odsouzení.

V současné době jsou ve forenzní analýze běžně využívány separační techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Stopová analýza anorganických látek a speciální analýza kovů, např. v moči, vlasech, krvi nebo plazmě, je doménou metody indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní spektrometrií (Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry, ICP/MS)¹⁷ a hmotnostní spektrometrie izotopického poměru (Isotopic Ratio-Mass Spectrometry, IR-MS).¹⁸ Tradiční techniky GC/MS, LC/MS se ve forenzních aplikacích běžně používají např. pro identifikaci a stanovení drog^{19,20}, půdních kontaminantů²¹ či výbušnin.²² Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance FT-ICR) je technikou hmotnostní spektrometrie, poskytující ultra vysoké rozlišení při charakterizaci chemické struktury vzorku, ale je finančně velmi nákladná a časově náročná. Iontová mobilitní spektrometrie (Ion Mobility Spectrometry, IMS)²³ je používána pro screening výbušnin na letištích, může ovšem poskytovat falešně pozitivní výsledky. K analýze DNA a mitochondriálnímu DNA profilování se kromě biochemických metod využívá ionizace elektrosprejem MS (ESI-MS). Skenovací elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM) slouží k analýze povýstřelových zplodin²⁴ a termální desorpce MS (Thermal Desorption, TD-MS) umožňuje analýzu drog z různých povrchů, např. bankovky.²⁵

I když jsou chromatografické techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií vzhledem ke své citlivosti a snadné automatizovatelnosti nezastupitelné ve forenzní analýze, vyžadují úpravu vzorku před vlastní analýzou (extrakce, derivatizace), která bývá často zdlouhavá. Možnost analyzovat vzorky bez předchozí úpravy, v relativně krátkém čase, mnohdy s vysokou citlivostí, selektivitou, navíc za atmosférického tlaku a teploty dovolují ambientní ionizační techniky hmotnostní spektrometrie.

Mezi slibné techniky ve forenzních aplikacích patří desorpční elektrosprej (DESI), přímá analýza v reálném čase (Direct Analysis in Real Time, DART), desorpce-ionizace za účasti plazmy (Plasma Assisted Desorption Ionization, PADI) a extraktivní elektrosprej (Extractive Electrospray Ionization, EESI).

Ionizační technika DESI byla vyvinuta Cooksem a kol¹³ a jak již bylo uvedeno výše, k desorpci a ionizaci využívá klasického elektrospreje. DESI nabízí obrovský potenciál v širokém rozsahu forenzní analýzy, např. identifikace padělaných léčiv, environmentální analýza a analýza biologických vzorků. DART byla vyvinuta v téměř stejném období jako DESI Codym a kol.²⁶ a stejně jako u DESI se ukázalo možné uplatnění DART v analýze

nejrůznějších chemických látek a biologických vzorků. DART k ionizaci využívá metastabilních molekul inertního plynu (N_2 , He). PADI je relativně nová technika, vyvinutá McCoustramem a kol.,²⁷ která desorbuje/ionizuje molekuly z povrchu vzorku pomocí nízkoteplotního plazmtu. Konečně technika EESI, vyvinuta Zenobim a kol.,²⁸ využívá oproti klasickému ESI dvě sprejovací kapiláry. Jednou je přiváděn a zmlžován vzorek, zatímco druhou kapilárou jsou vytvářeny nabitě kapičky rozpouštědla, které při srážce se zmlženým vzorkem ionizují molekuly analytu. EESI umožňuje přímou analýzu kapalných vzorů, např. mléka, moče a odpadních vod.

Výbušniny

Pro detekci výbušnin je dostupná široká škála technik, z nichž nejrozšířenější a jedna z nejlepších metod je IMS, která se běžně používá pro screening výbušnin na letištích. Technika je úspěšná díky vysoké citlivosti, přenositelnosti a rychlé analýze, avšak přesnost IMS je o něco horší. Existují totiž molekuly s podobnou iontovou mobilitou jako sledované molekuly výbušnin a tento fakt může zapříčinit falešně pozitivní výsledky měření. MS je pro analýzu výbušnin neméně vhodná, neboť splňuje vysokou citlivost a rychlost analýzy. Navíc MS oproti IMS zajišťuje velmi spolehlivé výsledky měření a za použití ambientních ionizačních technik přímé desorpce patří MS k novým velmi výkonným metodám detekce výbušnin. Několik publikací bylo věnováno využití DESI pro přímou detekci výbušnin, např. hexogenu (RDX), oktogenu (HMX), trinitrotoluenu (TNT) a pentritu (PENT).^{29,30,31} Desorpce molekul analyzovaných látek byla s úspěchem provedena z různých povrchů, jako např. z textilie, plastu, papíru i lidské kůže. Dalšími technikami, které byly popsány a které lze využít pro detekci výbušnin jsou PADI, DART nebo nově „Low-Temperature Plasma“ (LTP)³² a helium plasma ionization (HePI).³³ Pro ilustraci je třeba uvést, že při analýze PENT dosahuje DESI limitů detekce až 100 pg, LTP poskytuje při analýze TNT dokonce LOD 500 fm a HePI dokáže detekovat množství až 0,01 ng TNT na 1 mm² filtračního papíru, ze kterého byl TNT desorbován.

Chemické a biologické zbraně

Z důvodu hrozby mezinárodního terorismu a rizika použití biologických a chemických zbraní je potřeba monitorovat životní prostředí kolem nás. Většina metod analýzy životního prostředí využívá GC/MS a nověji například mikroextrakce tuhou fází (Solid-Phase

Microextraction, SPME) ve spojení s LC/MS nebo přímou hmotnostní spektrometrií sekundárních iontů (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS). DESI nachází své uplatnění, stejně jako v analýze výbušnin i v analýze chemických a biologických zbraní. Tuto aplikaci popsal ve svých pracech D'Agostino a kol., který využíval DESI ve spojení s SPME vláknem k analýze tabunu (TB), sarinu (GB) a organofosfátů.^{34,35}

Detekce na místě činu

Nedávné pokroky v miniaturizaci hmotnostních spektrometrů přispěly k vyvinutí tak malých přístrojů, že je lze bez problému přenášet a v případě potřeby použít přímo na místě činu. Velikost hmotnostních spektrometrů je přirovnávána k velikosti krabice od bot a jejich hmotnost se pohybuje okolo 5 kg. Příkladem takových přístrojů jsou hmotnostní spektrometry, nesoucí označení MINI 10 a MINI 11 vyvinuté Cooksem a Ouyangem.³⁶ Detekční limity se pohybují v jednotkách ppb a lze jimi pořídit i spektrum proteinů. V kombinaci s iontovým zdrojem DESI nebo DART mohou být tyto systémy použity ke kontrole přímo na místech, kde je to třeba, např. k analýze výbušnin z různých povrchů, kde technika DESI dosahuje LOD od 500 pg/cm² do 1 μg/cm² dle druhu výbušniny.³⁷

Léčiva

Rychlá a účinná analýza tablet může dopomoci např. k identifikaci legálních a ilegálních drog či léčiv nebo k odhalení padělaných léčiv. Konvenční metody využívané k tomuto účelu (GC/MS, LC/MS) vyžadují velké množství kroků v samotné úpravě vzorku a separaci látek. Celá procedura může trvat i několik hodin, než je získán uspokojivý výsledek. Ambientní ionizační techniky umožňují analyzovat léčiva a drogy přímo v tabletách, gelech a rostlinných materiálech (marihuana). Řada studií využívá ambientních technik DESI, DART a PADI pro analýzu účinných látek v tabletách. Techniky umožnily identifikovat paracetamol, indometacin, kortizon, hydrokodon, kyselinu listovou, aspirin, kodein, extázi^{37,38} a mnoho jiných látek obsažených v tabletách. DESI byla úspěšně použita také při identifikaci účinných látek přímou analýzou gelů a krémů.⁹ DESI a DART také dovolili rozlišit originální a padělaná léčiva, např. při analýze antimalarik.³⁹

Drogy v moči

Detekce popř. kvantifikace drog a jejich metabolitů v biologických maticích (krev, moč) se v praxi provádí nejčastěji metodou LC/MS, která dovoluje analyzovat látky o různé molekulové hmotnosti a polaritě s dobrou citlivostí (pg/ml), což je pro přesnou kvantifikaci nezbytné. Nicméně LC/MS analýza může být komplikována vlivem matričního efektu, proto je velmi důležitá úprava vzorku, na které je výsledek analýzy závislý. Ambientní ionizační techniky nabízí přímou, rychlou a relativně citlivou analýzu vzorku s minimální předchozí úpravou, i když i zde je třeba zvažovat možné matriční efekty. Jak bylo popsáno ve studii Kauppila a kol.,⁴⁰ je technika DESI aplikovatelná pro analýzu drog v moči, jako např. opiátů, kanabinoidů, benzodiazepinů a amfetaminů. Úprava vzorku představuje jednoduchou extrakci kapalinou a aplikaci extraktu na teflonovou destičku, ze které probíhá desorpce. Ve studii bylo zjištěno, že signál polárních benzodiazepinů (alprazolam) vzrůstá při sprejování vody, zatímco signál nepolárních opiátů významně vzrůstá za použití sprejovací kapaliny tvořené acetonitrilem a vodou (90:10, v/v). Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 270 – 8840 ng/ml. Při použití SPE extrakce lze výrazně posunout LOD k nižším hodnotám, jak bylo publikováno Zhangem a kol.⁴¹ při analýze klenbuterolu. Autorům se podařilo za použití SPE snížit LOD z 1 µg/ml na 2 ng/ml. Své uplatnění v analýze drog v moči nalézá také DART a EESI. Zajímavá je studie Zhao a kol.,⁴² která se zabývá analýzou standardů herbicidů v moči. Cílem bylo zjistit, zda bude možné pomocí EESI analyzovat vzorek moči přímo, bez jakékoliv úpravy. Ukázalo se, že metoda EESI může být potenciálně velmi zajímavá pro analýzu drog v moči nebo plazmě, neboť dokázala spolehlivě detekovat množství 0,2-0,4 fg přidaného standardu herbicidu.

Dech

Analýza dechu může poskytnout informace o podezřelém. Jaké bylo jeho poslední jídlo, zda požil alkohol nebo jestli užíval drogy. Současné metody analýzy dechu, jako např. „Proton Transfer Reaction“ MS (PTR-MS) a „Selected Ion Flow Tube“ MS (SIFT-MS), vyžadují zdlouhavý odběr vzorku a jeho úpravu. Navíc využívají speciální instrumentace, která dokáže stanovit relativně malé a těkavé látky. Zenobi s kol.⁴³ ukázal, že EESI může být užitečný při přímé analýze dechu. Na rozdíl od ostatních metod je za použití EESI dech zaváděn přímo k elektrospreji, a tím urychlena analýza. Tímto způsobem lze dostat tzv. „otisk dechu“, který může být důležitý při vyšetřování trestného činu.

Dokumenty

Ověřování pravosti dokumentů patří k nezanedbatelným úkolům ve forenzní chemii. Ten často vyžaduje analýzu barvy (inkoustu) použité v dokumentu a určit případný zásah do jeho obsahu. Analýza obvykle zahrnuje destrukci dokumentu při extrakci inkoustu organickými rozpouštědly pro chromatografickou separaci. Nový přístup přináší technika DESI, která je nedestruktivní a rychlá. Na základě charakteristických iontů pro daný inkoust dokáže DESI sestavit „obrázek“ v podobě distribuce těchto iontů, a tak lze určit přesné místo v dokumentu, které bylo změněno.⁴⁴

Otisky prstů

Identifikace podezřelého na základě otisků prstů má ve forenzní vědě dlouhou historii. Stejně jako při zobrazování padělaných dokumentu se DESI využívá k zobrazování otisků prstů. DESI má prostorové rozlišení $\geq 150 \mu\text{m}$, což stačí k rozeznání hřebenů a údolí papilárních linií otisků prstů. Na základě chemického složení otisku prstu dokáže DESI vykreslit relativně přesný otisk prstu. Navíc dokáže identifikovat přítomnost jiných látek, jako např. drogy a výbušniny. Otisky prstů lze pomocí DESI zobrazit z různých materiálů, jakými jsou sklo, plast nebo papír.⁴⁵

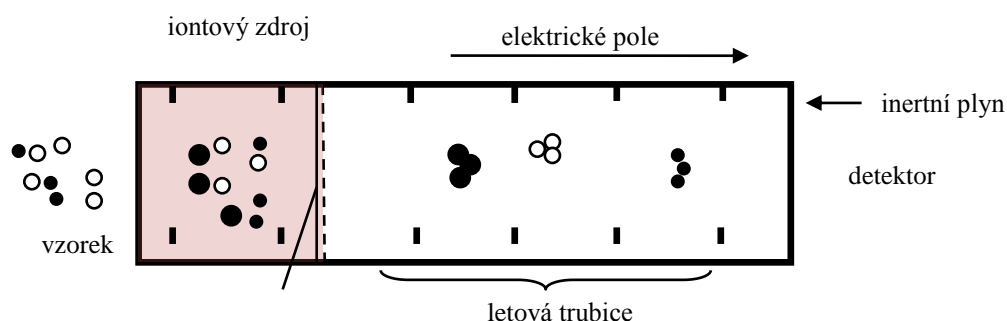
2.4 Iontová mobilitní spektrometrie

Iontová mobilitní spektrometrie (Ion Mobility Spectrometry, IMS) umožňuje dělení iontů v plynné fázi nikoli dle hodnoty m/z , ale na základě rozdílné rychlosti průchodu letovou trubicí naplněné inertním plynem. Je zde určitá podobnost IMS s elektromigračními separačními technikami, neboť se ionty během průchodu seřadí podle svých mobilit. Ty závisí na nábojovém stavu iontu a jeho účinném kolizním průřezu, jenž je dán především tvarem iontu.⁴⁶

Základní instrumentace samotné IMS (Obr. 4) se skládá z iontového zdroje a letové trubice. K ionizaci látek se využívá obvykle β^- zářič ^{63}Ni nebo nověji ^{241}Am , který produkuje α částice a γ záření. Vzniklé ionty jsou urychleny elektrickým polem a v letové trubicí separovány dle svých mobilit.⁴⁶

Metoda je známá již od 50. let 20. století a nalézá své uplatnění hlavně ve forenzních aplikacích (drogy, výbušniny) a pro vojenské účely (bojové chemické látky). IMS je vhodnou metodou pro tyto účely především kvůli nízkým limitům detekce a miniaturizaci přístrojů. IMS přístroje byly vhodně upraveny, aby jejich použití bylo co nejjednodušší a mohli je tak používat i nevědečtí příslušníci bezpečnostní služby nebo vojska.⁴⁷

Separace pomocí IMS probíhá řádově v milisekundách, což je oproti chromatografickým metodám velkou výhodou. Snad i proto se IMS stává silným nástrojem pro separaci látek, který zaznamenává velký rozvoj ve zmíněných oblastech.



Obr. 4 – Schématický náčrt IMS přístroje (převzato cit.⁶⁶)

2.4.1 Iontová mobilitní spektrometrie-hmotnostní spektrometrie

V poslední době se rozšiřuje do laboratoří spojení iontové mobilitní spektrometrie s hmotnostní spektrometrií (IMS/MS). Jedná se o přístroje kompatibilní s iontovými zdroji a analyzátory využívanými v hmotnostní spektrometrii. V současnosti umožňují IMS/MS systémy pohodlně využívat ambientní ionizační techniky, jakými jsou např. DESI, ASAP, nebo EESI. Vhodným analyzátozem pro IMS/MS systémy se ukázal být analyzátor doby letu (TOF), a to především proto, že má nejrychlejší sběr dat. Může tak v mikrosekundovém měřítku získat mnoho spekter. Dalšími běžně používanými analyzátory v IMS/MS jsou kvadrupólové hmotnostní analyzátory, lineární iontové pasti a dokonce i iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, což je výhodné z hlediska zvýšení lineárního dynamického rozsahu a rozlišení. IMS dokáže separovat izomery, izobary, konformery a

strukturně podobné ionty. Navíc efektivně redukuje chemický a náhodný šum. Na druhou stranu je třeba zmínit vyšší pořizovací náklady těchto přístrojů.⁴⁸

IMS/MS přístroje se obvykle skládají ze čtyř základních částí (Obr. 5)⁴⁸:

- 1) *iontový zdroj*, např. MALDI, ESI, který generuje ionty;
- 2) *IMS cela*, kde nabitě částice migrují vlivem elektrického pole;
- 3) *hmotnostní analyzátor*, typicky TOF analyzátor zajišťující rychlý sběr dat v širokém lineárním dynamickém rozsahu;
- 4) *detektor*.

Existují čtyři hlavní typy IMS cel, využívající se v IMS/MS:

a) *„Drift-Time Ion Mobility Spectrometry“ (DT-IMS)*

Nejjednodušší konfigurace, známá také jako konvenční IMS, kde lze kolizní průřez vypočítat přímo bez nutnosti kalibrace. Poskytuje nejvyšší rozlišovací schopnost. Dovoluje pracovat za atmosférického či sníženého tlaku.

b) *„Differential Ion Mobility Spectrometry“ (DMS nebo FAIMS)*

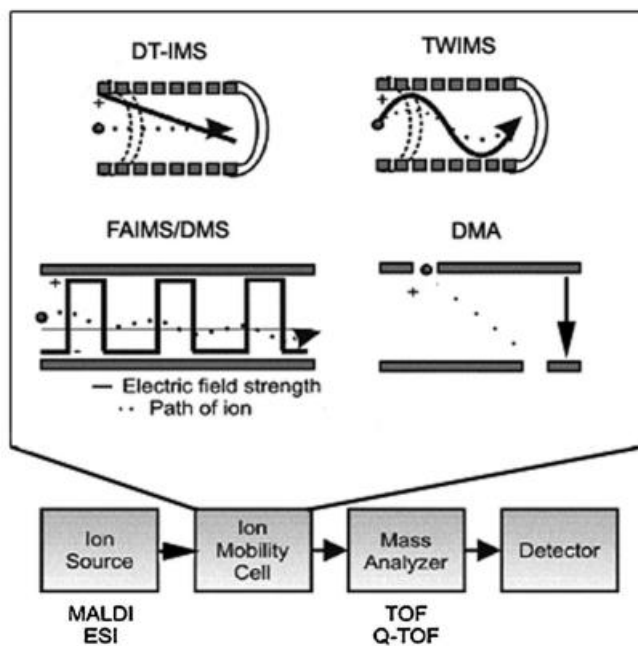
Základním principem je vedení iontů do prostoru s elektrodami a proudů plynu, jako transportního média. Na elektrody je vkládáno po krátký časový interval vysoké napětí a následně nízké napětí po delší dobu. Tato napěťová vlna se překrývá s tzv. kompenzačním napětím, které zajišťuje stabilní trajektorii iontů analytu. Tento proces efektivně pracuje jako tzv. iontový filtr. Konfigurace s cylindrickou elektrodou se říká FAIMS, zatímco konfigurace s paralelními destičkami elektrod nese označení DMS.

c) *„Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry“ (TWIMS)*

Metoda je založena na separaci iontů pomocí série napěťových pulzů v tzv. „traveling wave“. TWIMS přístroje mají poměrně nízkou rozlišovací schopnost, ale lze získat kolizní průřez z kalibrace známými standardy. U TWIMS s TOF-MS byl zajištěn rychlý sběr dat a bylo dosaženo dobré citlivosti. Na komerčním přístroji s tímto typem mobility byly prováděny i experimenty v rámci diplomové práce.

d) „*Differential Mobility Analyzer*“ (DMA)

DMA kombinuje působení elektrického pole a rychlého proudu plynu. Pouze ionty o definované mobilitě jsou přenášeny do výstupní štěrbině vedoucí do vstupu MS.



Obr. 5 - Blokové schéma IMS/MS a základní typy IMS cel. (převzato cit⁴⁸)

2.4.2 Iontová mobilitní spektrometrie v analýze drog

Jak již bylo zmíněno výše, IMS prochází rychlým vývojem a popularitu si získává především ve forenzních aplikacích, např. v analýze výbušnin, drog nebo bojových chemických látek. V oblasti aplikace IMS pro analýzu „new designer drugs“ byla nalezena pouze jedna vědecká práce⁴⁹, která se zabývá IMS analýzou MDMA a MDEA. Byla vyvinuta IMS metoda s využitím trihexylaminu, jako vnitřního standardu pro rychlý screening těchto látek ve vlasech.

2.5 Nové syntetické drogy

Název „nové syntetické drogy“ je český ekvivalent pro „new designer drugs“, jenž zahrnuje širokou skupinu psychotropních látek, které se distribuují na ilegálních i legálních trzích. Tzv. „design“ spočívá v pozměnění chemické struktury drog, které jsou již legislativně řazeny mezi zakázané látky, a tak získat nové drogy s obdobným účinkem s možností distribuce „legální“ cestou.⁵⁰ Pro ilustraci je třeba uvést, že nejpopulárnější drogou tohoto typu byla již od osmdesátých let minulého století tzv. „taneční droga“ – extáze. Chemicky se jedná o 3,4-methylendioxy-N-methylamfetamin (dále jen MDMA) a původně měla sloužit jako anorektikum pod patentovou ochranou firmy Merck (1914). Tato látka nebyla ovšem nikdy komerčně vyráběna a v této souvislosti používána. Za jejího znovuobjevitele je považován americký chemik prof. Alexandr Shulgin, který jako první podrobně popsal empatogenní účinky MDMA. Na počátku 70. let se začaly objevovat zmínky o zneužívání MDMA v USA a během jednoho desetiletí došlo k nárůstu popularity extáze nejen v USA, ale i v Evropě.^{51,52} V roce 1985 byla extáze zakázána a její distribuce pokračovala tzv. černým trhem dodnes.⁵³

Většina nových syntetických drog je dlouhodobě známa, stejně jako jejich psychotropní účinek, takže označení „nové“ je poněkud neopodstatněné. Nicméně se na drogové scéně začaly tyto látky objevovat společně s nárůstem popularity extáze stále častěji. Jedná se především o látky mající účinek podobný extázi, které bývají distribuovány v tabletové formě a látky halucinogenní s účinkem obdobným LSD nebo mezkalinu.⁵¹

Existuje hned několik důvodů, proč se s těmito látkami setkáváme stále častěji. Jedním je snaha ilegálních výrobců obejít legislativní normy a vyrobit drogu, která prozatím není na seznamu zakázaných drog nebo jejíž prekurzory nejsou monitorovanými substancemi. Názorným příkladem výroby a distribuce nových drog v ČR je rozšířená síť prodejen nesoucí název Amsterdam shop, která vznikla v Polsku. V důsledku pohotových novel legislativy tamějších zákonodárců byli podnikatelé nuceni obchody částečně nebo zcela zrušit a zamířili na území ČR, kde způsobili rozruch ve společnosti. V současné době je počet prodejen v ČR díky legislativě značně omezen, ale bohužel se je nepodařilo eliminovat zcela. Filozofie prodejen je založena na distribuci legálních i ilegálních drog formou upomínkového či sběratelského předmětu, který není určen ke konzumaci. Tímto způsobem se prodejci vyhýbají mnohým úskalím.⁵⁰ Dalším důvodem zviditelňování nových drog je bezpochyby ochota mladých lidí vyhledávat vzrušující zážitky, které jim designované drogy poskytují.

Je třeba brát v úvahu, že kromě žádaných pocitů vyvolaných novou drogou se mohou dostavit i nebezpečné nežádoucí účinky této drogy a ty mohou mít fatální následky na lidské zdraví. Nebezpečnost nových drog tkví v neznámosti jejich farmakologických či toxikologických účinků. Ty jsou často popisovány pouze experimentátory nebo ze vzácných případů, kdy byl hospitalizován jedinec těmito látkami intoxikovaný.

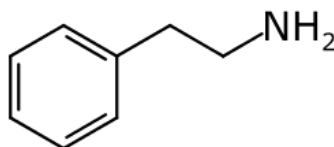
Mezi nové syntetické drogy patří zejména látky odvozené od fenylethylaminu, kationu a tryptaminu, dále např. nitráty, ketamin nebo fencyklidin.

Mechanismus účinku nově designovaných drog

Ve většině případů ovlivňují nové drogy přenos vzruchu. V zakončení jedné nervové buňky jsou obsaženy látky tzv. neurotransmitery, které se při přenosu vzruchu vyplavují do synaptické štěrbině a navázáním na receptor druhé nervové buňky tuto buňku utlumí nebo aktivují. Prvním mechanismem účinku těchto látek je přímý účinek na receptorech způsobený jejich substitucí za přirozený neurotransmitter. Druhým mechanismem je zamezení zpětného přenosu neurotransmiteru do nervového zakončení buňky, a tím dochází ke zvýšení jeho koncentrace v synaptické štěrbině. Třetím mechanismem je zvýšení vyplavování neurotransmiterů ze zakončení nervových buňek. Čtvrtým mechanismem je inhibice enzymů (především monoaminoxidázy MAO) zodpovědných za odbourávání neurotransmiterů v synaptické štěrbině.⁵¹

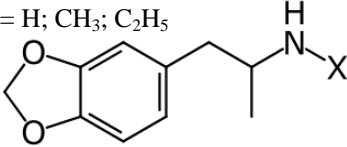
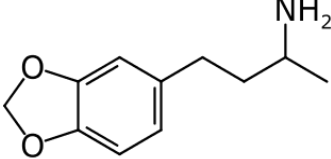
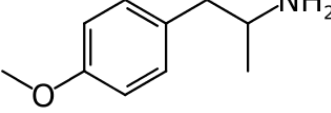
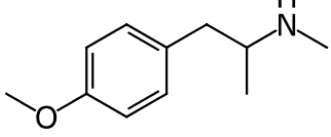
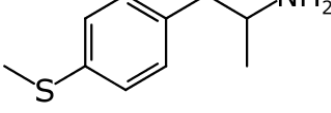
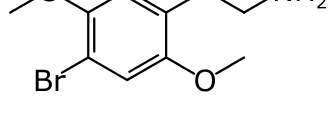
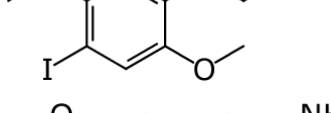
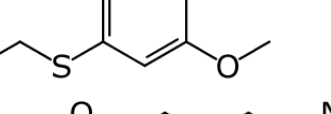
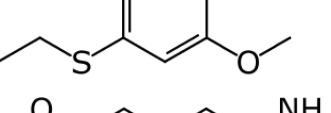
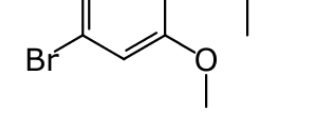
Fenylethylaminy

Samotný fenylethylamin (Obr. 6) je přírodní látka bez psychotropních účinků, která se nachází v řadě rostlin (brukev zelná, jmelí bílé) a jako hormon v lidském těle a vzniká dekarboxylací aminokyseliny fenylalaninu. Fenylethylaminy zahrnují více než 200 různých látek, z nichž většina má psychotropní účinky. Jedná se především o látky se stimulačními, entaktogenními a halucinogenními účinky, mezi které řadíme klasické amfetaminy, MDMA, MDEA, MDA, DOB a další. Následující tabulka (Tabulka IV) shrnuje nejběžnější fenylethylaminy.

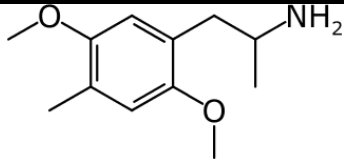


Obr. 6 – Strukturní vzorec fenylethylaminu

Tabulka IV – Přehled vybraných fenylethylaminů

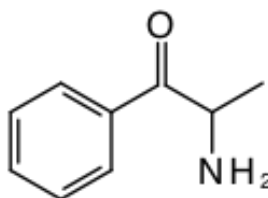
Strukturní vzorec	Systematický název (IUPAC) ⁵⁴	Zkratka
<p>X = H; CH₃; C₂H₅</p> 	<p>1-(1,3-benzodioxol-5-yl)propan-2-amin 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-methylpropan-2-amin 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-ethylpropan-2-amin</p>	<p>MDA MDMA MDEA</p>
	<p>N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butamin</p>	<p>MBDB</p>
	<p>1-(4-methoxyfenyl)-N-methyl-propan-2-amin</p>	<p>PMA</p>
	<p>1-(4-methoxyfenyl)-N-methyl-propan-2-methylamin</p>	<p>PMMA</p>
	<p>1-[4-(methylthio)fenyl]propan-2-amin</p>	<p>4-MTA</p>
	<p>2-(4-bromo-2,5-dimethoxyfenyl)ethanamin</p>	<p>2C-B</p>
	<p>2,5-dimethoxy-4-jodofenethylamin</p>	<p>2C-I</p>
	<p>2-[2,5-dimethoxy-4-(propylthio)fenyl]ethanamin</p>	<p>2C-T-7</p>
	<p>2-[4-(ethylthio)-2,5-dimethoxyfenyl]ethanamin</p>	<p>2C-T-2</p>
	<p>1-(4-bromo-2,5-dimethoxyfenyl)propan-2-amin</p>	<p>DOB</p>

Tabulka IV – Přehled vybraných fenylethylaminů – pokračování

Strukturní vzorec	Systematický název (IUPAC) ⁵⁴	Zkratka
	1-(2,5-dimethoxy-4-methylfenyl)propan-2-amin	DOM

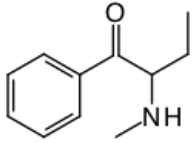
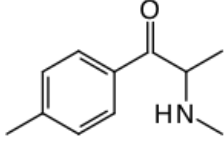
Katinony

Tato skupina látek je odvozena od katinonu (benzoylethanamin) (Obr. 7), což je alkaloid obsažený v tropické rostlině katě jedlé (*Catha edulis*), rostoucí ve východní Africe a na Arabském poloostrově. Svými účinky se velmi podobá efedrinu a dalším amfetaminům. Chemicky se jedná o látky podobné právě amfetaminům (fenylethylaminům), které obsahují navíc ketonovou funkční skupinu v poloze 1. Mezi nejznámější látky této skupiny je možno uvést např. mefedron, methylon nebo methkathinon. Tabulka V uvádí přehled vybraných katinonů.^{55,56}

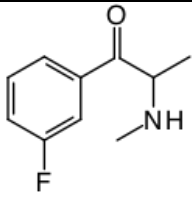
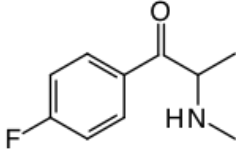
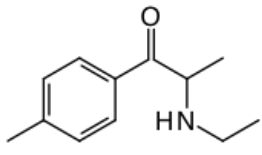
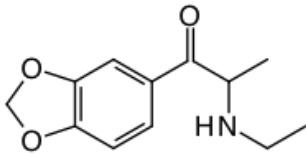
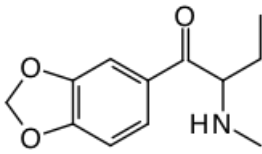
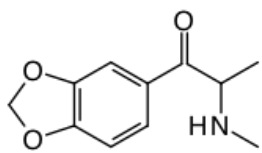
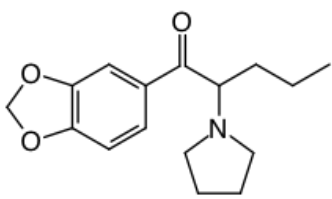
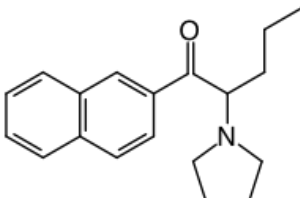


Obr. 7 – Strukturní vzorec katinonu

Tabulka V – Přehled vybraných katinonů

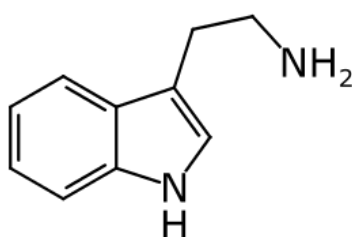
Strukturní vzorec	Systematický název (IUPAC) ⁵⁴	Zkratka
	2-(methylamino)-1-phenylbutan-1-on	MABP
	2-(methylamino)-1-(4-methylfenyl)propan-1-on	3-MMC

Tabulka V – Přehled vybraných katinonů – pokračování

Strukturní vzorec	Systematický název (IUPAC) ⁵⁴	Zkratka
	2-methylamino-1-(3-fluorophenyl)propan-1-on	3-FMC
	1-(4-fluorophenyl)-2-methylaminopropan-1-on	4-FMC
	2-ethylamino-1-(4-methylphenyl)propan-1-on	4-MEC
	1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(ethylamino)propan-1-on	MDEC
	1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-on	bk-MBDB
	2-methylamino-1-(3,4-ethylenedioxyfenyl)propan-1-on	bk-MDMA
	1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-on	MDPV
	1-naftalen-2-yl-2-pyrrolidin-1-ylpentan-1-on	NRG-1

Tryptaminy

Jak již samotný název skupiny napovídá, jedná se o látky mající za základ své struktury tryptamin. Tryptamin (Obr. 8) je alkaloid obsažený v různých rostlinách, houbách i živočiších. Předpokládá se, že v těle savců plní úlohu neurotransmiteru serotoninu, neboť je mu svou chemickou strukturou velmi podobný. Látky odvozené od tryptaminu jsou halucinogenní povahy a patří mezi ně např. DMT, AMT, DIPT nebo psilocin (4-OH-DMT). Tabulka VI uvádí příklady některých známých tryptaminů.⁵¹

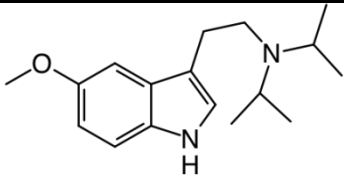
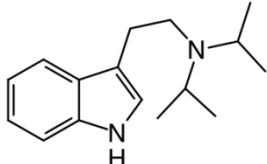


Obr. 8 – Strukturní vzorec tryptaminu

Tabulka VI- Přehled vybraných tryptaminů

Strukturní vzorec	Systematický název (IUPAC) ⁵⁴	Zkratka
<chem>CN(C)CCc1c[nH]c2ccccc12</chem>	2-(1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylethanamin	DMT
<chem>CN(C)CCc1c[nH]c2ccc(OC)cc12</chem>	2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylethanamin	5-MeO-DMT
<chem>CC(N)CCc1c[nH]c2ccccc12</chem>	2-(1H-indol-3-yl)-1-methyl-ethylamin	AMT
<chem>CC(N)CCc1c[nH]c2ccc(OC)cc12</chem>	1-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)propan-2-amin	5-MeO-AMT

Tabulka VI- Přehled vybraných tryptaminů – pokračování

Strukturní vzorec	Systematický název (IUPAC) ⁵⁴	Zkratka
	3-[2-(diisopropylamino)ethyl]-5-methoxyindol	5-MeO-DIPT
	3-[2-(diisopropylamino)ethyl]indol	DIPT

Ostatní nové syntetické drogy

První zmiňovanou látkou patřící do skupiny nových syntetických drog je gamahydroxybutyrát (GHB), označovan také jako tzv. tekutá extáze. Při nízkých dávkách má tato látka stimulační účinky a navozuje mírné pocity euforie. Při vyšších dávkách má výrazné anestetické účinky. Zneužívá se velmi často, a to zejména v kombinaci s jinými drogami a alkoholem, což může být velmi nebezpečné.

Dalšími látkami, které vykazují halucinogenní účinek při nižších dávkách a anestetický účinek při dávkách vyšších, jsou ketamin a fencyklidin (PCP). Ketamin je anestetikem běžně používané v humánní i veterinární praxi. PCP je taktéž anestetikum, ale k tomuto účelu je registrováno pouze v některých státech.

Poslední neméně důležitou skupinou látek, která stojí za zmínku, jsou nitráty. Jedná se o látky způsobující rozšíření cév (vazodilataci) a tím ovlivňují krevní oběh. Tyto látky se nejčastěji prodávají jako afrodisiakum v sexshopech pod označením „poppers”. Díky své těkavosti se inhalují a navozují záchvatové stavy smíchu, hučení v hlavě a euforii.⁵¹

Analytické přístupy

Se vzrůstající výrobou a distribucí nových syntetických drog vzrůstá i zájem o problematiku analýzy těchto látek. V řadě vědeckých časopisů bylo publikováno několik prací, zabývající se jak metodami analýzy zástupců fenylethylaminů a tryptaminů, tak i metodami pro identifikaci a stanovení jednotlivých zástupců obou skupin.

Z dostupných zdrojů se dá obecně říci, že v převážné většině případů se k analýze fenylethylaminů a tryptaminů využívá metod chromatografických ve spojení s hmotnostní spektrometrií a metod elektroforetických, které byly použity přímo v toxikologické a forenzní praxi i při studiu vlivu experimentálních parametrů těchto metod při analýze standardů nových syntetických drog na vědeckých pracovištích. Příklady metod popsanych v odborných člancích a jejich aplikace budou uvedeny v následujícím textu.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Pro metodu LC/MS, stejně jako pro jiné separační metody je často potřebná vhodná úprava vzorku před vlastní analýzou. K izolaci fenylethylaminů a tryptaminů byla použita prostá extrakce kapalina – kapalina. Vzorek biologického materiálu (moč, krev) se nejprve hydroxidem amonným zalkalizuje na hodnotu pH = 8 a následně se opakovaně provede extrakce směsí chloroform – isopropanol v poměru 3:1 (v/v). Spojené extrakty se za zvýšené teploty (40 °C) pod proudem dusíku nechají odpařit a nakonec se odparek rozpustí v malém množství destilované vody. Takto upravený vzorek se používá pro nástřik do systému LC/MS.^{57,58} Separace látek probíhá na koloně s oktadecylovou stacionární fází (RP-C18) a jako mobilní fáze se používá methanol (acetonitril) – voda obsahující mravenčan amonný, za použití lineárního gradientu i izokratické eluce. K ionizaci separovaných látek se využívá různých iontových zdrojů např. elektrosprej, termosprej nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku.^{57,58}

Vědecká práce autorů Verweije a Lipmana z roku 1996 porovnává uvedené ionizační techniky (TSI, ESI, APCI) v LC/MS analýze standardů fenylethylaminů (MDA, MDMA, MDEA) s využitím metody monitorování vybraných reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM).⁵⁹ Cílem práce bylo zjistit a porovnat limity detekce jednotlivých iontových zdrojů. Nejnižší mez detekce poskytovala ionizace termosprejem, kde se hodnoty LOD pohybovaly v rozmezí 10-30 pg/ml při analýze standardů. Autoři závěrem poukázali na skutečnost, že LOD s využitím TSI a SRM je nižší, než LOD (1-10 ng/ml) do té doby popsanych metod GC,⁶⁰ HPLC⁶¹, GC/MS⁶².

Chromatografie na tenké vrstvě

Své místo v analýze nových syntetických drog má kromě kapalinové chromatografie v kolonovém uspořádání i chromatografie v uspořádání plošném. Praktickou aplikaci TLC ve forenzní toxikologii popisuje článek Kato a kol.,⁶³ který se mimo jiné zaměřuje na identifikaci psychoaktivních tryptaminů. K izolaci tryptaminů ze vzorku moče se používá SPE extrakce. Vzorek se nejprve centrifuguje a následně se odebraný supernatant promyje přes kolonku naplněnou oktadecylovou stacionární fází (C18). Kolonka se poté několikrát promyje destilovanou vodou a analyty jsou eluovány methanolem. Izolované látky jsou separovány na TLC deskách se dvěma typy sorbentu (silikagel, C18) v několika různých vyvíjecích soustavách např. methanol-hydroxid amonný, acetonitril-hydroxid amonný. K detekci se využívá modré fluorescence oxidovaných tryptaminů chlornanem sodným, které pod UV lampou (365 nm) emitují záření o vlnové délce 450 nm. Autoři práce závěrem poukazují na dobrou účinnost separace látek za použití obou typů sorbentů a možnost fluorescenční detekce s LOD 10-30 ng/ml. Metoda je tedy vhodná pro rychlý a finančně nenáročný screening psychoaktivních tryptaminů. Následná kvantifikace fluoreskujících skvrn je možná po jejich seškrábnutí z TLC desky za pomoci metody GC/MS, kterou tvůrci článku využívají.

Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Dosavadní odborné práce popisují praktické aplikace této metody především v analýze nových syntetických fenylethylaminů, ale i vzájemné porovnání parametrů použitých metod (včetně GC/MS) při analýze standardů tryptaminů.

Theobald a kol. publikovali několik článků, věnovaných studiu metabolismu a toxikologické detekce nově designovaných fenylethylaminů, kde se zaměřili na skupinu drog s označením 2C (2C-B, 2C-E, 2C-I, 2C-T2, 2CT-7).^{64,65,66,67,68} Studium metabolismu a detekce nových fenylethylaminů byly prováděny po jejich aplikaci a izolaci z moče laboratorních krys.

Izolace fenylethylaminů pro identifikaci se zakládá na extrakci kapalina – kapalina. Odebraný vzorek moči se nejprve rozdělí na 2 alikvotní podíly, první z nich se hydrolyzuje po dobu 15 min, zahříváním s 37 % kyselinou chlorovodíkovou. Hydrolyzát se smíchá s vodným roztokem síranu amonného a hydroxidu sodného, aby výsledné pH bylo 8-9. Po přidavku druhého podílu moče (surové) se vzorek extrahuje směsí dichlormethan – isopropanol –

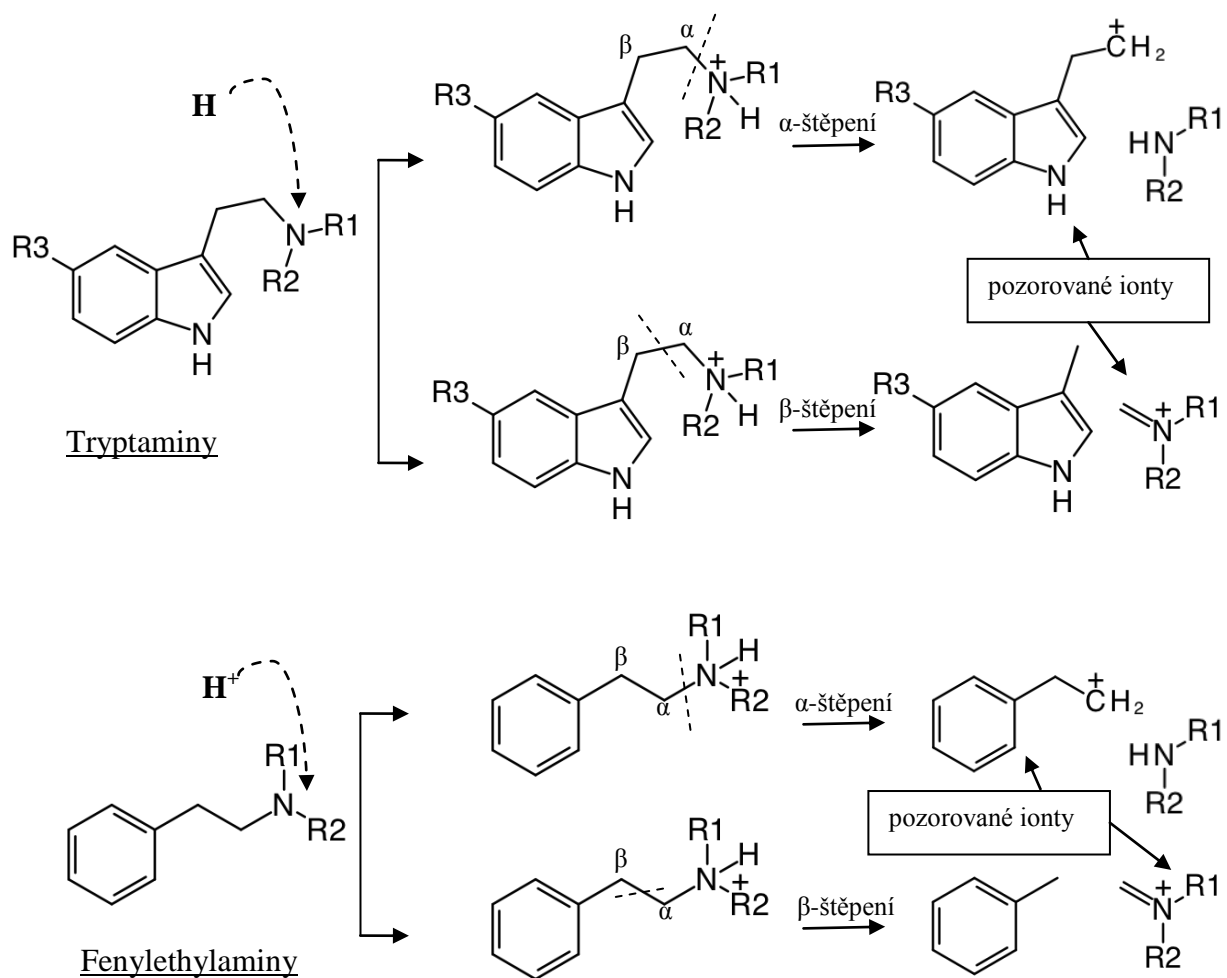
athylacetát (1:1:3, v/v/v) a následně centrifuguje. Poté se oddělí organická vrstva, která se odpaří, odparek se derivatizuje (acetyluje) směsí acetanhydrid – pyridin (3:2, v/v) za mikrovlnného ohřevu (440 W). Nakonec se po odpaření derivatizačního činidla, rozpustí reziduum ve 100 µl methanolu a takto upravený vzorek je použit k analýze. K separaci látek autoři použili HP-1 kapilární kolonu s dimethylpolysiloxanovou stacionární fází, programovaný teplotní program (100 – 310°C/30 min.) a jako nosný plyn helium. Autoři považují GC/MS metodu za vhodnou pro potenciální screening fenylethylaminů (v moči) v klinické a forenzní toxikologii.

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS)

Aplikace hmotnostně spektrometrických metod přímé analýzy nově designovaných drog, nejsou prozatím v dostupné literatuře popsány. Výjimkou je desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization) s průletovým analyzátozem (time of flight, TOF).

Chen a kol.⁶⁹ se zabývali identifikací tryptaminů a fenylethylaminů na základě fragmentace s využitím GC-EI/MS, LC-ESI/MS a MALDI/TOF. Analyzovali 13 standardů látek zahrnující obě skupiny. Standardní látky byly před analýzou rozpuštěny v methanolu a v případě MALDI následně smíchány s matricí, kterou byly α -kyano-4-hydroxyskořicová a 2,5-dihydroxy benzoová kyselina.

Molekulový ion při elektronové ionizaci není ve spektru zpravidla výrazný. Protonované molekuly vznikající při ionizaci ESI a MALDI mohou podléhat následné fragmentaci. Pro ESI jsou hlavními produkty fragmenty vzniklé α -štěpením (štěpení vazby C_{α} – N). Oproti tomu u MALDI převažují produkty vzniklé z protonované molekuly β -štěpením (štěpení C_{α} – C_{β} vazby). Obecné schéma ionizace, α - a β -štěpení popisuje Obr. 9. Navíc bylo u iontů vzniklých β -štěpením ($CH_2=N^+R_1R_2$) zjištěno, že délka alkylových řetězců, vycházejících z atomu dusíku, má vliv na účinnost ionizace. Čím delší je alkylový řetězec, tím vyšší je i účinnost ionizace v pořadí di-methyl- < di-ethyl- < di-propyl- (~di-isopropyl) < di-butyl-. Jiná závislost substituentů (např. methoxy skupiny u 5-MeO-AMT, 5-MeO-DMT a 5-MeO-DIPT) na účinnost ionizace nebyla pozorována.



Obr. 9 – Schéma protonizace a následného preferenčního α - a β -štěpení tryptaminů a fenylethylaminů při ionizaci ESI a MALDI. (R1-R3 = substituenty)-převzato cit⁶⁷

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje, chemikálie

K vlastnímu měření standardů i reálných vzorků drog byl použit hmotnostní spektrometr s iontovou mobilitou od firmy *Waters* (Manchester, Velká Británie) – *Synapt G2 S*. K ionizaci analytů bylo použito iontového zdroje ESI a ASAP.

K přípravě roztoků standardů a reálných vzorků byly použity váhy *Mettler Toledo* (Praha, Česká republika). Při zpracování vzorků moči bylo využito centrifugy *Hettich Zentrifugen* (Tuttlingen, Německo) a váh *Mettler Toledo*.

Použité chemikálie: methanol HPLC grade (Poch S.A., Gliwice, Polsko), hydroxid amonný p.a. 25-29% (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika), kyselina octová p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika), chlorid sodný p.a. (Lachema, Brno, Česká republika), octan amonný (Lachema, Brno, Česká republika), síran hořečnatý (Penta, Chrudim, Česká republika) acetonitril HPLC grade (Merck, Praha, Česká republika) a voda upravená na přístroji *Direct – Q Water System Milipore* (Merck, Praha, Česká republika).

Standardy: k měření bylo poskytnuto celkem 21 roztoků standardů o výchozích koncentracích 10 a 100 mg/l ve vodě či metanolu (Lipomed, Arlesheim, Švýcarsko). Standardy efedrinu a methamfetaminu byly poskytnuty v pevné formě Ústavem soudního lékařství a medicínského práva UP Olomouc.

Další 2 reálné vzorky nafyronu (NRG-1) a N-ethylkatinonu byly poskytnuty Ústavem soudního lékařství a medicínského práva v Olomouci.

Protonované molekuly analyzovaných látek poskytují signál: **m/z 150** - MAP a CAT, **m/z 164** - MET, **m/z 166** - EPH a PMA, **m/z 177** - BZP, **m/z 178** - MABP a 3-MMC, **m/z 180** - MDA, **m/z 182** - 2C-H, 3,-FMC a 4-FMC, **m/z 192** - 4-MEC, **m/z 194** - BDB a bk-PMMA, **m/z 208** - MDE a bk-MDMA, **m/z 222** - MDEC a bk-MBDB, **m/z 242** - 2C-T-2, **m/z 260** 2C-B, **m/z 282** - NRG-1, **m/z 308** - 2C-I

3.2 Postup analýz na přístroji *Synapt G2 S*

Připravené roztoky standardů drog a reálných vzorků drog byly dávkovány integrovaným lineárním dávkovačem přímou infuzí do iontového zdroje ESI s průtokem vzorku 5 $\mu\text{l}/\text{min}$.

V případě screeningu substancí byly roztoky reálných vzorků drog nanášeny na ASAP sondu v objemu 1 μl mikrostríkačkou Hamilton.

Měření probíhalo v kladném modu, intenzity iontů byly průměrovány z přibližně 50 skenů. Nastavení iontového zdroje a iontové optiky hmotnostního spektrometru bylo voleno tak, aby bylo dosaženo maximálního možného iontového proudu protonované molekuly. Nastavení podmínek bylo provedeno pro methamfetamin. Vzhledem k úmyslu provádět screening neznámých látek bylo zvolené nastavení použito i pro ostatní studované látky. Každý den před měřením vzorků byl přístroj kalibrován standardní procedurou na mravenčan sodný v rozsahu 50 až 1200 m/z . Experimenty byly prováděny s využitím „lock mass“ (leucin enkefalin, m/z 556,2771) ke korekci naměřených hodnot m/z .

3.3 Postup přípravy standardních roztoků a roztoků reálných vzorků

Ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 10 a 100 mg/l byly jejich ředěním směsí $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{OH}$ (1 : 1, v/v) připraveny do HPLC vzorkovniček roztoky o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Celkový objem každého roztoku standardu činil 1 ml.

U standardů MAP a EPH bylo nejprve naváženo 2,5 mg těchto standardů a poté rozpuštěno v 5 ml $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{OH}$ (1 : 1, v/v), aby byla jejich výsledná koncentrace 0,5 mg/ml . Z připravených zásobních roztoků o koncentraci 0,5 mg/ml byly stejně jako v prvním případě připraveny roztoky o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Stejným způsobem byly připraveny i roztoky reálných vzorků NRG-1 a ETH-CAT.

Pro screening reálných vzorků s využitím ionizační techniky ASAP byly použity zásobní roztoky reálných vzorků o koncentraci 0,5 mg/ml .

3.4 Extrakce metodou „QuEChERS“

Níže uvedený postup byl vypracován na Katedře analytické chemie pro analýzu opiátů.⁷⁰ V této práci byl beze změny (z důvodu jeho možného využití pro screening širší skupiny drog) otestován pro potřebu analýzy zkoumaných „new designer drugs“.

Do 15 ml centrifugačních zkumavek bylo přidáno 1, 10 a 100 µl zásobního roztoku reálných vzorků NRG-1 a ETH-CAT o koncentraci 0,5 mg/ml. Poté byla do zkumavek přidána moč na celkový objem směsi 5 ml tak, aby byla výsledná koncentrace každé z látek 0,1; 1 a 10 µg/ml. Dále bylo ke vzorkům moči přidáno 48 mg octanu amonného (CH₃COONH₄), 112 mg chloridu sodného a 666 mg síranu hořečnatého. Směs se dobře promíchala a následně se převrstvila 5 ml acetonitrilu. Po přidání acetonitrilu se směs pár minut protřepala. Nakonec byly zkumavky vloženy do centrifugy a byly centrifugovány 10 minut při 4400 ot./min.

Po centrifugaci se do HPLC vialky pipetou odebralo z vrchní acetonitrilové vrstvy 500 µl vzorku a k tomuto objemu bylo přidáno 500 µl vody. Výsledné koncentrace analytů při uvažování 100 % výtěžnosti extrakce byly 0,05; 0,5 a 5 µg/ml. Takto upravené vzorky byly analyzovány pomocí elektrospreje.

3.5 Podmínky měření drog

Tabulka VII – Nastavení iontového zdroje ESI

průtok desolvatačního plynu	průtok zmlžujícího plynu	průtok plynu v konusu	teplota zdroje	desolvatační teplota	napětí sprejovací kapiláry	napětí na vstupním konusu	offset zdroje
600 l/hod.	6 Bar	40 l/hod	100 °C	200 °C	+2,7 kV	+20 V	10 V

Tabulka VIII – Nastavení iontového zdroje ASAP

průtok desolvatačního plynu	průtok zmlžujícího plynu	průtok plynu v konusu	teplota zdroje	teplota sondy	proud na jehlové elektrodě	napětí na vstupním konusu	offset zdroje
600 (l/hod.)	6 Bar	40 l/hod	100 °C	100-400 °C ¹	5 µA	+20 V	10 V

¹ počáteční teplota 100 °C byla po 0,5 min. zvýšena na 400 °C a poté byly sbírány data

Tabulka IX – Nastavení izolace a fragmentace iontů

izolace				fragmentace	
LM Resolution	HM Resolution	kolizní energie „trap“	kolizní energie „transfer“	kolizní energie „trap“	kolizní energie „transfer“
15	15	1 V	1 V	10 V	20 V

Tabulka X – Nastavení pro IMS separaci

průtok kolizního plynu (argon)	průtok helia v He cele	průtok dusíku v IMS cele	IMS-rychlost vlny	IMS-výška vlny
2 ml/min	180 ml/min	110 ml/min	1300 m/s	40 V

Uvedené parametry přístroje byly optimalizovány pro methamfetamin a následně použity i pro ostatní měřené látky za účelem screeningu.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie vybraných „new designer drugs“

4.1.1 Ionizace elektrosprejem

Prvním krokem experimentální části byla hmotnostně spektrometrická analýza nových syntetických drog s využitím kombinace iontově mobilitní separace a hmotnostní spektrometrie, přičemž látky byly ionizovány elektrosprejem. Celkem bylo analyzováno 23 standardních roztoků těchto látek, zahrnující i prekursor pro výrobu pervitinu – efedrin. Jednalo se o zástupce skupin fenylethylaminů, kationů a benzylpiperazin. Vzhledem k povaze ionizační techniky poskytovaly všechny látky protonované molekuly doprovázené ionty jejich fragmentů. Již tyto úvodní experimenty naznačily snadnou fragmentaci studovaných látek, což vyžadovalo i patřičnou modifikaci nastavení hmotnostního spektrometru. Například bylo nutné snížit hodnoty kolizních energií na kolizních celách (trap a transfer) oproti běžnému nastavení používanému výrobcem pro zajištění patřičné transmise iontů. Při měření použité hodnoty 1 eV zajišťovaly potřebnou transmissi iontů a současně při riziku zmíněné snadné fragmentace umožnily pozorovat ve spektru dostatečně intenzivní signál protonované molekuly. Obdobně muselo být řešeno nastavení iontové optiky i v experimentech s iontovou mobilitou, aby potenciálový spád mezi jednotlivými prvky hmotnostního spektrometru nevedl k přílišnému zvyšování vnitřní energie iontů. Ukázalo se, že okyselení vzorku kyselinou octovou s cílem podpořit protonaci molekul analytu nemělo pozorovatelný efekt a účinnost ionizace standardů byla srovnatelná pro okyselené i neokyselené vzorky. U každé z analyzovaných látek bylo pořízeno celkové, fragmentační a iontově-mobilitní spektrum protonované molekuly i jejího fragmentu či fragmentů. Výsledky těchto experimentů jsou shrnuty v Tab. XI, naměřená spektra jednotlivých látek bez korekce jsou součástí přílohy (str. 69-95). Pro všechny analyzované látky byly používány stejné kolizní energie resp. nastavení přístroje tak, jak by to bylo nutné provádět při screeningu zkoumaných drog v neznámých vzorcích. V případě pozitivního záchytu lze následně nastavení přístroje upravovat a např. podpořit fragmentaci protonovaných molekul.

Tabulka XI - Výsledky ESI-MS/IMS/MS analýzy „new designer drugs“

látka	skupina	m/z [MH] ⁺			m/z (frag.)	drift time (ms)			předpokládané ztráty
		[MH] ⁺ _{teor.}	[MH] ⁺ _{exp.}	chyba (ppm)		[MH] ⁺ _{exp.}	frag.	relat. d.t.	
MAP	PEA	150,1283	150,1300	14,7	119,0873	3,73	2,81	1,33	31 (CH ₃ NH ₂)
					91,0561		2,16	1,73	59 (C ₃ H ₉ N)
EPH	PEA	166,1232	166,1230	1,2	148,1127	4,00	3,62	1,10	18 (H ₂ O)
					133,0886		3,19	1,25	33
PMA	PEA	166,1232	166,1221	6,6	117,0694	4,00	2,70	1,48	49 (CH ₃ NH ₂ , H ₂ O)
					121,0650		2,70	1,23	45 (C ₂ H ₇ N)
MDA	PEA	180,1025	180,1019	3,3	91,0512	3,89	2,21	1,45	75 (CH ₃ OH, C ₂ H ₅ N)
					163,0761		3,51	1,11	17 (NH ₃)
2C-H	PEA	182,1181	182,1180	0,5	135,0442	4,54	2,75	1,41	45 (C ₂ H ₇ N)
					133,0653		3,02	1,29	47 (NH ₃ , C ₂ H ₆)
BDB	PEA	194,1181	194,1175	3,1	105,0700	4,75	2,54	1,53	75 (C ₂ H ₇ N, CH ₂ O)
					165,0915		3,62	1,25	17 (NH ₃)
MDE	PEA	208,1338	208,1342	1,9	150,0682	4,75	3,19	1,42	32 (CH ₃ OH)
					135,0445		2,92	1,55	47 (NH ₃ , CH ₂ O)
2C-T-2	PEA	242,1215	242,1207	3,3	105,0701	6,21	2,48	1,83	77 (C ₂ H ₇ NO ₂)
					177,0911		3,94	1,21	17 (NH ₃)
2C-B	PEA	260,0286	260,0284	0,8	147,0809	5,51	3,40	1,40	47 (NH ₃ , CH ₂ O)
					135,0445		2,81	1,69	59 (C ₃ H ₉ N)
2C-I	PEA	308,0147	308,0151	1,3	163,0763	5,89	3,51	1,35	45 (C ₂ H ₇ N)
					135,0446		2,75	1,73	73 (C ₄ H ₁₁ N)
CAT	CAT	150,0919	150,0920	0,7	133,0650	3,62	2,97	1,60	75 (C ₂ H ₇ N, CH ₂ O)
					105,0700		2,48	1,92	103 (C ₄ H ₁₁ N, CH ₂ O)
					225,0952		4,97	1,25	17 (NH ₃)
					210,0712		4,48	1,39	32 (CH ₃ OH)
					243,0021		4,37	1,26	17 (NH ₃)
					227,9912		3,89	1,42	32 (CH ₃ OH)
					290,9888		4,64	1,27	18 (H ₂ O)
					275,9654		4,16	1,42	32 (CH ₃ OH)
					133,0683		2,97	1,22	17 (NH ₃)
					132,0814		3,13	1,16	18 (H ₂ O)
					117,0580		2,65	1,37	33
					105,0704		2,48	1,46	45 (C ₂ H ₇ N)

Tabulka XI - Výsledky ESI-MS/IMS/MS analýzy „new designer drugs“ - pokračování

MET	CAT	164,1075	164,1080	3,0	146,0982	3,89	3,35	1,16	18 (H ₂ O)
					131,0733		2,92	1,33	33
					160,1127		3,67	1,15	18 (H ₂ O)
MABP	CAT	178,1232	178,1233	0,6	147,0804	4,21	3,29	1,28	31 (CH ₃ NH ₂)
					132,0802		3,02	1,39	46 (H ₂ O, C ₂ H ₄)
					131,0708		2,97	1,42	47 (H ₂ O, CH ₂ NH)
3-MMC	CAT	178,1232	178,1225	3,9	91,0543	4,37	2,16	1,95	87 (C ₄ H ₉ NO)
					160,1120		3,83	1,14	18 (H ₂ O)
					145,0875		3,24	1,35	33
3-FMC	CAT	182,0981	182,0984	1,6	164,0880	4,10	3,73	1,10	18 (H ₂ O)
					149,0637		3,08	1,33	33
4-FMC	CAT	182,0981	182,0983	1,1	164,0878	4,16	3,56	1,17	18 (H ₂ O)
					149,0636		3,08	1,35	33
4-MEC	CAT	192,1388	192,1391	1,6	174,1285	4,64	4,05	1,15	18 (H ₂ O)
					146,0967		3,40	1,36	46 (H ₂ O, C ₂ H ₄)
					145,0877		3,24	1,43	47 (C ₂ H ₇ O)
bk-PMMA	CAT	194,1181	194,1185	2,1	176,1095	4,64	3,94	1,18	18 (H ₂ O)
					161,0842		3,46	1,34	33
bk-MDMA	CAT	208,0974	208,0977	1,4	190,1002	4,75	4,00	1,19	18 (H ₂ O)
					160,0875		3,40	1,40	48 (CH ₄ O ₂)
					132,0898		2,97	1,60	76 (C ₂ H ₄ O ₃)
MDEC	CAT	222,1130	222,1166	16,2	204,1038	5,13	4,37	1,17	18 (H ₂ O)
					174,0926		3,83	1,34	48 (CH ₄ O ₂)
bk-MBDB	CAT	222,1130	222,1134	1,8	204,1023	5,08	4,32	1,18	18 (H ₂ O)
					191,0706		3,94	1,29	31 (CH ₃ NH ₂)
					174,0920		3,78	1,34	48 (CH ₄ O ₂)
					161,0600		3,40	1,49	61 (CH ₃ NH ₂ , CH ₂ O)
NRG-1	CAT	282,1858	282,1870	4,3	211,1120	6,80	4,64	1,47	71 (C ₄ H ₉ N)
					141,0703		3,02	2,25	141 (C ₈ H ₁₅ NO)
BZP	PIP	177,1392	177,1393	0,6	134,0965	4,27	3,46	1,23	43 (C ₂ H ₅ N)
					117,0697		2,70	1,58	60 (C ₂ H ₈ N ₂)
					91,0541		2,16	1,98	86 (C ₄ H ₁₀ N ₂)

Vysvětlivky: skupina **PEA** – fenylethylamin, **CAT** – katinony; látka **MAP** – methamfetamin, **MDE** – 3,4-methylendioxyethylamfetamin, **EPH** – efedrin, **MDA** – tenamfetamin, **PMA** – para-methoxyamfetamin, **2C-H** – 2,5-dimethoxyfenylethylamin, **BDB** – benzodioxolylbutamin, **MDE** – 3,4-methylendioxyethylamfetamin, **2C-T-2** – 2,5-dimethoxy-4-ethylthiofenylethylamin, **2C-B** – 4-bromo-2,5-dimethoxyfenylethylamin, **2C-I** – 4-jodo-2,5-dimethoxyfenylethylamin, **CAT** – katinon, **MET** – methkatinon/efedron, **MABP** – bufedron, **3-MMC** – 4-methylmethkatinon/mefedron, **3-FMC** – 3-fluoromethkatinon, **4-FMC** – 4-fluoromethkatinon/flephedron, **4-MEC** – 4-methylkatinon, **bk-PMMA** – 4-ethoxymethkatinon/methedron, **bk-MDMA** – methylon, **MDEC** – ethylon, **bk-MBDB** – β-keto-methylbenzodioxolylbutamin/butylon, **NRG1** – nafyron

Z Tab. XI, obsahující korigovaná data na leucin-enkefalin (m/z 556,2771) je patrné, že při jejich ESI-MS/IMS/MS analýze bylo možno mimo protonovaných molekul těchto látek pozorovat fragmenty vznikající štěpením α popř. β vazby vzhledem k amino skupině. Při identifikaci neznámých PEA mohou tyto fragmentační procesy poskytnout informaci o substituci na aminoskupině resp. na α uhlíku. Například u MAP jde o ztrátu CH_3NH_2 resp. $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$ potvrzující přítomnost N-methyl a C_α -methyl substituce. Situace se komplikuje v případě přítomnosti další funkční skupiny. Přítomnost hydroxy vázané na uhlík u EPH se projevila ztrátou H_2O , která ve spektru dominuje a ionty charakteristické pro strukturní okolí aminoskupiny mohou být malé intenzity. U EPH je ztráta CH_3NH_2 zjistitelná z fragmentu m/z 117, který však vzniká v důsledku dvou ztrát H_2O a CH_3NH_2 , navíc ion typický pro substituci C_α -methyl ($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$) nebyl ve spektru pozorován. Kromě substituce na alifatickém řetězci lze ve fragmentačních spektrech pozorovat ionty dovolující získat informace o substituci na benzenovém jádře. Přítomnost methoxy skupiny (např. PMA) se projevuje ztrátou CH_3OH .

Kromě očekávaných neutrálních ztrát lze u PEA pozorovat i méně pravděpodobné ztráty, jejichž mechanismu eliminace by bylo zajímavé se věnovat detailněji například s využitím standardů značených stabilními izotopy nebo kvantově chemickými výpočty. Jde o ztrátu 33 (CH_5O) a 77 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$). Uvedené elementární složení odpovídá nejmenší chybě měření, například pro fragmentaci EPH byla chyba měření pro CH_5O 12 ppm, pro další teoreticky možné ztráty pak 390 ppm (H_3NO) a 708 ppm (CH_7N), u dalších možností by už chyba přesahovala 1000 ppm. Obdobná situace nastává pro ztrátu $\Delta m/z$ 33 i u ostatních látek, a to nejen ze skupiny fenylethylaminů, ale analogicky i kationů. K opatrnosti při interpretaci dat u ztráty 33 (CH_5O) nabádá skutečnost, že by muselo jít o málo pravděpodobný ne však obecně nemožný proces vzniku radikálu z prekursoru se sudým počtem elektronů.

Při interpretaci spekter může nastat situace, kdy stejná neutrální ztráta vzniká pro odlišné struktury v okolí aminoskupiny. U trojice látek PMA, MDA a MDE docházelo k odštěpení neutrální ztráty $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ (-45). Zatímco u prvních dvou látek jde o β štěpení, u MDE dochází ke štěpení α vazby. V tomto případě je však odlišení způsobu štěpení snadné na základě ztráty NH_3 u PMA a MDA. Podobně byla pozorována ztráta 47 pro MDA, 2C-H a BDB. Nominálně shodná ztráta se však výrazně liší při měření její hmotnosti na čtyři desetinná místa. Experimentálně zjištěné hodnoty byly 47,0366 (MDA), 47,0735 (2C-H) a 47,0366 (BDB), což odpovídá ztrátám $\text{NH}_3+\text{CH}_2\text{O}$ (MDA, BDB) resp. NH_3 , C_2H_6 (2C-H).

Pro názornost jsou níže uvedena MS a MS/MS spektra MDE (Obr. 10, Obr. 11). První dvojice spekter obsahuje surová data, druhá dvojice potom obsahuje korigovaná data na leucin-enkefalin – v případě MS spektra resp. v případě fragmentačního spektra na MS spektrum. Teoretická hodnota m/z protonované molekuly MDE (208,1338) není zcela shodná s experimentálně zjištěnou hodnotou (208,1342). Přístroj v tomto případě pracoval s chybou měření 1,9 ppm. V souladu s výše diskutovanými fragmentačními procesy po izolaci iontu m/z 208 a jeho fragmentaci bylo možné pozorovat dominantní fragment m/z 163 odpovídající α -štěpení se ztrátou 45 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$) a fragment m/z 135 vznikající β -štěpením původní protonované molekuly – ztráta 73 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$). Další fragment s hodnotou m/z 133 vzniká dvojnásobným štěpením parentního iontu za eliminace $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ a CH_2O (ztráta 75). Konečně fragment m/z 105 odpovídá neutrální ztrátě z původní protonované molekuly MDE se sumárním vzorcem $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$ (diference 103).

Ve skupině fenylethylaminů má stejnou nominální hodnotu m/z 166 ($[\text{MH}]^+$) dvojice látek – EPH a PMA. Tyto látky nelze na základě stanovení přesné molekulové hmotnosti rozlišit, obě hodnoty jsou shodné. IMS separace také nebude u parentních iontů účinná, neboť EPH i PMA mají shodný drift time (4,0 ms). Možnost odlišit EPH a PMA poskytuje MS/MS experiment. U EPH je v MS/MS spektru nejintenzivnější fragment o m/z 148 ($[\text{MH}]^+ - \text{H}_2\text{O}$). Další dva fragmenty o m/z 133 a 117 mají velmi nízkou relat. intenzitu. MS/MS spektrum PMA obsahuje odlišné fragmenty s m/z 149 ($[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{NH}_3$), 121 ($[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{C}_2\text{H}_7\text{N}$) a 91 ($[\text{M}+\text{H}]^+ - (\text{CH}_3\text{OH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{N})$).

Velmi ochotně se protonovaly i molekuly zástupců z řady kationů, které po ionizaci snadno eliminovaly ze své struktury vodu, a tak bylo možné v MS i MS/MS spektru pozorovat ion $[\text{MH}]^+ - \text{H}_2\text{O}$ s vysokou relativní intenzitou. Výjimkou je NRG-1, kde se na dominantním fragmentačním procesu podílí štěpení pyrolidinového kruhu. Od ostatních analyzovaných látek se NRG-1 liší větší stabilitou proponované molekuly (menší rozsah fragmentace). Další fragmenty vznikají nejčastěji společnou eliminací vody a substituentu (uhlovodíku) navázaného na atomu dusíku (4-MEC) či sousedním terciárním uhlíku (MABP) nebo α -štěpením původní protonované molekuly (MABP). U kationů s methyldioxy skupinou navázanou na aromatickém jádře (bk-MDMA, bk-MBDB a MDEC) je charakteristický fragment, jenž má vůči parentnímu iontu diferenci molekulové hmotnosti 48. Tato diference odpovídá eliminaci CH_4O_2 . Zajímavostí z hlediska fragmentace je skutečnost, že bk-MDMA poskytuje fragment o m/z 132, který na základě své diference vůči původní

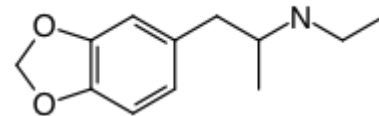
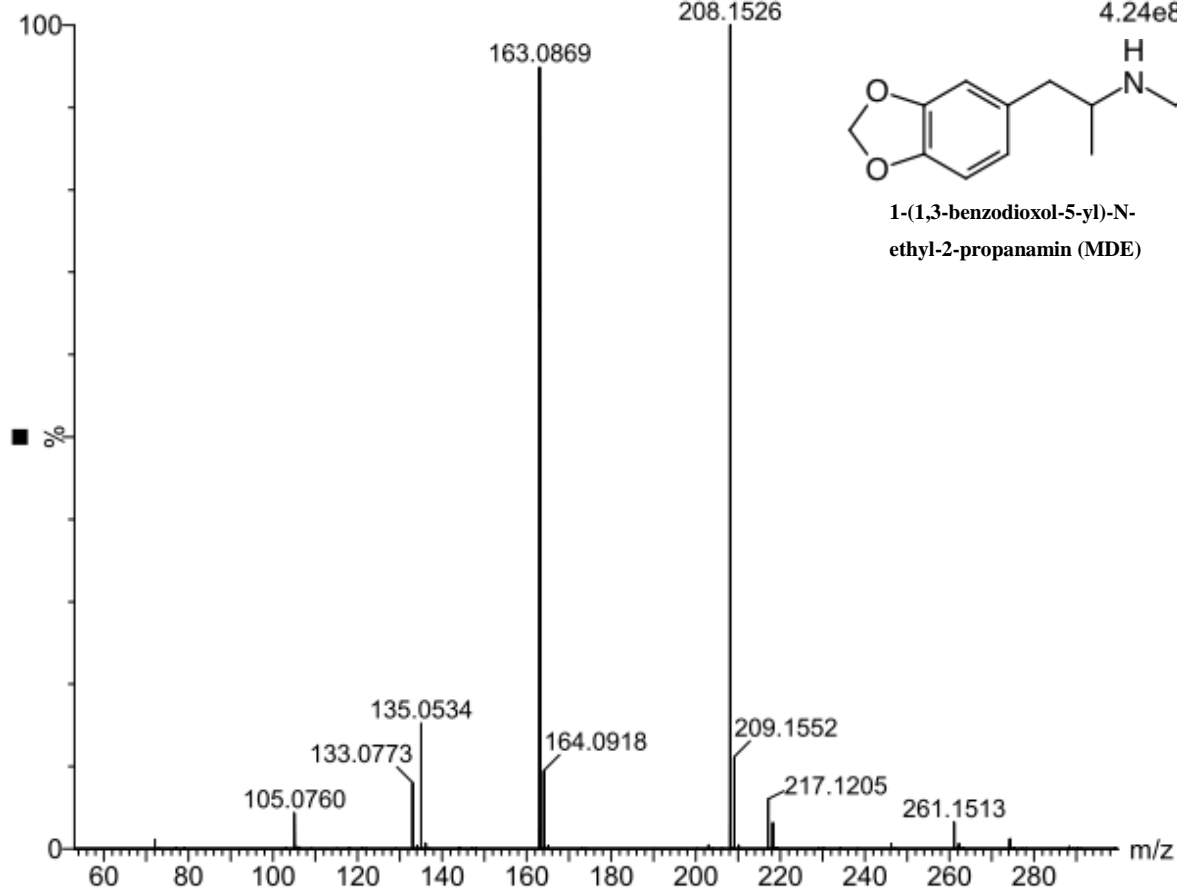
MDE, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMNND_DRUG_130322_7 97 (1.914) Cm (51:102)

[MH]⁺

1: TOF MS ES+

4.24e8

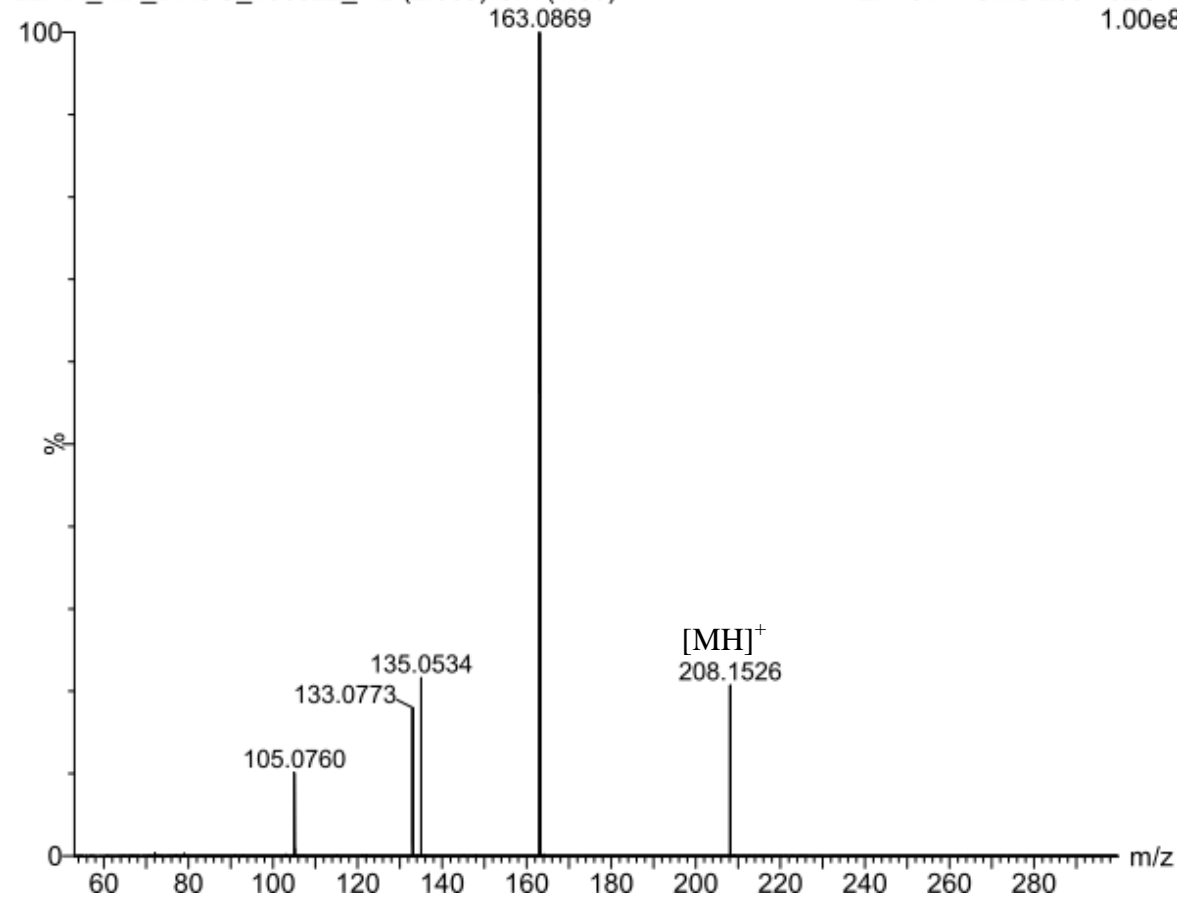


1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-N-ethyl-2-propanamin (MDE)

LEMNND_DRUG_130322_7 2 (2.069) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 208.13ES+

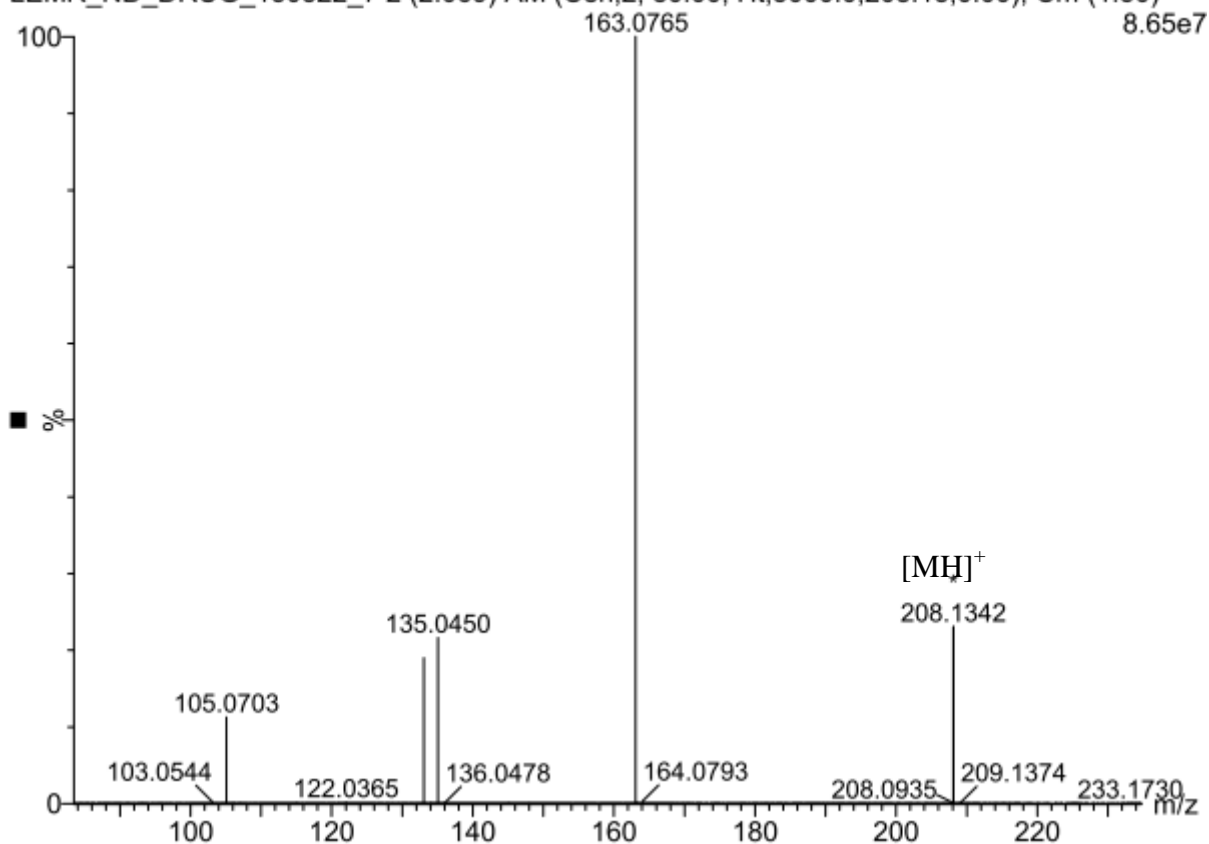
1.00e8



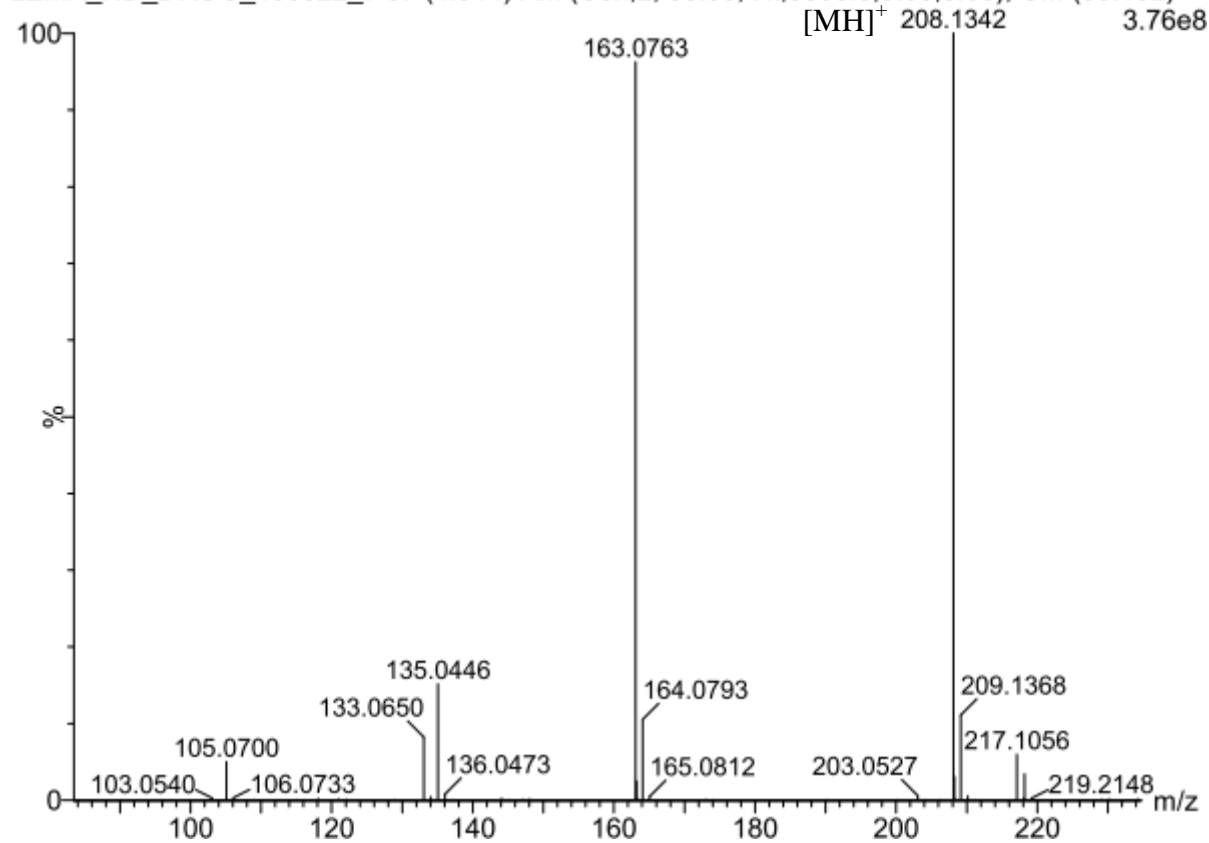
Obr. 10 – MS a MS/MS spektrum MDE (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – surová data

MDE, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMNDRUG_130322_7 2 (2.069) AM (Cen,2, 80.00, Ht,5000.0,208.13,0.00); Cm (1:50)



LEMNDRUG_130322_7 97 (1.914) AM (Cen,2, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.00); Cm (50:102)



Obr. 11 – MS/MS a MS spektrum MDE (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

protonované molekule (ztráta 76) vzniká pravděpodobně eliminací $C_2H_4O_3$, což by vyžadovalo odštěpení CH_4O_2 a následně eliminaci CO doprovázenou přesmykem. Mechanismus fragmentace by mohl být předmětem dalšího studia, kde by jej bylo možné ověřit pomocí izotopicky značených standardů nebo kvantově chemickým výpočtem. Téměř všechny kationy poskytují výše diskutovanou ztrátu 33.

Pro názorný popis byl vybrán kation (CAT), jehož MS a MS/MS spektrum je uvedeno níže (Obr. 12, Obr. 13). Opět jsou pro srovnání přiloženy dvě dvojice spekter obsahující surová a korigovaná data. V tomto případě pracoval přístroj s chybou měření 0,7 ppm. Fragments vznikající z parentního iontu měly hodnoty m/z 133, 132, 117 a 105. V tomto pořadí vznikly fragmenty eliminací koncové amino skupiny – ztráta 17 (NH_2), vody – ztráta 18 (H_2O), pravděpodobně CH_5O – ztráta 33 a ethylaminu – ztráta 45 (C_2H_7N).

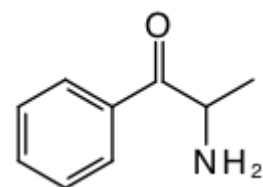
Překryv molekulových iontů o stejném m/z ve skupině kationů nastává u dvojic MABP a 3-MMC (m/z 178), 3-FMC a 4-FMC (m/z 182), MDEC a bk-MBDB (m/z 222). K odlišení dvojic nelze využít přesného a správného měření hmotnosti (stejně sumární vzorce). Iontově-mobilitní separace dvojic parentních iontů o stejném m/z nebude kromě dvojice MABP (4,21 ms), 3-MMC (4,37) příliš účinná vzhledem k velmi blízkým hodnotám drift time (3-FMC 4,10 ms, 4-FMC 4,16 ms; MDEC 5,13 ms, bk-MBDB 5,08 ms). Dvojice MABP – 3-MMC a MDEC – bk-MBDB lze odlišit pomocí MS/MS experimentu.

Poslední analyzovanou látkou byl benzylpiperazin (BZP), který patří do skupiny benzylpiperazinů. Vzhledem ke skutečnosti, že byl analyzován pouze tento vzorek nelze zobecnit hmotnostní a iontově mobilitní chování pro všechny látky spadající do této skupiny. V hmotnostním spektru bylo možno pozorovat protonovanou molekulu BZP o přesné hodnotě m/z 177,1396 (Obr. 14, Obr. 15). Tento ion je oproti ostatním studovaným látkám stabilní a při fragmentaci jej bylo možno pozorovat v MS/MS spektru se 100% relativní intenzitou. Dále byly v MS/MS spektru pozorovány fragmenty o m/z 134, 117 a 91, vznikající fragmentací piperazinového cyklu se ztrátou – 43 (C_2H_5N), 60 ($C_2H_8N_2$) a 86 ($C_4H_{10}N_2$).

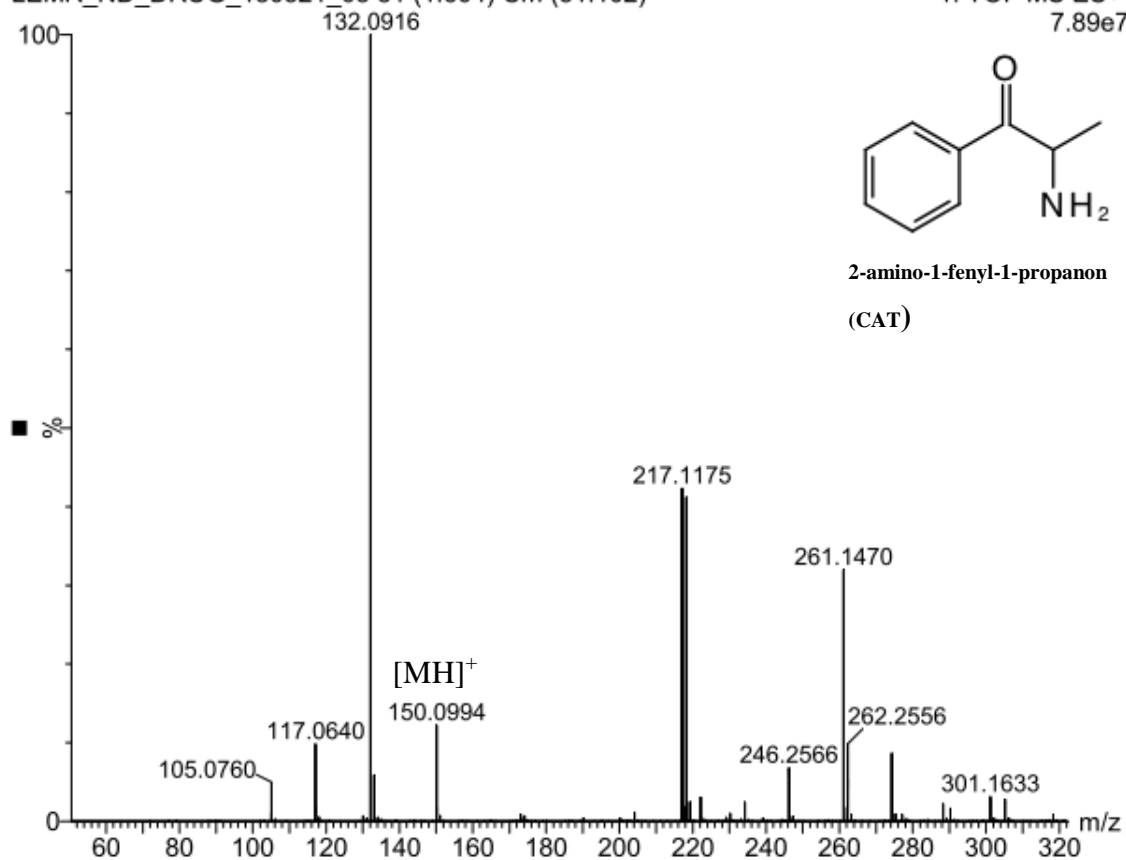
CAT, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130321_03 81 (1.604) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
7.89e7

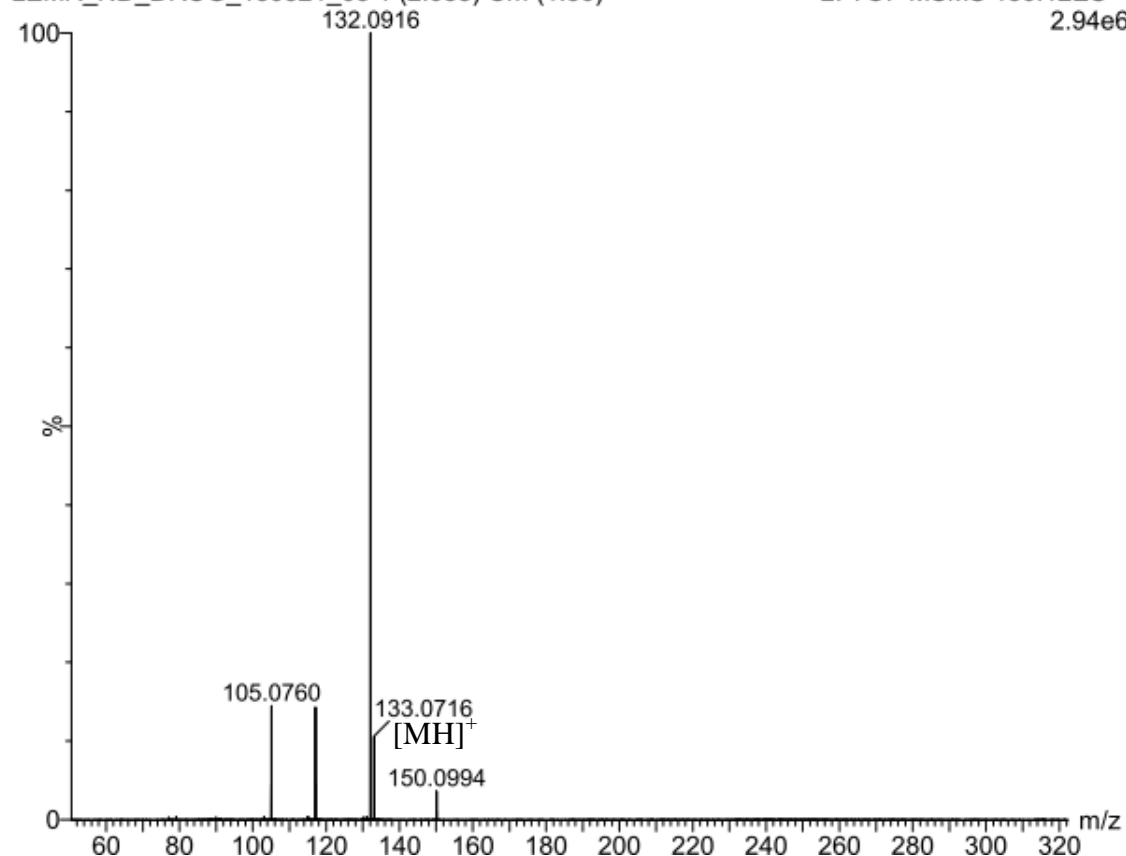


**2-amino-1-phenyl-1-propanon
(CAT)**



LEMUR_ND_DRUG_130321_03 1 (2.033) Cm (1:50)

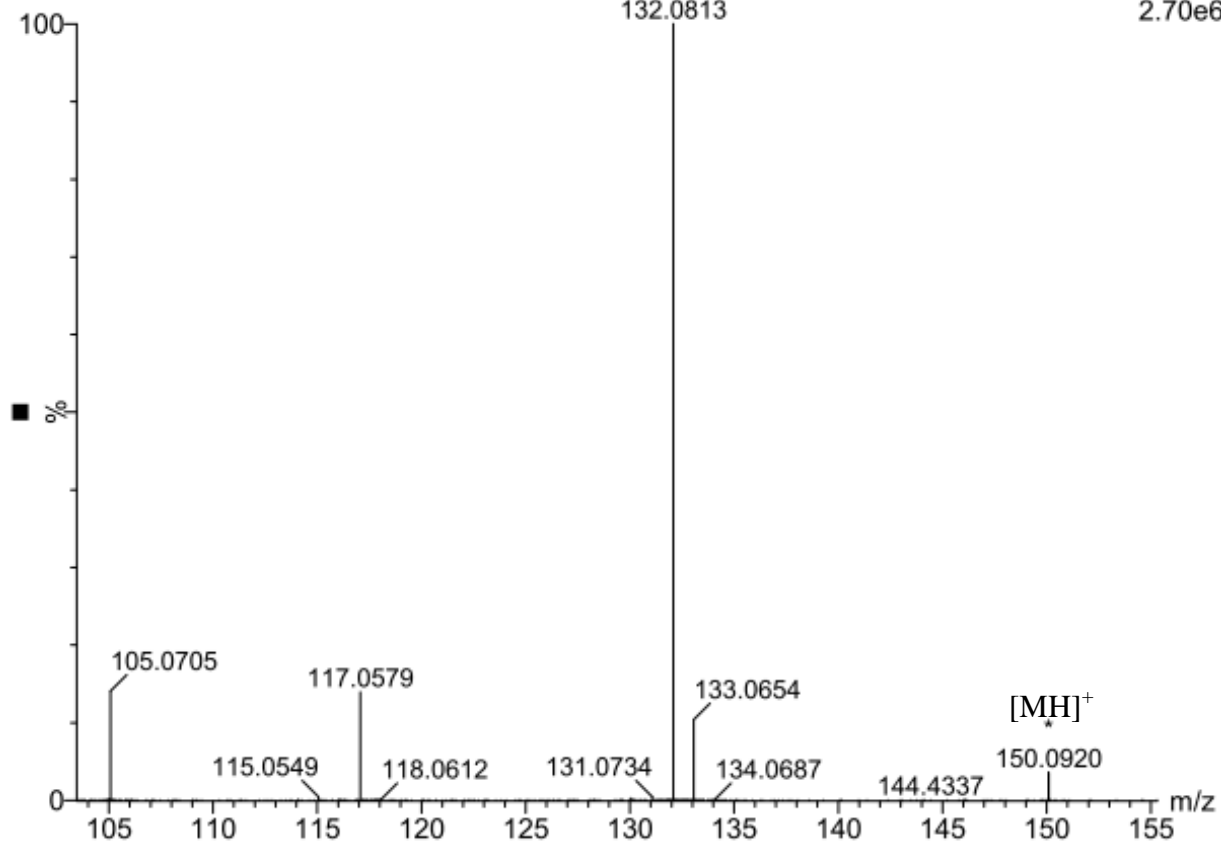
2: TOF MSMS 150.12ES+
2.94e6



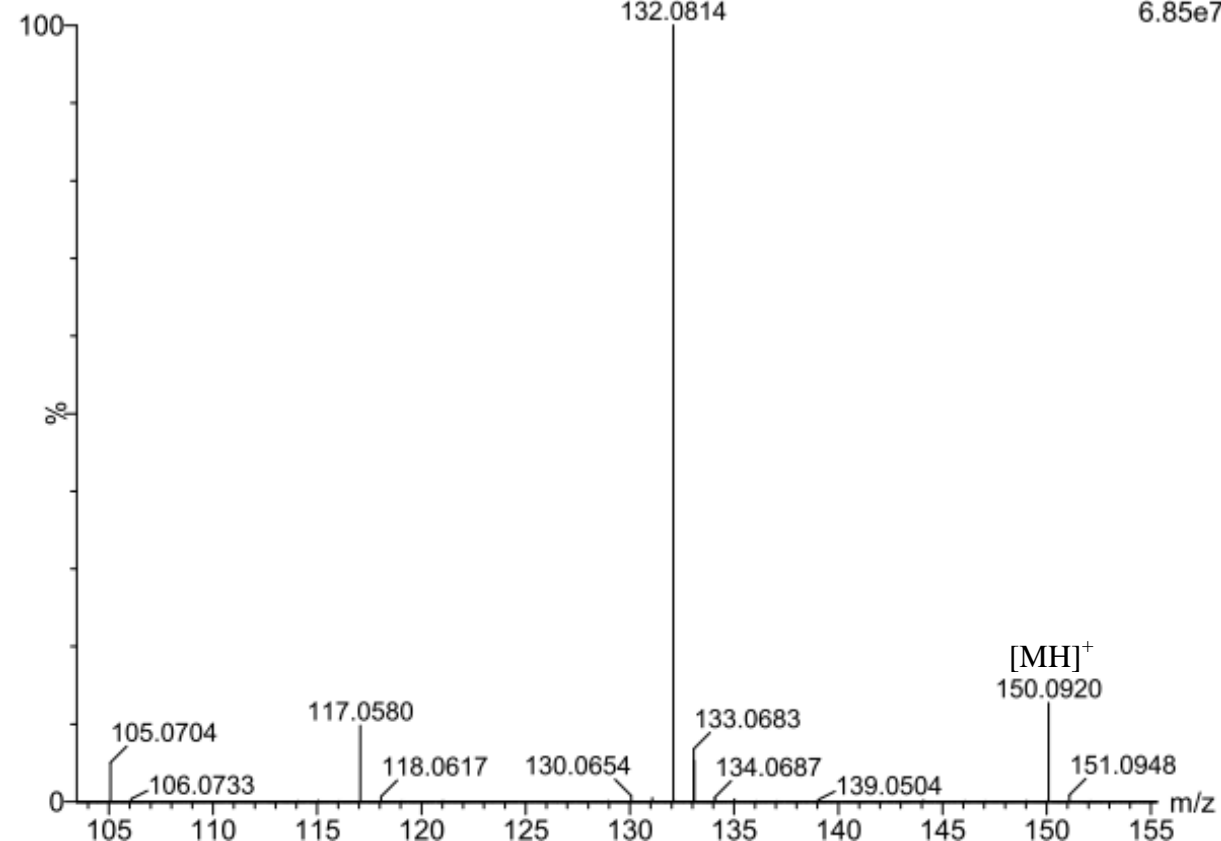
Obr. 12 – MS a MS/MS spektrum CAT (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – surová data

CAT, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130321_03 1 (2.033) AM (Cen,2, 80.00, Ht,5000.0,150.09,0.00); Cm (1:49) 2.70e6



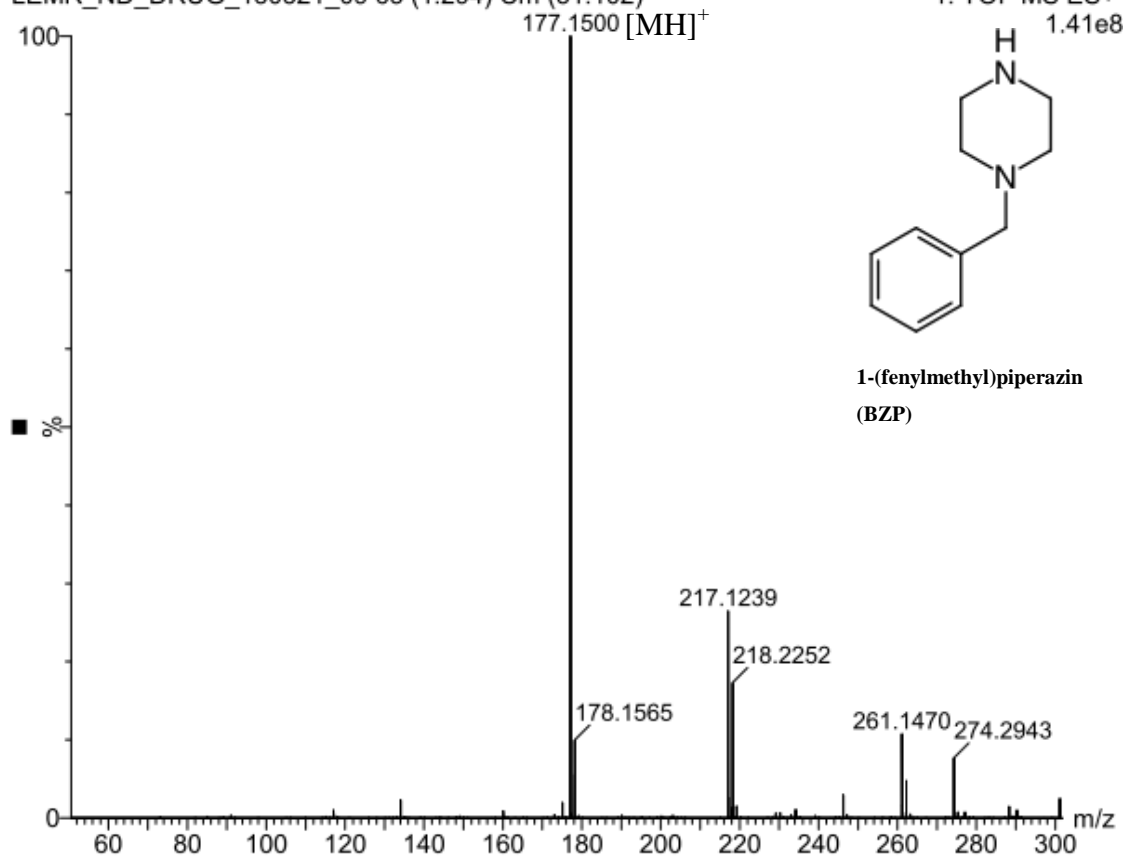
LEMUR_ND_DRUG_130321_03 81 (1.604) AM (Cen,2, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.00); Cm (51:102) 6.85e7



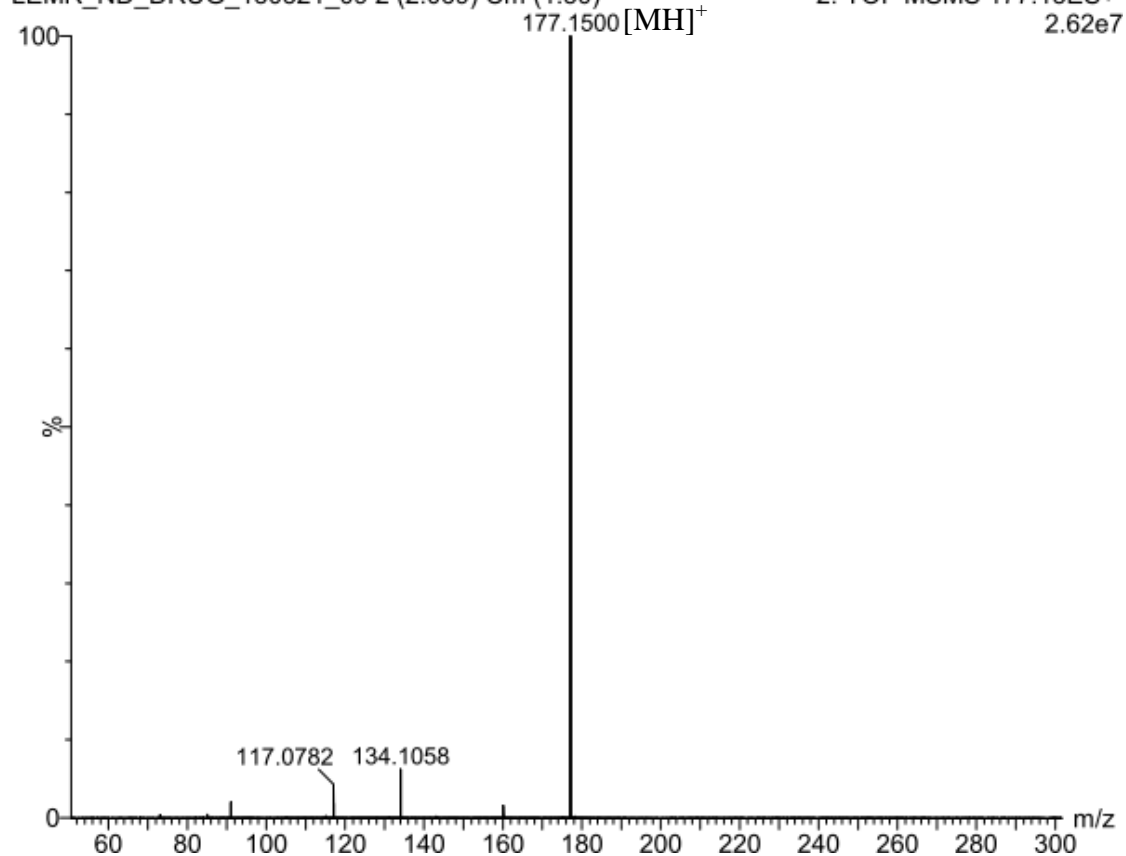
Obr. 13 – MS a MS/MS spektrum CAT (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

BZP, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130321_09 65 (1.294) Cm (51:102)



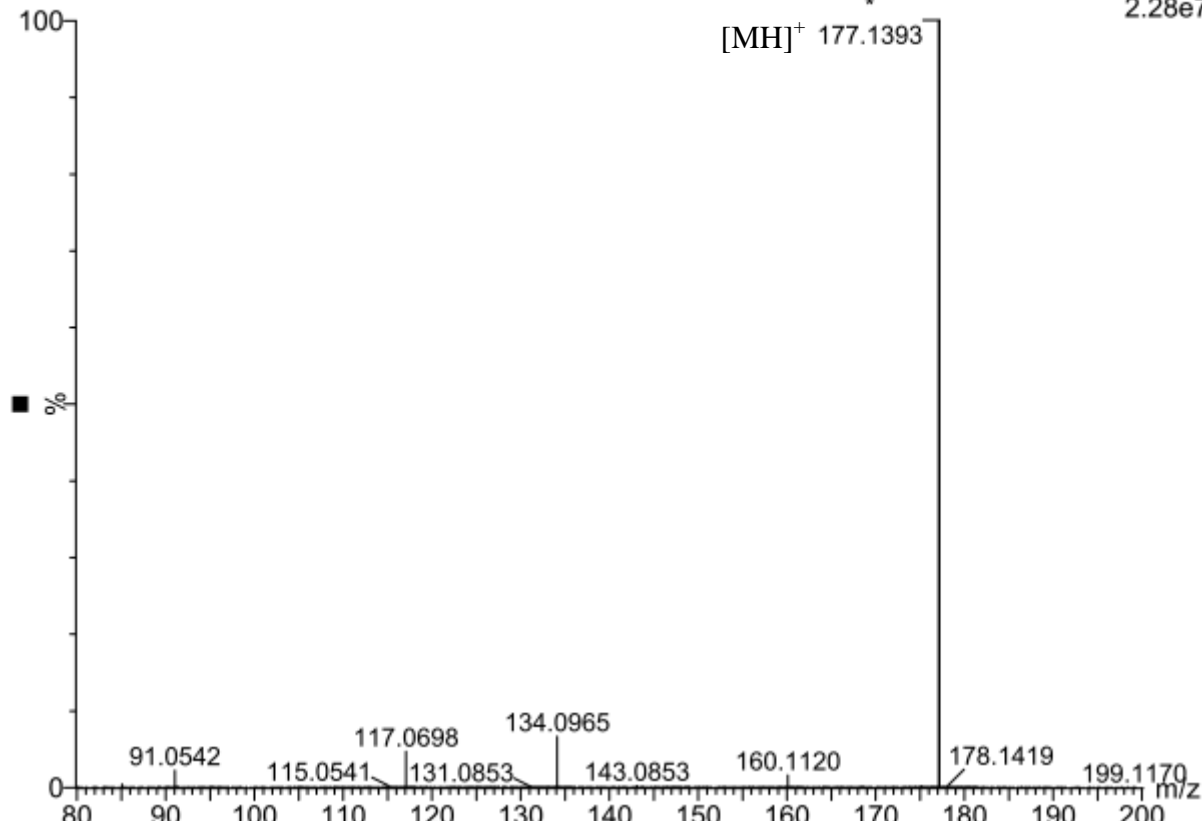
LEMUR_ND_DRUG_130321_09 2 (2.069) Cm (1:50)



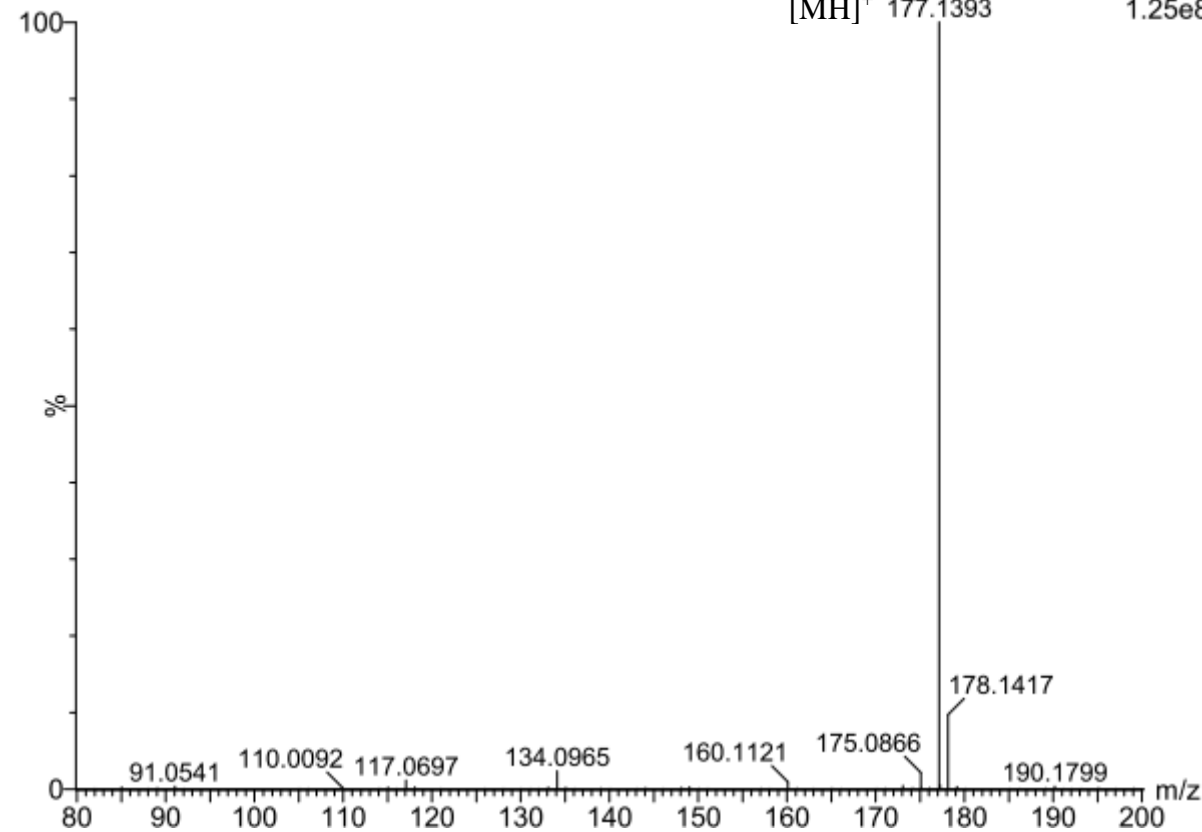
Obř. 14 – MS a MS/MS spektrum BZP (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – surová data

BZP, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130321_09 2 (2.069) AM (Cen,2, 80.00, Ht,5000.0,177.14,0.00); Cm (1:49) 2.28e7



LEMUR_ND_DRUG_130321_09 65 (1.294) AM (Cen,2, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.00); Cm (51:101) 1.25e8

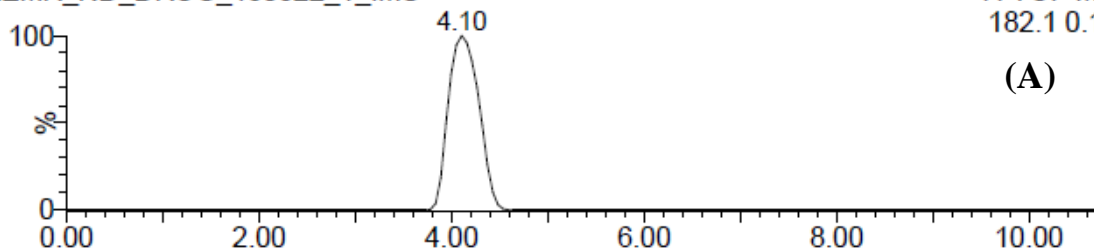


Obr. 15 – MS/MS a MS spektrum BZP (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

Je třeba připomenout, že k identifikaci analytů lze rovněž využít charakteristické intenzity izotopických piků, např. u 2C-T-2 je patrná přítomnost atomu síry v molekule, u 2C-B přítomnost bromu (viz spektra v příloze – příloha 8 a 9 str. 75 a 76). Meziskupinový překryv je možný při měření na přístrojích s nižší rozlišovací schopností u 2C-H s dvojicí kationů 3-FMC, 4-FMC. Protonované molekuly mají stejnou nominální hodnotu m/z 182, ale liší se na desetinných místech. Jejich odlišení je možné také pomocí iontové mobility (Obr. 16) (drift time protonovaných molekul: 3-FMC 4,10 ms, 4-FMC 4,16 ms, 2C-H 4,54 ms). Navíc se látky výrazně liší i svými fragmentačními spektry (2C-H poskytuje čtyři charakteristické fragmenty – m/z 165, 150, 135 a 105, fluorderiváty poskytují dva – m/z 164 a 149). K obdobné situaci dochází u MAP a CAT. Látky lze opět odlišit na přístrojích s vysokou rozlišovací schopností, na základě fragmentačních spekter, iontová mobilita obou látek však byla velmi blízká (MAP 3,73 ms, CAT 3,62). Ve skupině analyzovaných látek nebyla mobilitní separace kritických párů úspěšná. Možným budoucím směrem výzkumu by bylo testování jiných plynů namísto použitého dusíku v mobilitní cele.

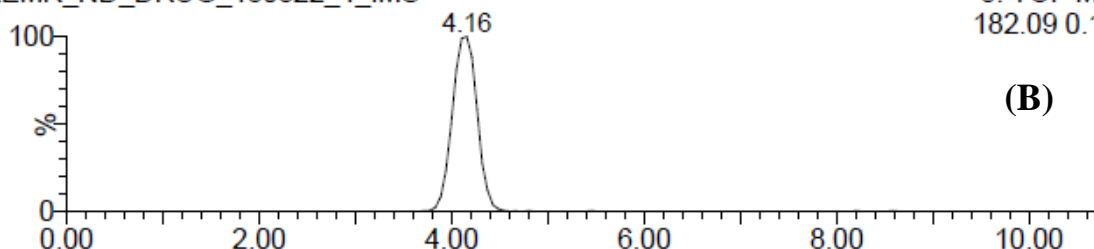
2C-H, 1 μ g/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5 μ l/min, IMS

LEMUR_ND_DRUG_130322_1_IMS



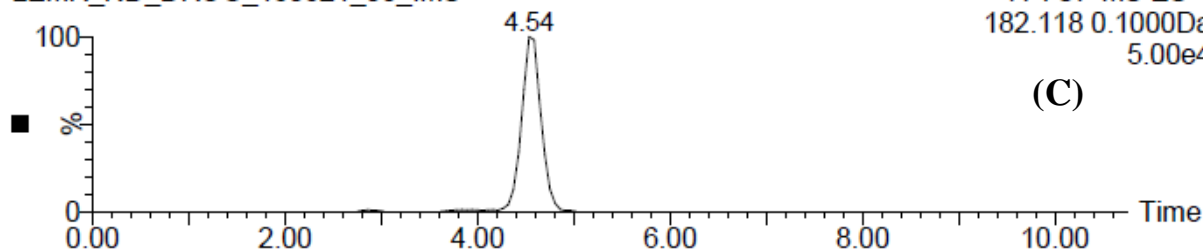
7: TOF MS ES+
182.1 0.1000Da
7.32e6
(A)

LEMUR_ND_DRUG_130322_4_IMS



8: TOF MS ES+
182.09 0.1000Da
1.01e5
(B)

LEMUR_ND_DRUG_130321_08_IMS



7: TOF MS ES+
182.118 0.1000Da
5.00e4
(C)

Obr. 16 – IMS spektrum 3-FMC (A), 4-FMC (B) a 2C-H (C)

4.2 Iontová mobilita a hmotnostní spektrometrie vzorků zadržných drog

4.2.1 Ionizace elektrosprejem

Dalším analyzovaným materiálem byly dva reálné vzorky „new designer drugs“, které byly poskytnuty Ústavem soudního lékařství a medicínského práva UP Olomouc. Jednalo se o látky ze skupiny kationů – nafyron (NRG-1), N-ethylkationon (ETH-CAT). Za podmínek ověřených v experimentech se standardy byla provedena ESI-MS/IMS/MS analýza. Výsledky analýz jsou shrnuty v Tab. XII, která obsahuje korigovaná data na leucin-enkefalin – v případě MS spektra resp. v případě fragmentačního spektra na MS spektrum.

Tabulka XII - Výsledky ESI-MS/IMS/MS analýzy „new designer drugs“

látka	skupina	m/z [MH] ⁺			m/z (frag.)	drift time (ms)			předpokládané ztráty
		[MH] ⁺ _{teor.}	[MH] ⁺ _{exp.}	chyba (ppm)		[MH] ⁺ _{exp.}	frag.	relat. d.t.	
ETH-CAT	CAT				160,1123		3,78	1,14	18 (H ₂ O)
					145,0877		3,35	1,28	33
					132,0806		3,19	1,35	46 (H ₂ O, C ₂ H ₄)
				2,2	131,0719	4,32	3,02	1,43	47
					130,0646		2,97	1,45	48 (H ₂ O, C ₂ H ₆)
					117,0573		2,75	1,57	61
NRG-1	CAT				105,0691		2,54	1,70	73 (C ₄ H ₁₁ N)
					211,1132		4,70	1,45	71 (C ₄ H ₉ N)
				5,3	141,0711	6,80	3,02	2,25	141 (C ₈ H ₁₅ NO)

Vysvětlivky: skupina **PEA** – fenylethylaminy, **CAT** – kationy; látka **ETH-CAT** – N-ethylkationon, **NRG-1** – nafyron

ETH-CAT poskytoval po ionizaci elektrosprejem protonovanou molekulu o hodnotě m/z 178 se 100% relativní intenzitou v MS spektru (Obr. 17), přičemž chyba měření byla 2,2 ppm. V MS/MS spektru bylo možné pozorovat fragment s nejvyšší relativní intenzitou při m/z 160 odpovídající ztrátě vody (typická ztráta u kationů, viz výše). Druhý fragment mající hodnotu m/z 145, odpovídal ztrátě molekulové hmotnosti 33 oproti parentnímu iontu. Dalšími fragmenty ETH-CAT v MS/MS spektru byla trojice s m/z 132, 131

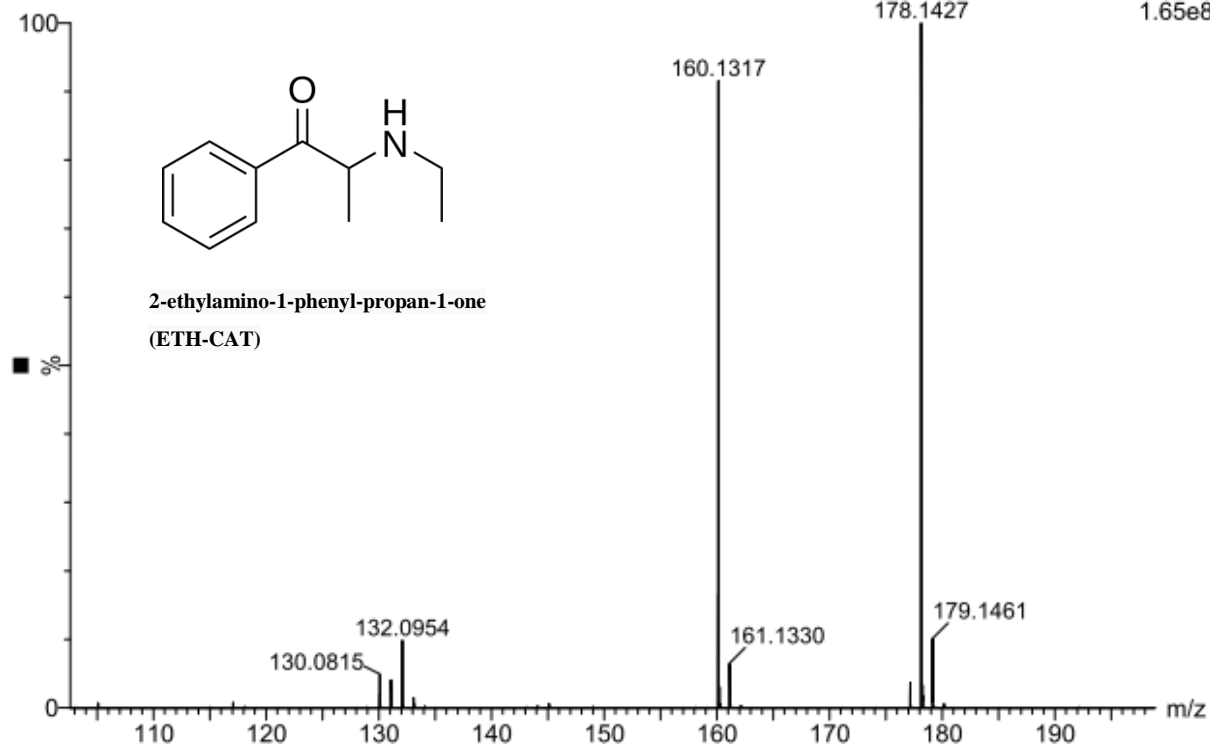
a 130, které vznikaly eliminací H_2O s C_2H_4 (ztráta 46), $\text{C}_2\text{H}_7\text{O}$ (ztráta 47) a H_2O s C_2H_6 (ztráta 48), jejichž relativní intenzita v tomto pořadí klesala. Posledními fragmenty v MS/MS spektru ETH-CAT se ztrátou 61 a 73 byly fragmenty s přibližně stejnou relativní intenzitou, mající m/z 117 a 105. Z hlediska dalšího možného výzkumu je zajímavá série neutrálních ztrát 33 (CH_5O), 47 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{O}$) a 61 ($\text{C}_3\text{H}_9\text{O}$). Rozdíl mezi těmito ztrátami odpovídá CH_2 , jejich přesná a správná hmotnost ukazuje na sumární vzorce. Proces eliminace by však musel zahrnout tvorbu kation radikálu z iontu se sudým počtem elektronů, jak již bylo uvedeno pro ztrátu 33, a proto detailnější studie mechanismu jejich vzniku by byla zajímavá.

Nafyron (NRG-1) ochotně poskytoval $[\text{MH}]^+$ o m/z 282, jehož přesná hodnota byla změřena s chybou 5,3 ppm. Při fragmentaci byl $[\text{MH}]^+$ ion nafyronu značně stabilní a v MS/MS spektru měl stejně jako v MS spektru 100% relativní intenzitu (Obr. 18). Dominantní fragmenty v MS/MS spektru měly hodnotu m/z 211 a 141, což odpovídá výsledkům z analýzy standardu NRG-1. Parentní ion i fragmenty nafyronu reálného vzorku a standardu měly shodné hodnoty drift time až na nepatrnou odchylku u fragmentu m/z 211 (6,64 ms, 6,70 ms).

Lze shrnout, že měření roztoků zadržovaných substancí z nelegálního trhu metodou ESI-MS/IMS/MS je vhodné pro identifikaci „new designer drug“. Analýza je jednoduchá a byla provedena bez přečištění vzorku přímou infuzí roztoku do iontového zdroje. Pro rychlou analýzu uvedených nebo obdobných vzorků byla následně testována metoda založená na použití přímé sondy (ASAP).

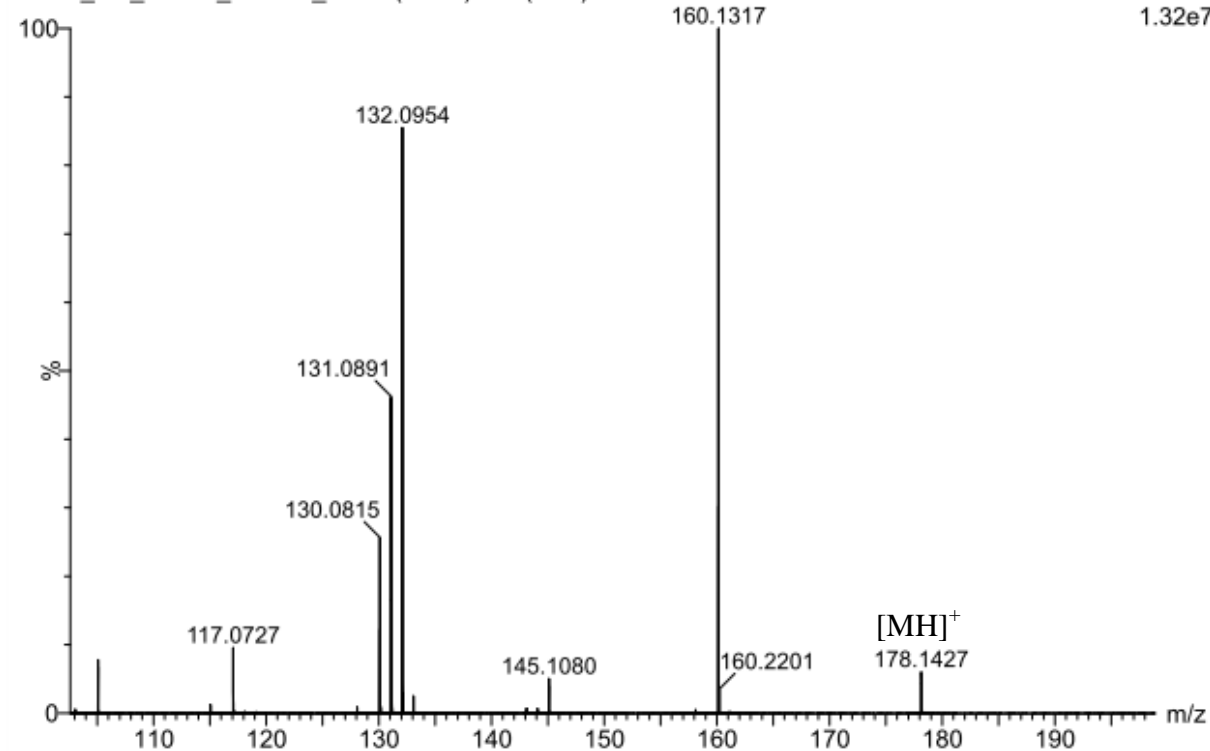
ETH-CAT, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130417_03 88 (1.722) Cm (50:102)

17-Apr-2013 16:55:57
[MH]⁺ 1: TOF MS ES+
178.1427 1.65e8



LEMUR_ND_DRUG_130417_03 33 (2.652) Cm (1:49)

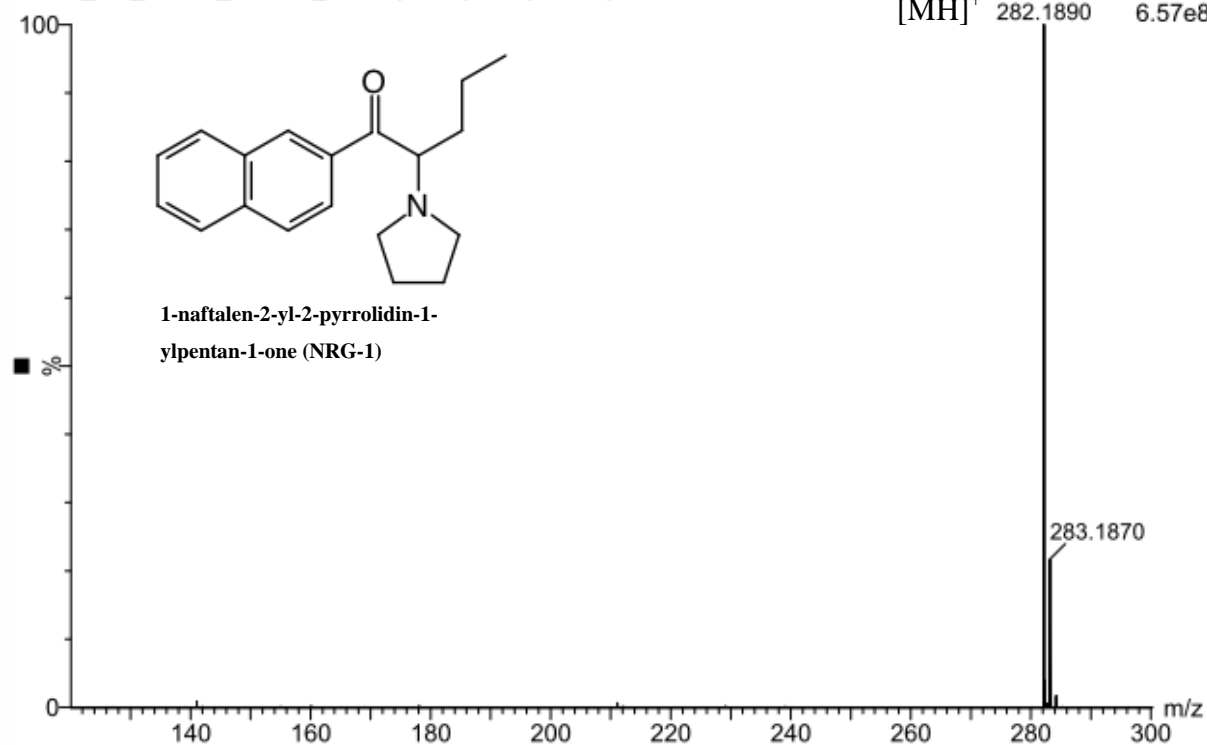
2: TOF MSMS 178.12ES+
1.32e7



Obr. 17 – MS a MS/MS spektrum ETH-CAT (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – surová data

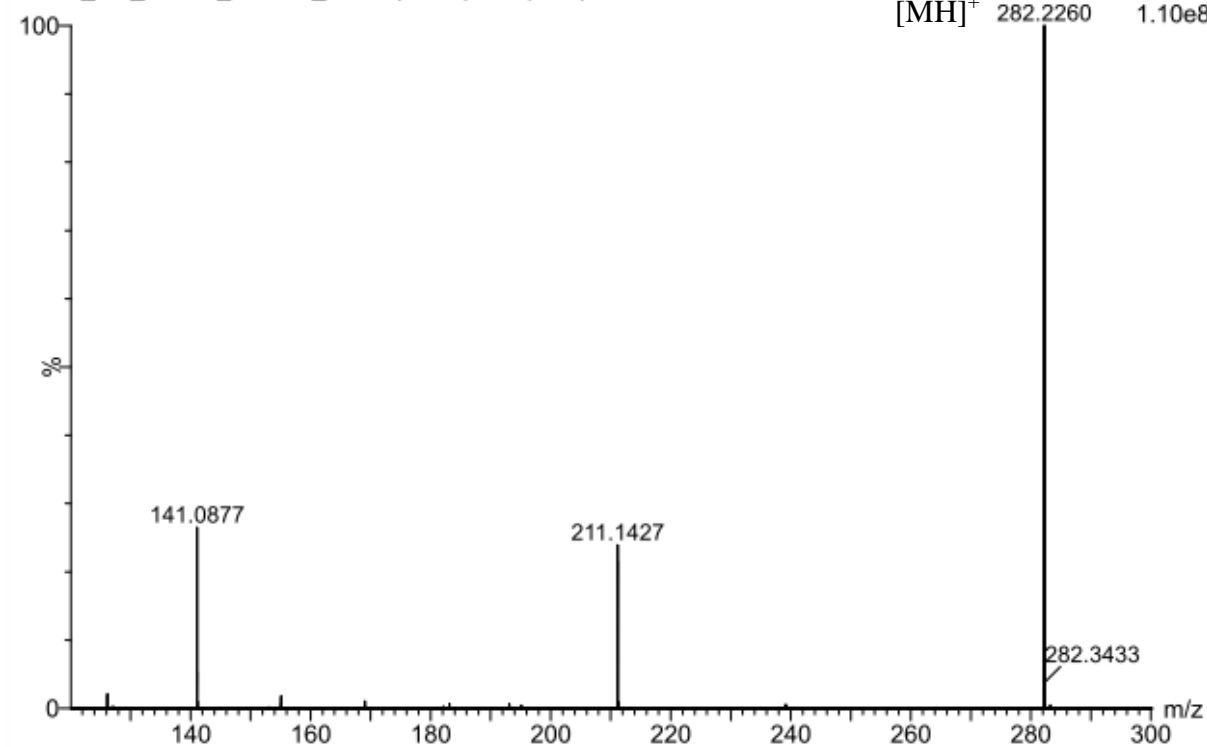
NRG-1, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min UEB143
LEMUR_ND_DRUG_130417_01 58 (1.156) Cm (50:102)

17-Apr-2013 15:39:03
1: TOF MS ES+
[MH]⁺ 282.1890 6.57e8



LEMUR_ND_DRUG_130417_01 42 (2.844) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 282.18ES+
[MH]⁺ 282.2260 1.10e8



Obr. 18 – MS a MS/MS spektrum NRG-1 (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – surová data

4.2.2 Přímá sonda

S využitím iontového zdroje ASAP byly za účelem screeningu analyzovány rovněž dva vzorky kationů, které poskytl Ústav soudního lékařství a medicínského práva v Olomouci. Byla testována ionizace sondou ASAP bez a s modifikátorem. Pro podpoření ionizace analytů byl do prostoru iontového zdroje přiváděn modifikátor – 0,5 % vodný roztok NH_4OH , ale bez výraznějšího efektu, a tak byly další experimenty prováděny bez něj. Důležitým parametrem měření pomocí ASAP je teplotní program. Zvyšování teploty má zajistit postupné uvolňování složek vzorku do plynné fáze, a tím jejich postupnou ionizaci. Ukázalo se, že je výhodnější vzorek, který byl nanášen ve formě roztoku (1ul), nejprve při 100 °C vysušit a následně zvýšit teplotu na 400 °C a dosáhnout tak desorpce analytů. Takovýto postup snižoval pozadí při detekci iontů analytů. Oproti přímé infuzi roztoku (analýza pomocí ESI) je signál poskytovaný ASAP časově omezen (dochází k vyčerpání vzorku) na cca 2 min. Doba jeho trvání je však postačující pro sběr dat dovolujících základní screening. Teprve v případě problémů s odlišením některých látek by se mohl provádět časově delší experiment s elektrosprejem. Výsledky analýz uvádí Tab. XIII, která obsahuje korigovaná data na leucin-enkefalin – v případě MS spektra resp. v případě fragmentačního spektra na MS spektrum.

Tabulka XIII - Výsledky ASAP-MS/IMS/MS analýzy „new designer drugs“

látka	skupina	m/z $[\text{MH}]^+$			m/z (frag.)	drift time (ms)			předpokládané ztráty
		$[\text{MH}]^+_{\text{teor.}}$	$[\text{MH}]^+_{\text{exp.}}$	chyba (ppm)		$[\text{MH}]^+_{\text{exp.}}$	frag.	relat. d.t.	
ETH-CAT	CAT				160,1124		3,78	1,14	18 (H_2O)
					145,0889		3,35	1,28	33
					132,0813		3,19	1,35	46 (H_2O , C_2H_4)
				1,1	131,0730	4,32	3,02	1,43	47 ($\text{C}_2\text{H}_7\text{O}$)
					130,0651		2,97	1,45	48 (H_2O , C_2H_6)
					117,0578		2,75	1,57	61
NRG-1	CAT				105,0701		2,54	1,70	73 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$)
				2,8	211,1125	6,86	4,70	1,45	71 ($\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$)
					141,0703		3,02	2,25	141 ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}$)

Vysvětlivky: skupina **PEA** – fenylethylaminy, **CAT** – kationy; látka **ETH-CAT** – N-ethylkation, **NRG-1** – nafyron

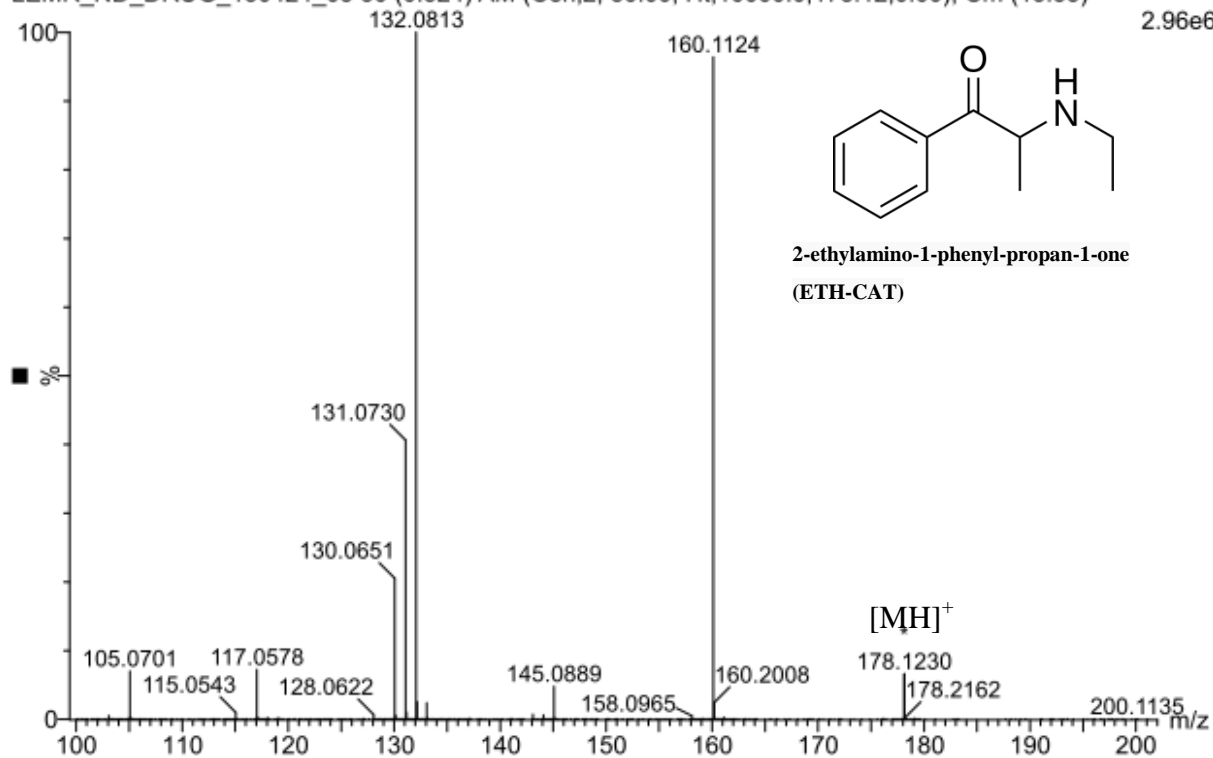
Z naměřených hmotnostních spekter bylo možné pozorovat ochotnou protonizaci molekul analytů, které poskytovaly 100 % relativní intenzitu $[MH]^+$ iontu (Obr. 19, Obr. 20). Parentní ion nafyronu byl oproti parentnímu iontu N-ethylkatinonu stabilní a nebylo tak možné z pouhého MS spektra pozorovat fragmenty této látky. Pořízená MS/MS spektra obou látek byla shodná s MS/MS spektry při ESI-MS/IMS/MS analýze – NRG-1 i ETH-CAT poskytovaly stejný počet i hodnoty m/z fragmentů. Drift-time protonovaných molekul a jejich fragmentů byl také shodný s předchozím experimentem. Získaná data poukázala na přítomnost NRG-1 a ETH-CAT ve vzorcích. Je zřejmé, že sonda ASAP představuje pro studované látky zajímavou alternativu k elektrospreji. Dovoluje rychlou analýzu bez potřeby promývání systému při postupném měření různých vzorků. Zároveň je možné získat stejná data pro identifikaci jako při ESI-MS/IMS/MS. Jistým rizikem u obou přístupů je interference složek vzorku s analytem, například konkurence jiných látek při ionizaci. V této souvislosti je třeba upozornit, že u elektrospreje jsou rizika poměrně dobře popsána, u sondy ASAP nikoli. Sonda může na jedné straně dovést eliminaci interferencí postupným ohřevem vzorku, na straně druhé se mohou výrazněji uplatnit sekundární procesy (ion-molekulové reakce), které mohou ovlivňovat efektivitu ionizace. Například látky s vyšší protonovou afinitou mohou zhoršovat ionizaci látek s nižší iontovou afinitou. Podobné efekty sice mohou nastat i u elektrospreje, ale ke geometrii zdroje a ionizaci v plynné fázi lze očekávat jejich výraznější uplatnění při použití ASAP.

ETH-CAT, 0.5 mg/ml H₂O:MeOH 1:1, 1 µl ASAP

24-Apr-2013 11:34:47

LEMUR_ND_DRUG_130424_05 30 (0.524) AM (Cen,2, 80.00, Ht,10000.0,178.12,0.00); Cm (13:55)

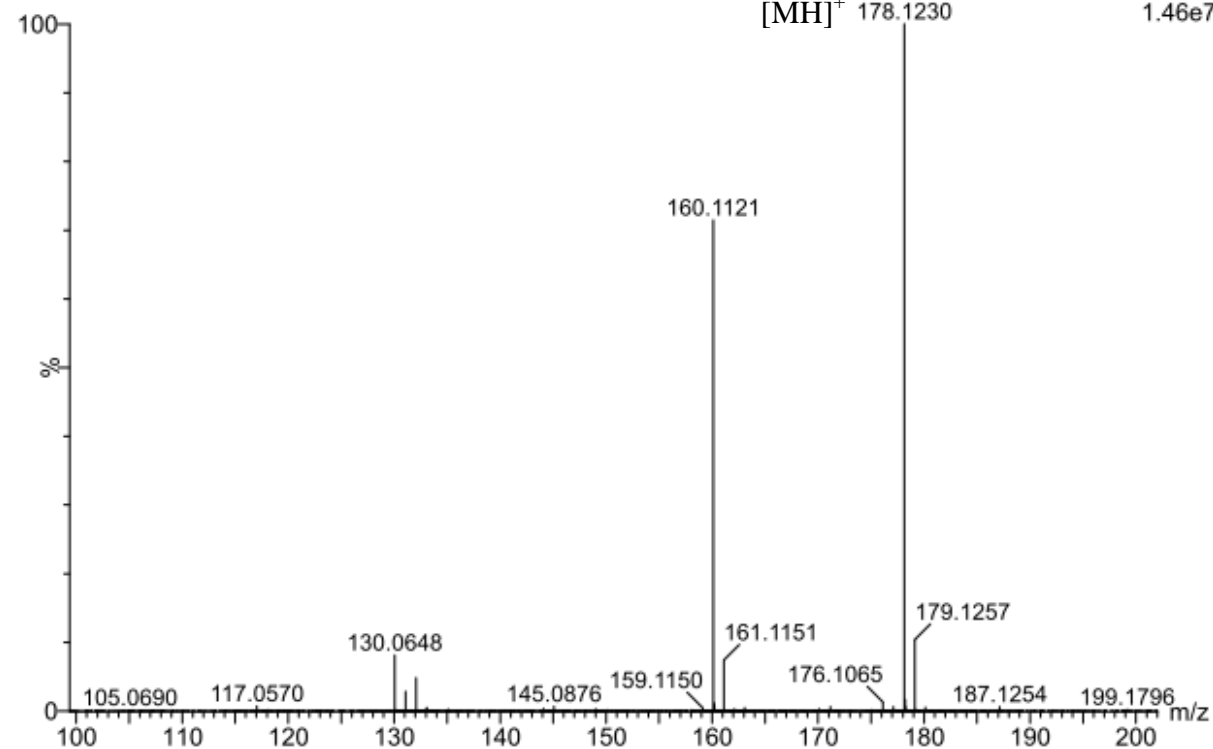
2.96e6



LEMUR_ND_DRUG_130423_25 17 (0.364) AM2 (Ar,20000.0,556.28,0.00,LS 3); ABS; Cm (9:17)

[MH]⁺

1.46e7



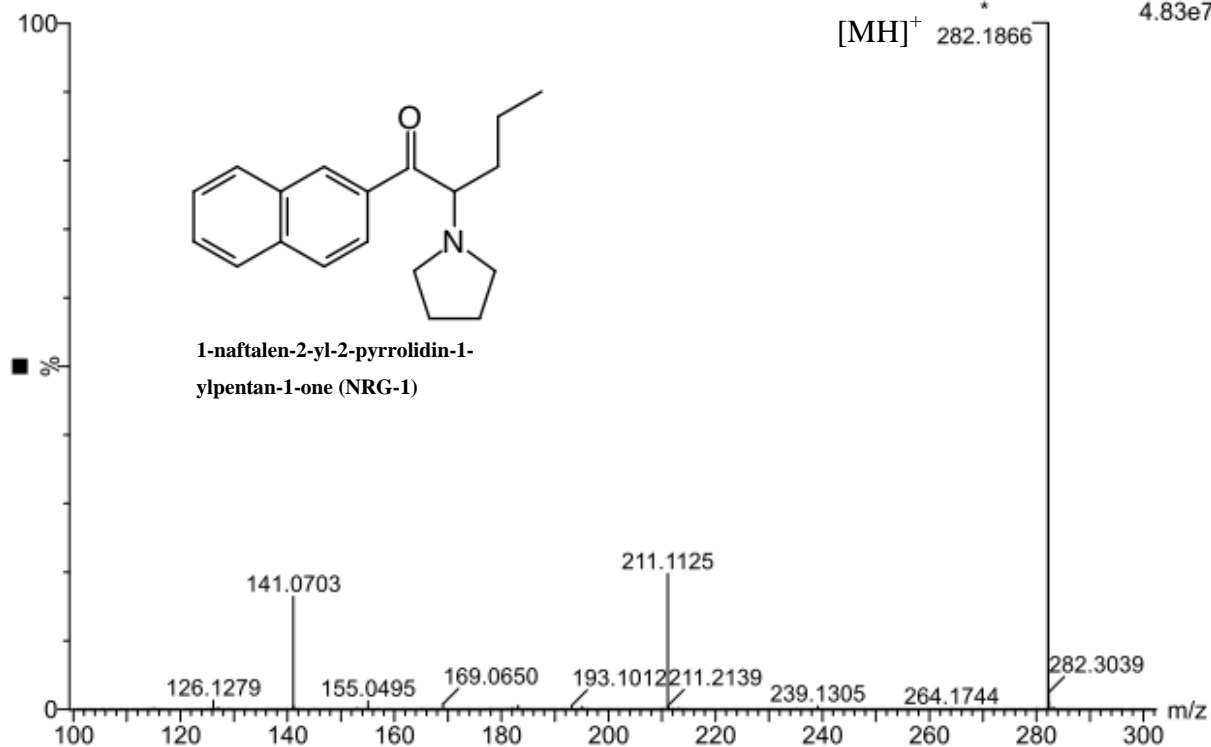
Obr. 19 – MS/MS a MS spektrum ETH-CAT (0,5 mg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

NRG-1, 0.5 mg/ml H₂O:MeOH 1:1, 1 µl ASAP

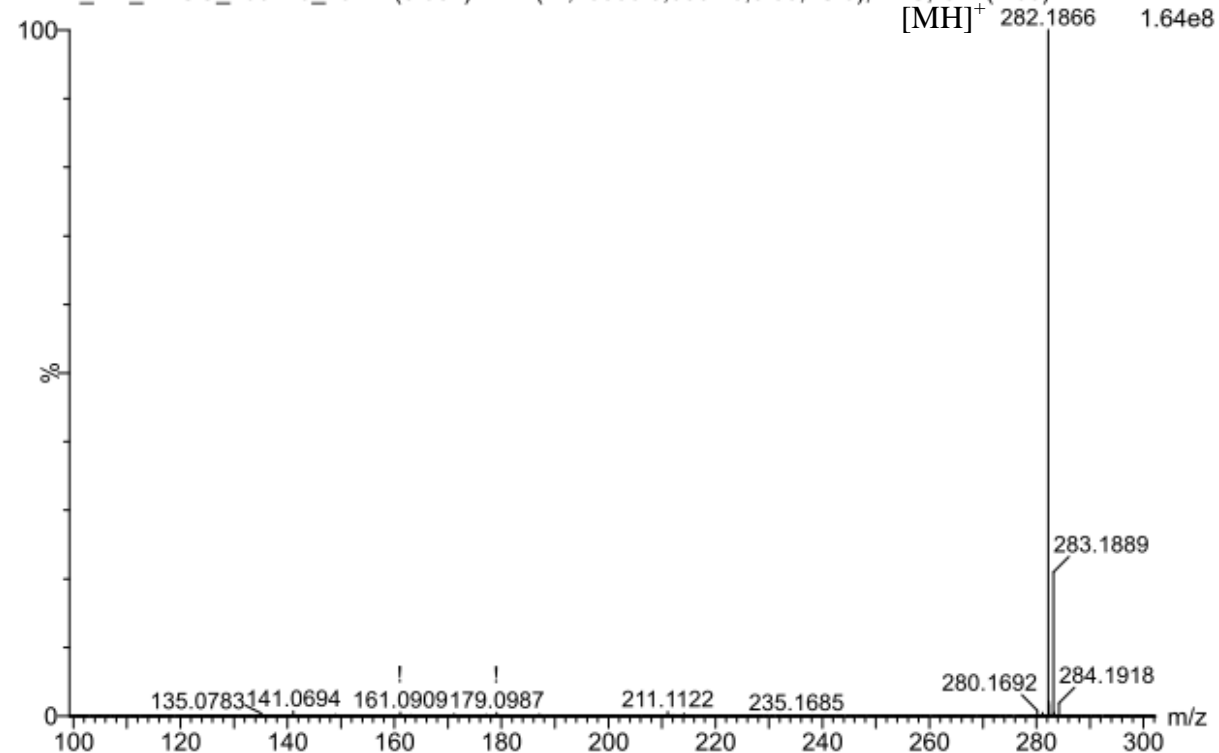
24-Apr-2013 11:02:33

LEMNND_DRUG_130424_01 16 (0.288) AM (Cen,2, 80.00, Ht,10000.0,282.19,0.00); Cm (1:59)

4.83e7



LEMNND_DRUG_130423_19 17 (0.364) AM2 (Ar,20000.0,556.28,0.00,LS 3); ABS; Cm (1:50)



Obn. 20 – MS/MS a MS spektrum NRG-1 (0,5 mg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

4.3 Identifikace vzorků zadržovaných drog v moči

Cílem analýz bylo identifikovat pomocí ESI-MS/IMS/MS NRG-1 a ETH-CAT v lidské moči po jednoduché předchozí úpravě vzorku. Analyzovány byly celkem tři koncentrační úrovně připravené známým přídatkem (viz. experimentální část). Pro izolaci analytů z moče bylo použito extrakční metody „QuEChERS“, která je poměrně rychlá a jednoduchá. Použitý postup QuEChERS je vyvíjen pro analýzu opiátů. Nicméně i ve stávající podobě je zřejmý jeho potenciál v kombinaci s ESI-MS/IMS/MS pro studované látky. Samozřejmě bude nutné detailně posoudit efektivitu izolačního postupu pro analýzu katinonů a fenylethylaminů a případně navrhnout jeho modifikaci, i když obecně by bylo vhodné aplikovat jeden postup pro účely záchytu co nejširšího spektra drog.

Výsledky analýz ukázaly, že již při koncentraci 0,1 µg/ml moči bylo možné v MS spektru pozorovat signál protonované molekuly NRG-1 i ETH-CAT a pro jednoznačnou identifikaci byla pořízena fragmentační spektra. Pro názornost jsou níže uvedena MS a MS/MS spektra obou látek při jejich koncentrační úrovni 1 µg/ml moči (Obr. 22, Obr. 23). Ostatní pořízená hmotnostní spektra jsou součástí přílohy (Příloha 24-27 str. 69-95).

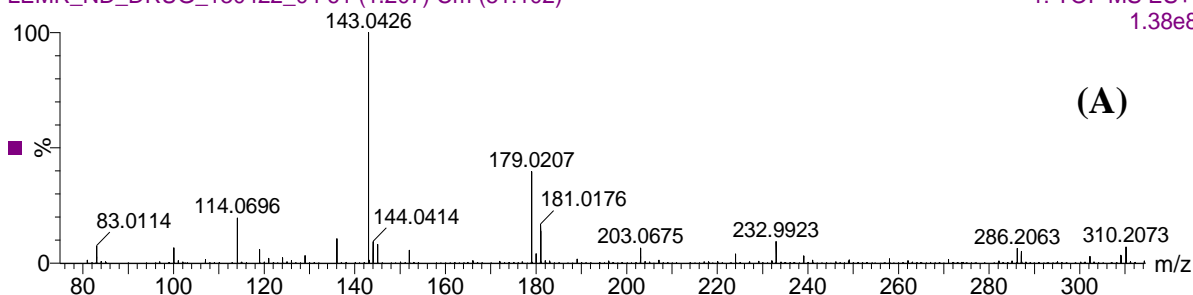
V MS spektru NRG-1 byl opět dominantním iontem protonovaná molekula (m/z 282), která při fragmentaci poskytovala především dva fragmenty o hodnotě m/z 211 a 141. Jak již bylo diskutováno dříve, ETH-CAT tvoří méně stabilní protonovanou molekulu (m/z 178), která snadno fragmentuje a poskytuje typický fragment m/z 160 odpovídající ztrátě H_2O z původního iontu parentu a sérii fragmentů o m/z 132, 131 a 130. S klesající koncentrační úrovní analytů v analyzovaném materiálu bylo možné pozorovat další dříve nezaznamenané fragmenty, které dříve nebylo možné zaznamenat. V případě NRG-1 se jednalo o fragmenty m/z 224 a 150, u ETH-CAT potom m/z 143, 118, 100 a 83. Jejich přítomnost lze zdůvodnit interferencí matrice reálného vzorku. Při izolaci protonované molekuly je využíváno okno cca $\Delta m/z$ 1 a nelze zabránit spolufragmentaci složky matrice. Její příspěvek se stává významnější s klesající koncentrací sledované látky. Obr. 21 poukazuje na značný vliv iontové mobility na zvýšení selektivity měření. Sledovaný ion m/z 286,2063 poskytuje relativně málo intenzivní signál oproti iontům matrice (Obr. 21-A). S využitím tandemové hmotnostní spektrometrie je možné provést izolaci tohoto iontu a získat fragmentační spektrum (Obr. 21-B). I při použití nejužšího možného izolačního okna ($\Delta m/z < 1$) dochází k současné izolaci a fragmentaci analytu a interferujících látek. Fragmentační spektrum pak obsahuje řadu intenzivních signálů, které neodpovídají sledovanému analytu. Jeho interpretace je tak problematictější a při

porovnání s databází spekter standardů může zcela selhat. Je-li však kromě izolace sledovaného iontu následně provedena jeho mobilní separace a až poté fragmentace lze selektivitu měření výrazně zvýšit. Fragmentační spektrum získané pro fragmentační pík (Obr. 21-C) vykazuje dobrou shodu s fragmentací standard a je očištěno od interferujících iontů. Postup, který lze označit MS/IMS/MS, tedy izolace iontu podle m/z, mobilní separace a následná fragmentace výrazně redukuje vliv matrice a to může dopomoci ke snadnější identifikaci neznámé látky ve vzorku i při jeho nízkých koncentracích.

NRG-1, 0.05 µg/ml H2O:ACN 1:1, 5µl/min

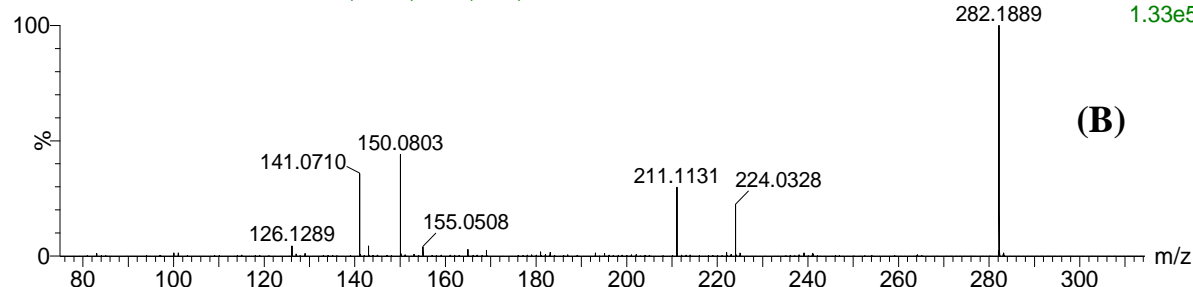
LEMUR_ND_DRUG_130422_04 61 (1.207) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
1.38e8



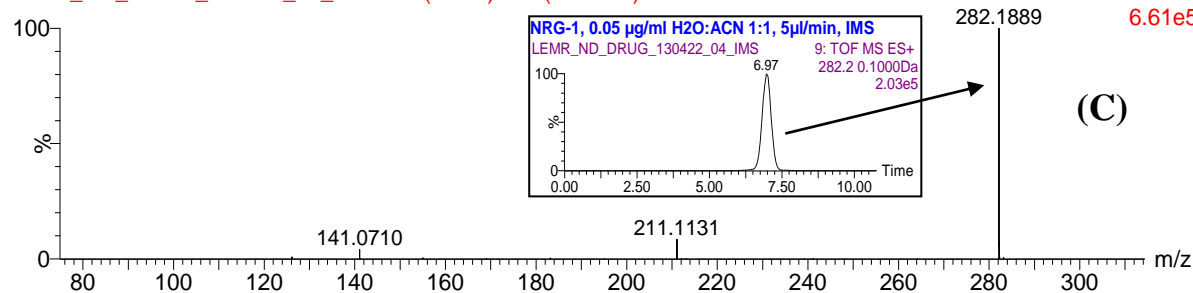
LEMUR_ND_DRUG_130422_04 1 (2.032) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 282.20ES+
282.1889 1.33e5



LEMUR_ND_DRUG_130422_04 IMS 130 (6.966) Cm (123:136)

9: TOF MS ES+
282.1889 6.61e5



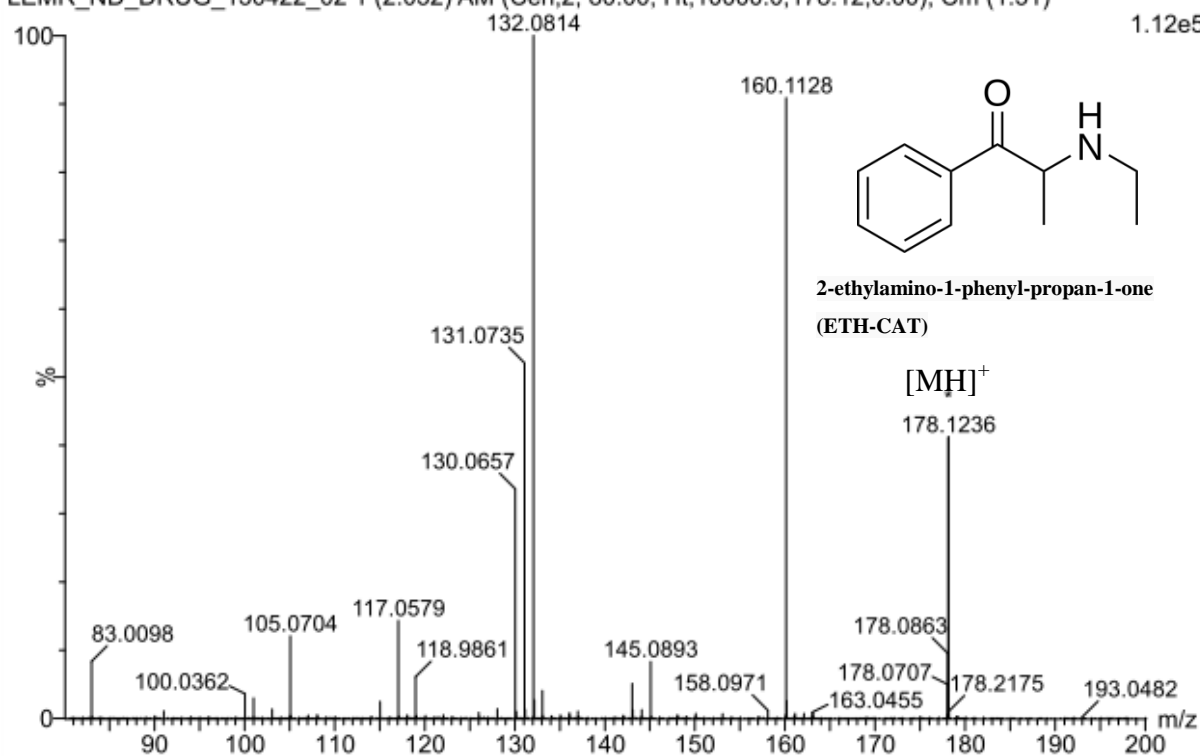
Obr. 21 – Vliv iontové mobilní separace na selektivitu měření (A) MS-„full scan“ (B) MS/MS (C) IMS/MS²

ETH-CAT, 0.5 µg/ml H₂O:ACN 1:1, 5µl/min

22-Apr-2013 18:05:27

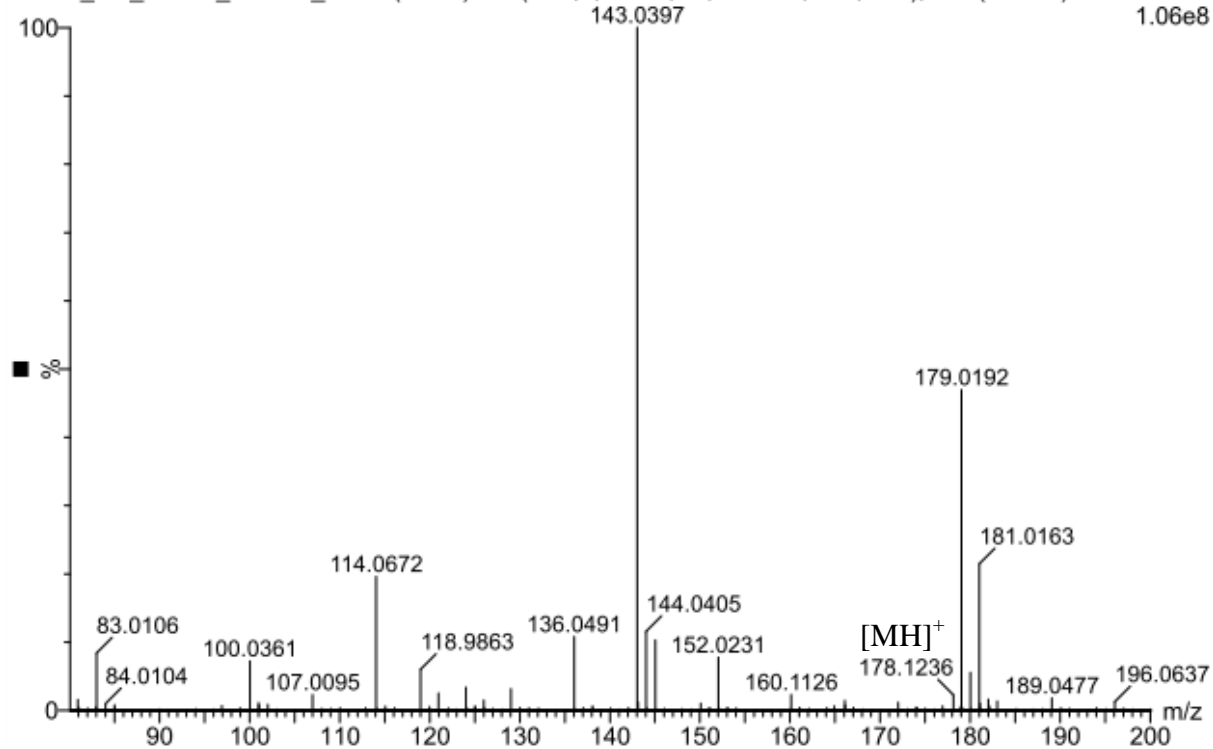
LEMNND_DRUG_130422_02 1 (2.032) AM (Cen,2, 80.00, Ht,10000.0,178.12,0.00); Cm (1:51)

1.12e5



LEMNND_DRUG_130422_02 61 (1.207) AM (Cen,2, 80.00, Ht,10000.0,0.00,0.00); Cm (51:101)

1.06e8



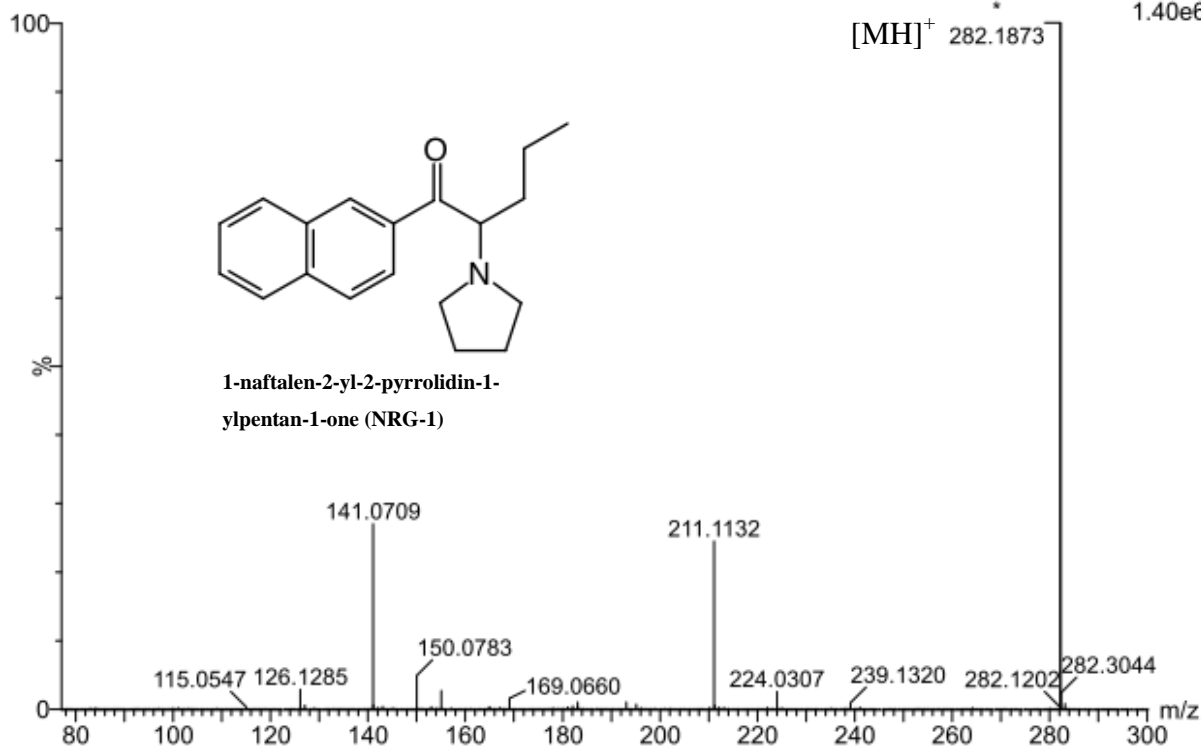
Obr. 22 - MS/MS a MS spektrum ETH-CAT po extrakci z moči (0,5 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

NRG-1, 0.5 µg/ml H₂O:ACN 1:1, 5µl/min UEB143

22-Apr-2013 19:04:59

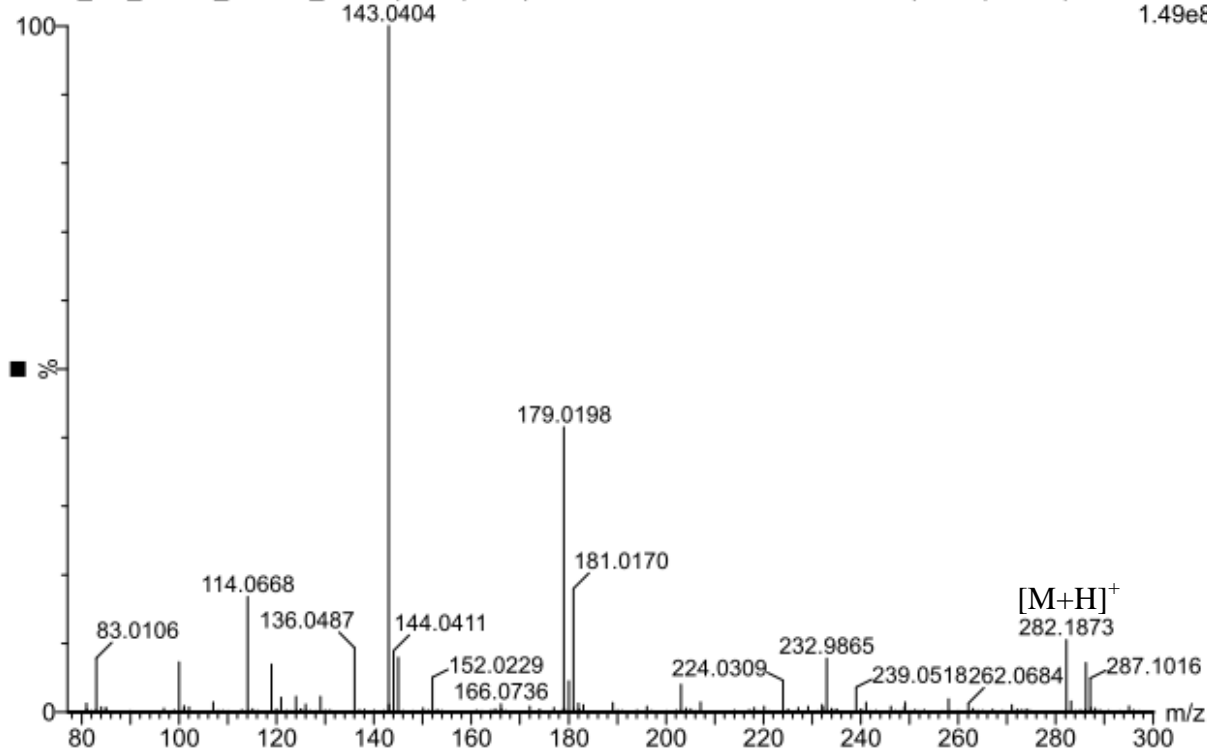
LEMUR_ND_DRUG_130422_05 1 (2.032) AM (Cen,2, 80.00, Ht,10000.0,282.19,0.00); Cm (1:49)

1.40e6



LEMUR_ND_DRUG_130422_05 68 (1.345) AM (Cen,2, 80.00, Ht,10000.0,0.00,0.00); Cm (50:102)

1.49e8



Obr. 23 - MS/MS a MS spektrum NRG-1 po ekstrakci z moči (0,5 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v)) – korigovaná data

5. ZÁVĚR

V analýze „new designer drugs“, ale i ostatních drog mají své významné postavení separační techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Jelikož jsou analyzovanými vzorky většinou biologické materiály (moč, krev, vlasy apod.), je ve většině případů nutná předchozí úprava vzorku. V klinické a forenzní praxi je žádoucí co možná nejkratší doba od samotného příjmu vzorku, po vyhodnocení výsledků analýz. Eliminovat někdy zdlouhavou a složitou úpravu vzorku, a tím redukovat celkový čas analýz dovolují ambientní ionizační techniky hmotnostní spektrometrie. Časovou úsporu, ale i zjednodušení analýzy a úsporu nákladů (není nutná chromatografická kolona) mohou poskytnout i pro jednodušší vzorky substancí zadržovaných na nelegálním trhu. Pro zlepšení selektivity měření bez chromatografické separace lze také využít iontovou mobilitu ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Pomocí iontově mobilní separace a hmotnostní spektrometrie byl s využitím elektrospreje zpracován přehled vybraných „new designer drugs“, a také prekurzorů pro jejich výrobu. Přehled zahrnuje mobilitní a hmotnostně spektrometrická data pro 23 standardů použitelná pro identifikaci studovaných látek v neznámých vzorcích. Byly popsány základní fragmentační procesy pro fenylethylaminy a katinony. Samotná hmotnostní spektra jsou součástí přílohy. Naměřených dat by mohlo být potenciálně využito v budoucnu ve forenzní praxi k rychlejší identifikaci zachycených látek.

Ke screeningu zadržovaných reálných vzorků substancí bylo využito ionizace elektrosprejem i sondou ASAP. Obě iontové techniky poskytly data nezbytná k identifikaci látek a jsou pro vyšetření neznámých vzorků drog vhodné. Elektrosprej poskytuje delší dobu pro sběr dat, vzorek je zaváděn přímou infuzí, ASAP naopak nevyžaduje proplach systému při sériovém měření vzorků. Kritickým parametrem u sondy ASAP je volba teplotního programu pro desorpci látek. Vhodný teplotní program dovoluje snížit například opozadí spektra měřené látky.

ESI-MS/IMS/MS experimenty prokázaly potenciál této techniky pro analýzu drog v moči. Metoda izolace drog z moče založená na postupu „QuEChERS“ byla poměrně rychlá, jednoduchá a přispěla k průkazu analytů na koncentrační hladině 0,1 µg/ml. Ionově mobilní separační krok v ESI-MS/IMS/MS experimentu výrazně redukuje vliv matrice, což může dopomoci ke snadnější identifikaci neznámé látky ve vzorku i při jeho nízkých koncentracích. Průkaz drog na koncentrační úrovni 0,1 µg/ml moči je vyhovující pro jejich screening, neboť

cut-off hodnoty používaných imunoanalytických detekčních technik se pohybují například pro MDMA, MDA, MDE, MBDB na hladině 0,2 ug/ml moči a výše.⁷¹

6. POUŽITÁ LITERATURA

1. Volný M., Lemr K., Hajdúch M., Vidová V., Šulc M., Kuzma M., Benada O., Havlíček V.: *Chem. Listy* 104, 441-442 (2010).
2. Nedvěd J., Hajdúch M., Lemr K., Havlíček V.: *Chem. Listy* 105, 356-360 (2011).
3. Štulík K. a kol. : *Analytické separační metody*, Praha (2004).
4. Němcová I., Engst P., Jelínek I., Sejbál J., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody II.*, Praha (1998).
5. Vidová V., Lemr K., Havlíček V.: *Chem. Listy* 102, 957-959 (2008).
6. Lemr K.: *Chem. Listy* 106, 479-481 (2012).
7. Huang M.-Z., Cheng S.-Ch., Cho Y.-T., Shiea J.: *Analytica chimica Acta* 702, 1-15 (2011).
8. Huang M.Z., Yuan Ch.-H., Cheng S.-Ch., Cho Y.-T., Shiea J.: *Annu. Rev. Anal. Chem.* 3, 43-65 (2010).
9. Green F. M., Salter T. L., Stokes P., Gilmore I. S., O'Connor G. O.: *Surf. Interface Anal.* 42, 347-357 (2010).
10. Zhu L., Gamez G., Chen H.W., Huang H.X., Chingin K., Zenobi R.: *Rapid Commun. Mass. Spectrom* 22, 2993-2998 (2008).
11. Manicke N. E., Nefliu M., Wu Ch., Woods J.W., Reiser V., Hendrickson R.C., Cooks R.G.: *Anal. Chem.* 81, 8702-8707 (2009).
12. Pól J., Vidová V., Kruppa G., Koblíha V., Novák P., Lemr K., Kotiaho T., Kostiaien R., Havlíček V., Volný M.: *Anal. Chem.* 81, 8479-8487 (2009).
13. Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., Cooks R. G.: *Science* 306, 471-473 (2004).
14. Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K.: *Chem. Listy* 101, 524 (2007).
15. Ranc V., Havlíček V., Bendář P., Lemr K.: *Eur. J. Mass Spectrom* 14, 411-417 (2008).
16. Roach P.J., Laskin J., Laskin A.: *Analyst* 135, 2233-2236 (2010).
17. Goullé J.P., Mahieu L., Castermant J., Neveu N., Bonneau L., Lainé G., Bouige D., Lacroix Ch.: *Forensic Science International* 153, 39-44 (2005).

18. De Gelder J., Vandenabeele P., Govaert F., Moens L. : *J. Raman Spectrosc.* *36*, 1059 (2005).
19. Esteve-Turrillas F. A., Armenta S., Moros J., Garrigues S., Pastor A., de la Guardia M. : *J. Chromatogr.* *321*, 1065 (2005).
20. Bones J., Macka M., Paull B. : *Analyst (Cambridge, U.K.)* *132*, 208 (2007).
21. Petrovic M., Hernando M.D., Díaz-Cruz M.S., Barceló D.: *J. of Chromatogr. A* *1067*, 1-14 (2005).
22. Halasz A., Groom C., Zhou E., Paquet L., Beaulieu C., Deschamps S., Corriveau A., Thiboutot S., Ampleman G., Dubois C., Hawari J.: *J. of Chromatogr. A* *963*, 411-418 (2001).
23. Wu Ch., Steiner W.E., Tornatore P.S., Matz L.M., Siems W.F., Atkinson D.A., Hill H.H.: *Talanta* *57*, 123-134 (2002).
24. Reis E., Sarkis J., Neto O., Rodrigues C., Kakazu M., Viebig S.: *J. Forensic Sci.* *48*, 1-5 (2003).
25. Armenta S., de la Guardia M. : *Trends Anal. Chem.* *27* , 344 (2008).
26. Cody R.B., Laramée J.A., Nilles J.M., Durst H.D.: *JEOL News* *40*, 8-12 (2005).
27. Ratcliffe L.V., Rutten F., Barrett D.A., Whitmore T., Seymour D., Greenwood C., Aranda-Gonzalvo Y., Robinson S., McCoustra M.: *Anal. Chem.* *79*, 6094-6101 (2007).
28. Wang R., Gröhn A.J., Zhu L., Dietiker R., Wegner K., Günther D., Zenobi R.: *Anal. Bioanal. Chem.* *402*, 2633-2643 (2012).
29. Chen H., Venter A., Cooks R.G.: *Chem. Commun.* *19*, 2042-2044 (2006).
30. Cotte-Rodriguez I., Cooks R.G.: *Chem. Commun.* *28*, 2968-2970 (2006).
31. Justes D.R., Talaty N., Cotte-Rodriguez I., Cooks R.G.: *Chem. Commun.* *21*, 2142-2144 (2007).
32. Garcia-Reyes J.F., Harper J.D., Salazar G.A., Charipar N.A., Ouyang Z., Cooks R.G.: *Anal. chem.* *83*, 1084-1092 (2011).
33. Yang Z., Pavlov J., Attygalle A.B.: *J. Mass Spectrom.* *47*, 845-852 (2012).
34. D'Agostino P.A., Chenier C.L., Hancock J.R., Lepage C.R.: *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* *21*, 543-549 (2007).
35. D'Agostino P.A., Chenier C.L.: *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* *24*, 1617-1624 (2010).

36. Ouyang Z., Noll R.J., Cooks R.G.: *Anal. Chem.* 81, 2421-2425 (2009).
37. Sanders N.L., Kothari S., Huang G., Salazar G., Cooks R.G.: *Anal. Chem.* 82, 5313-5316 (2010).
38. Leuthold L.A., Mandscheff J.F., Fathi M., Giroud M., Augsburger M, Varesio E., Hopfgartner G.: *CHIMIA* 60, 190-194 (2006).
39. Fernandez F.M., Cody R.B., Green M.D., Hampton Ch. Y., McGready R., Sengaloundeth S., White N.J., Newton P.N.: *Chem. Med. Chem.* 1, 702-705 (2006).
40. Kauppila T.J., Talaty N., Kuuranne T., Kotiaho T., Kostianen R., Cooks R.G.: *Analyst* 132, 868-875 (2007).
41. Lin Z., Zhang S., Zhao M., Yang Ch., Chen D., Zhang X.: *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* 22, 1882-1888 (2008).
42. Zhao Y., Lam M., Wu D., Mark R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 3217-3224 (2008).
43. Berchtold Ch., Meier L., Zenobi R.: *Int. J. of Mass Spectrom.* 299, 145-150 (2011).
44. Ifa D.R., Gumaelius L.M., Eberlin L.S., Manicke N.E., Cooks R.G.: *Analyst* 132, 461-467 (2007).
45. Ifa D.R., Manicke N.E., Dill A.L., Cooks R.G.: *Science* 321, 805 (2008).
46. Petreň, M.: *Bakalářská práce. Univerzita Palackého, Olomouc* (2011).
47. Ruotolo B.T., Benesch J.L., Sandercock A.M., Hyung S.-J., Robinson C.V.: *Nature Protocols* 3, 1139-1152 (2008).
48. Laphorn C., Pullen F., Chowdhry B.Z.: *Mass Spectrometry Reviews* 32, 43-71 (2013).
49. Keller T., Miki A., Regenscheit P., Dirnhofer R., Schneider A., Tsuchihashi H.: *Forensic Science International* 94, 55-63 (1998).
50. <http://www.regionrevue.cz/amsterdam-shop-se-vraci.a290.html> (5.1.2013).
51. Páleníček T., Kubů P., Mravčík V.: *Nové syntetické drogy*, Praha (2004).
52. Rufer M.: *Tabletky štěstí: Extáze, Prozac – návrat psychofarmak?*, Brno (1998).
53. <http://www.extc.cz/extaze.html> (5.1.2013).
54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (12.2.2013).
55. Edgar B.C.: *The UXL Encyclopedia of Drugs & Addictive Substances*, Thomson-Gale (2006).
56. Kalix P.: *Psychopharmacology* 74, 269-270 (1981).
57. Tanaka E. et al.: *Forensic Science International* 163, 152–154 (2006).

58. Sklerov J., Barry L., Moore L.A., King T., Fowler D.: *J. of Analytical Toxicology* 29, 839-841 (2005).
59. Verweij A., Lipman P.: *J. of Chromatogr. Science* 34, 379-382 (1996).
60. Midha K.K., Cooper J.K., Gagné D., Bailey K.: *J. Anal. Toxicol.* 3, 53 (1979.)
61. Clark C.R., Valer A.K., Davis W.R.: *J. Liq. Chromatogr.* 13: 1375 (1990).
62. Fitzgerald R.L., Blake R.V., Glinnon R.A, Yousif N.Y., Roserans J.A., Poklis A.: *J. Chromatogr.* 490, 59 (1989).
63. Kato N. et al.: *J. of Chromatogr. A* 1145, 229-233 (2007).
64. Theobald D.S., Fehn S., Maurer H.H.: *J. of Mass Spectrometry* 40, 105-116 (2005).
65. Theobald D.S., Staack R.F., Puetz M., Maurer H.H.: *J. of Mass Spetrometry* 40, 1157-1172 (2005).
66. Theobald D.S., Pütz M., Schneider E., Maurer H.H.: *J. of Mass Spectrometry* 41, 872-886 (2006).
67. Theobald D.S., Maurer H.H.: *J. of Chromatogr. B* 842, 76-90 (2006).
68. Theobald D.S., Fritschi G., Maurer H.H.: *J. of Chromatogr. B* 846, 374-377 (2007).
69. Chen B.H., Liu J.T., Chen W.X., Chen H.M., Lin Ch.H.: *Talanta* 74, 512-517 (2008).
70. Lucie Borovcová: dosud nepublikované výsledky.
71. Kazanga I., Tameni S., Piccinotti A., Floris I., Zanchetti G., Poletini A.: *Forensic Science International* 215, 46-50 (2012).

7. SEZNAM ZKRATEK

ASAP – atmospheric solids analysis probe

CAT – katinony, cathinones

DART – přímá analýza v reálném čase,
direct analysis in real time

DESI – ionizace desorpčním
elektrospejem, desorption electrospray
ionization

nanoDESI – ionizace desorpčním nano-
elektrospejem, desorption nano-
electrospray ionization

DMA – differential mobility analyzer

DMS – differential mobility spektrometry

DT-IMS – drift time-ion mobility
spektrometry

EI – elektronová ionizace, elektron
ionization

ESI – ionizace elektrospejem, electrospray
ionization

EESI – ionizace extraktivním
elektrospejem, extractive electrospray
ionization

GC – plynová chromatografie, gas
chromatography

IMS – ion mobility spektrometry

LC – kapalinová chromatografie

LOD – limit detekce, limit of detection

LOQ – limit kvantifikace, limit of
quantification

PADI - desorpce-ionizace za účasti
plazmy, plasma assisted desorption
ionization

PEA – fenylethylaminy, phenethylamines

MS – hmotnostní spektrometrie, mass
spectrometry

MSI – hmotnostně spektrometrické
zobrazování, mass spectrometry paging

SPE – extrakce tuhou fází, solid phase
extraction

SPME – mikroextrakce tuhou fází, solid
phase microextraction

TOF – analyzátor doby letu, time of flight

TLC – tenkovrstevná kapalinová
chromatografie chromatografie, thin layer
chromatography

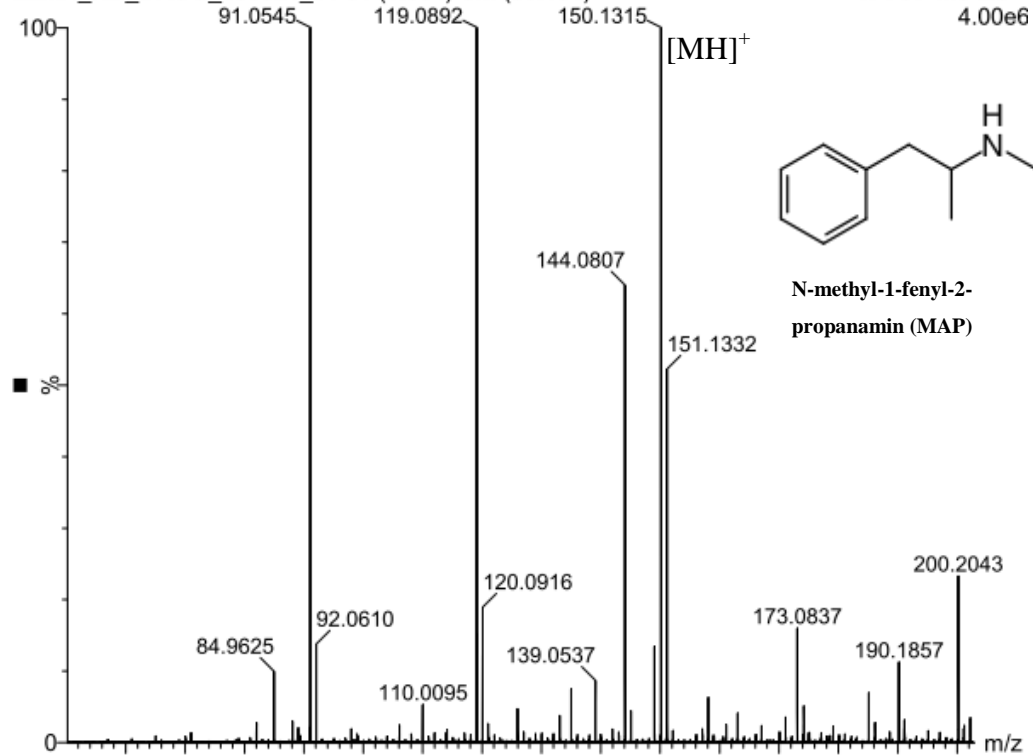
TWIMS – traveling wave ion mobility
spectrometry

8. PŘÍLOHY

MAP, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

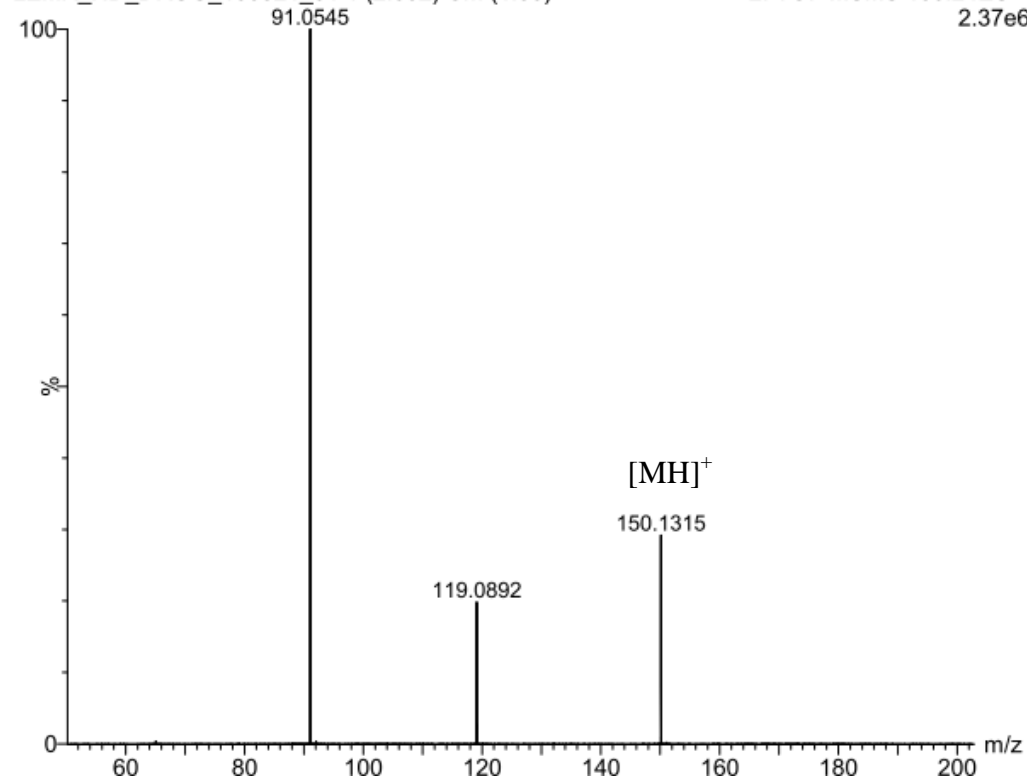
LEMUR_ND_DRUG_130321_01 81 (1.604) Cm (50:101)

1: TOF MS ES+
4.00e6



LEMUR_ND_DRUG_130321_01 1 (2.032) Cm (1:50)

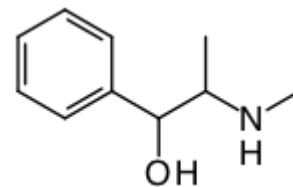
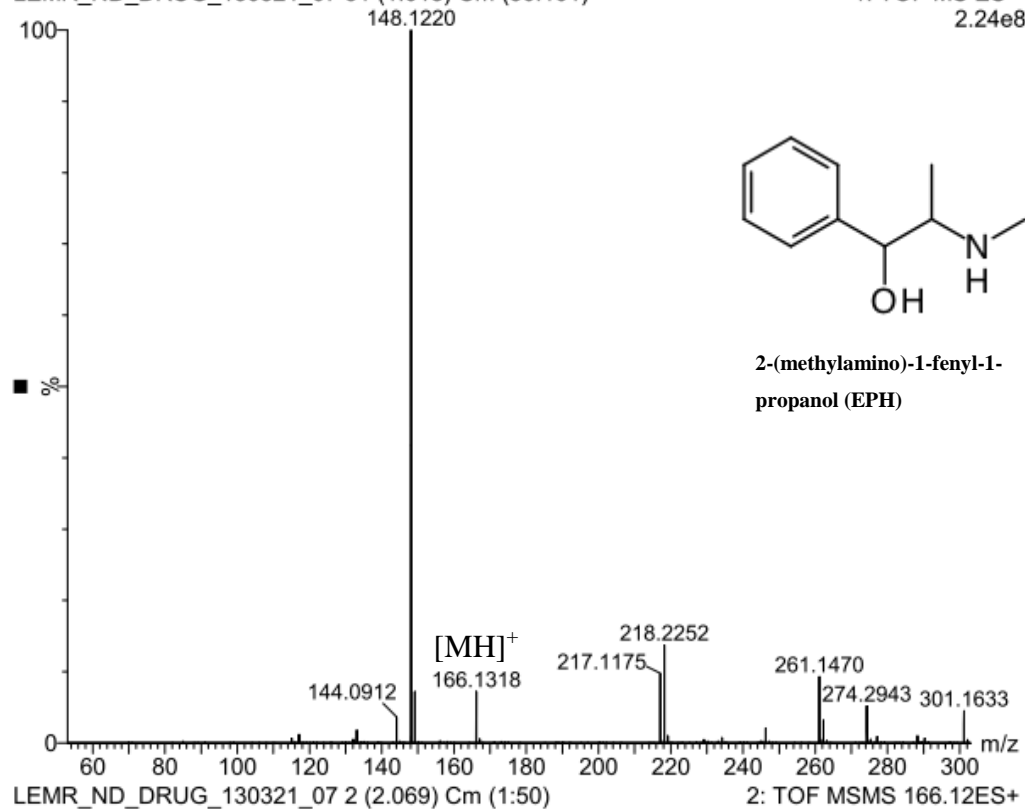
2: TOF MSMS 150.24ES+
2.37e6



Příloha 1– MS a MS/MS spektrum MAP (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

EPH, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMR_ND_DRUG_130321_07 51 (1.018) Cm (50:101)

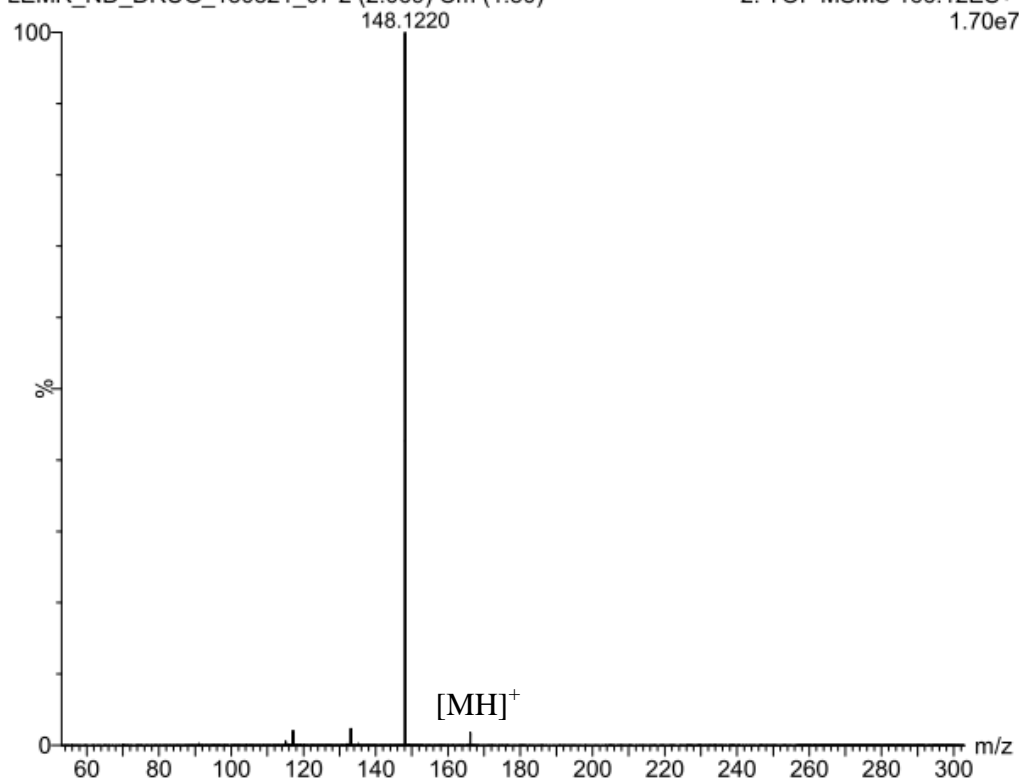
1: TOF MS ES+
2.24e8



2-(methylamino)-1-phenyl-1-propanol (EPH)

LEMR_ND_DRUG_130321_07 2 (2.069) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 166.12ES+
1.70e7

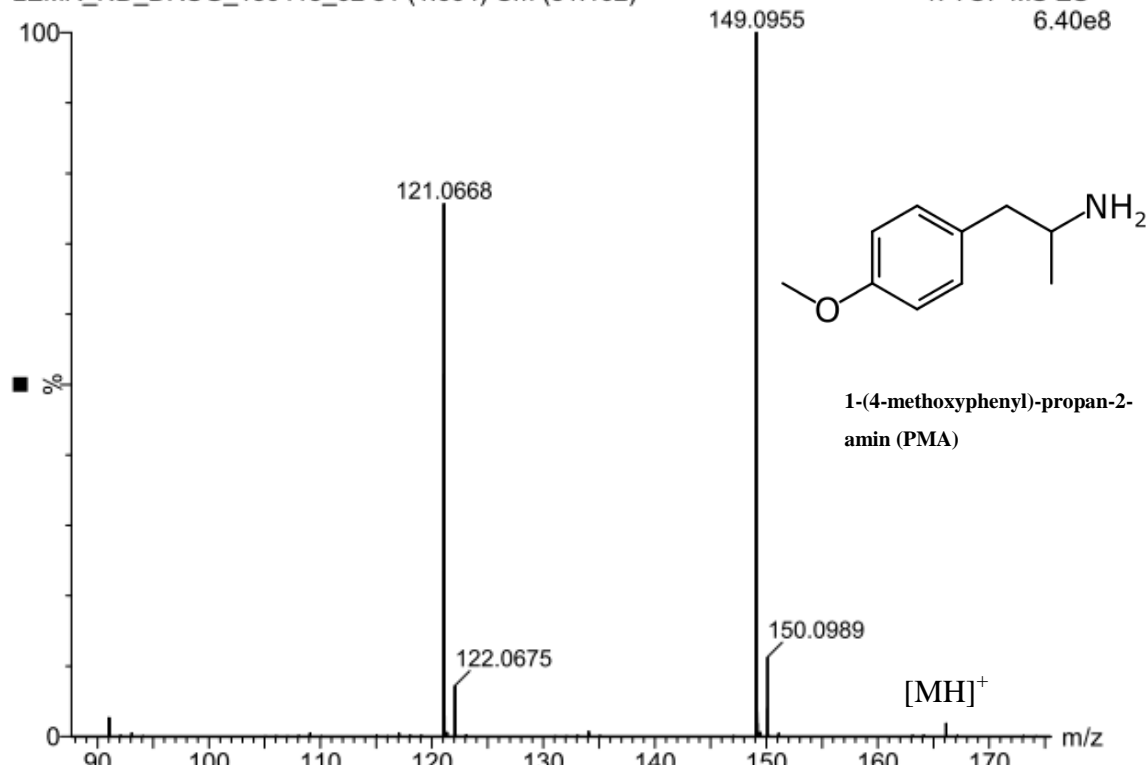


Příloha 2 – MS a MS/MS spektrum EPH (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

PMA, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

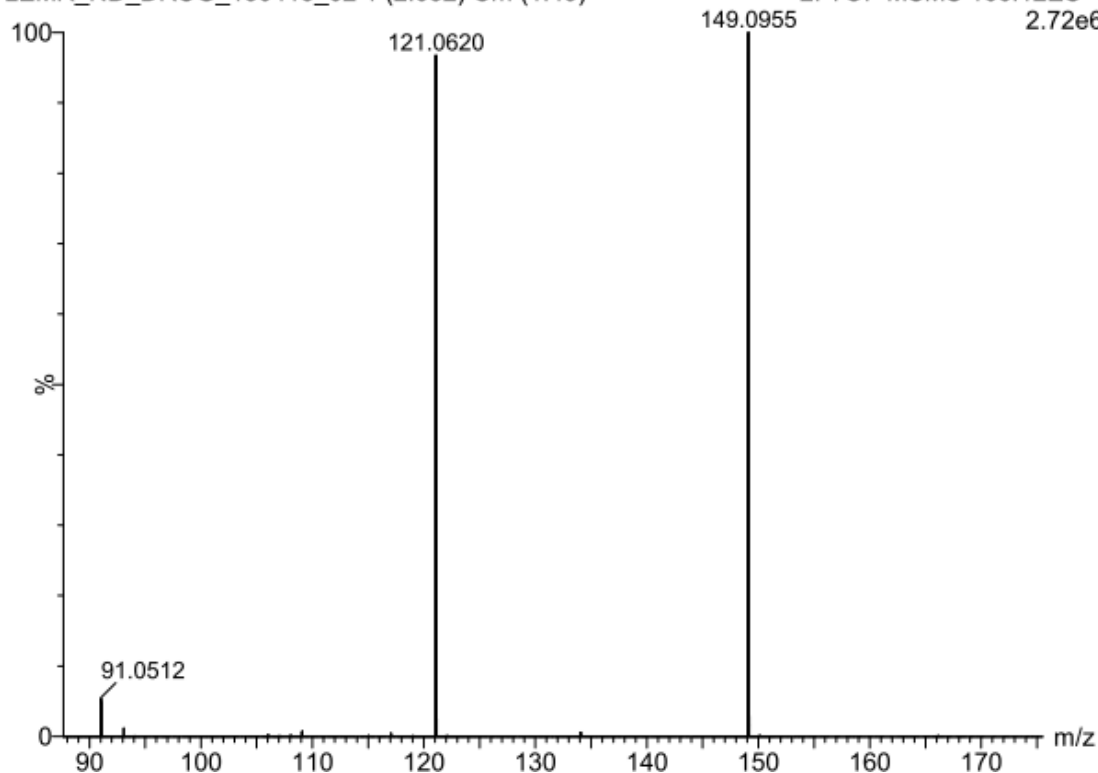
LEMUR_ND_DRUG_130415_02 81 (1.604) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
6.40e8



LEMUR_ND_DRUG_130415_02 1 (2.032) Cm (1:49)

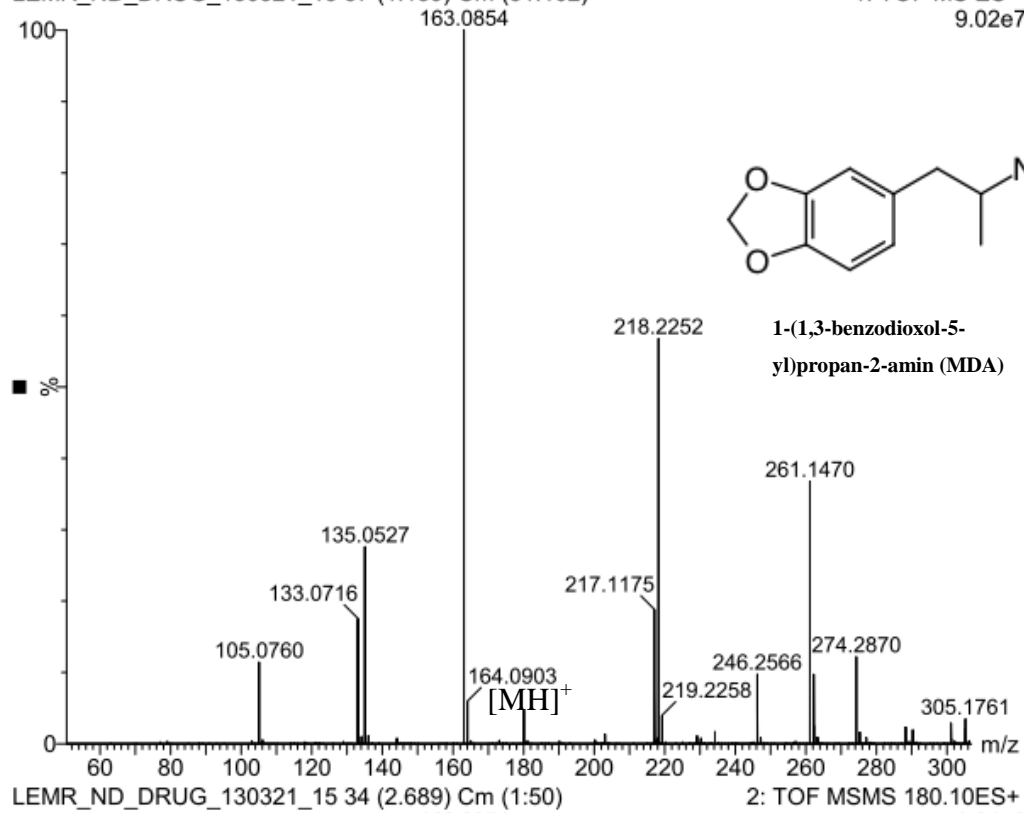
2: TOF MSMS 166.12ES+
2.72e6



Příloha 3 – MS a MS/MS spektrum PMA (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

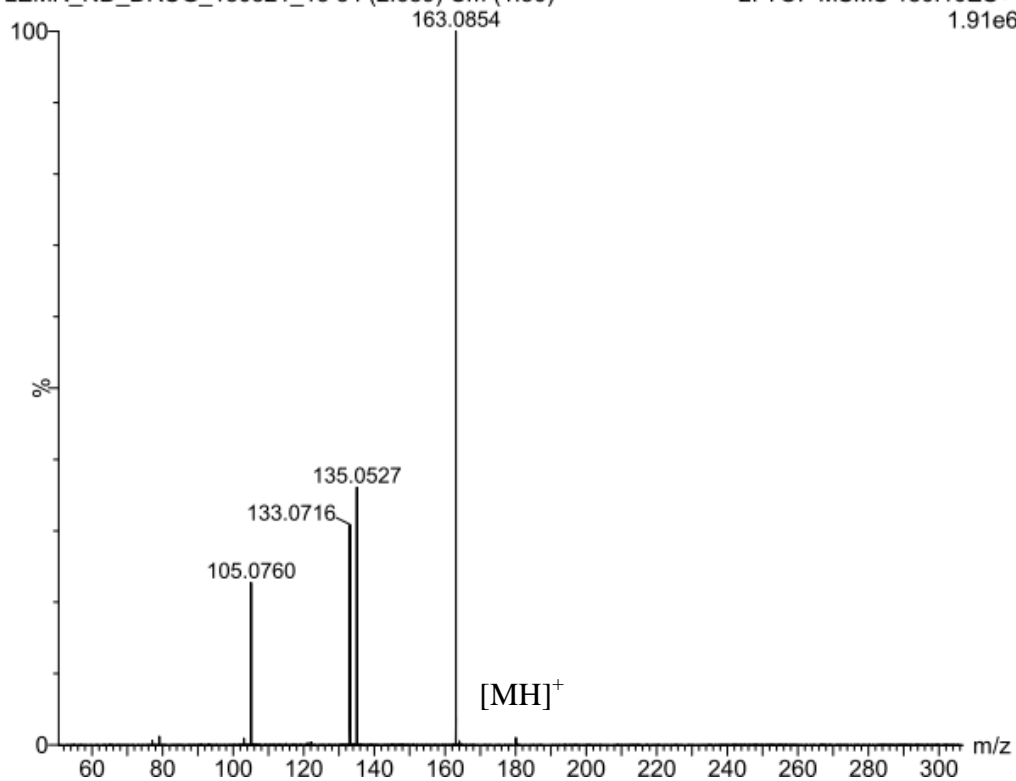
MDA, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130321_15 57 (1.139) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
9.02e7



LEMUR_ND_DRUG_130321_15 34 (2.689) Cm (1:50)

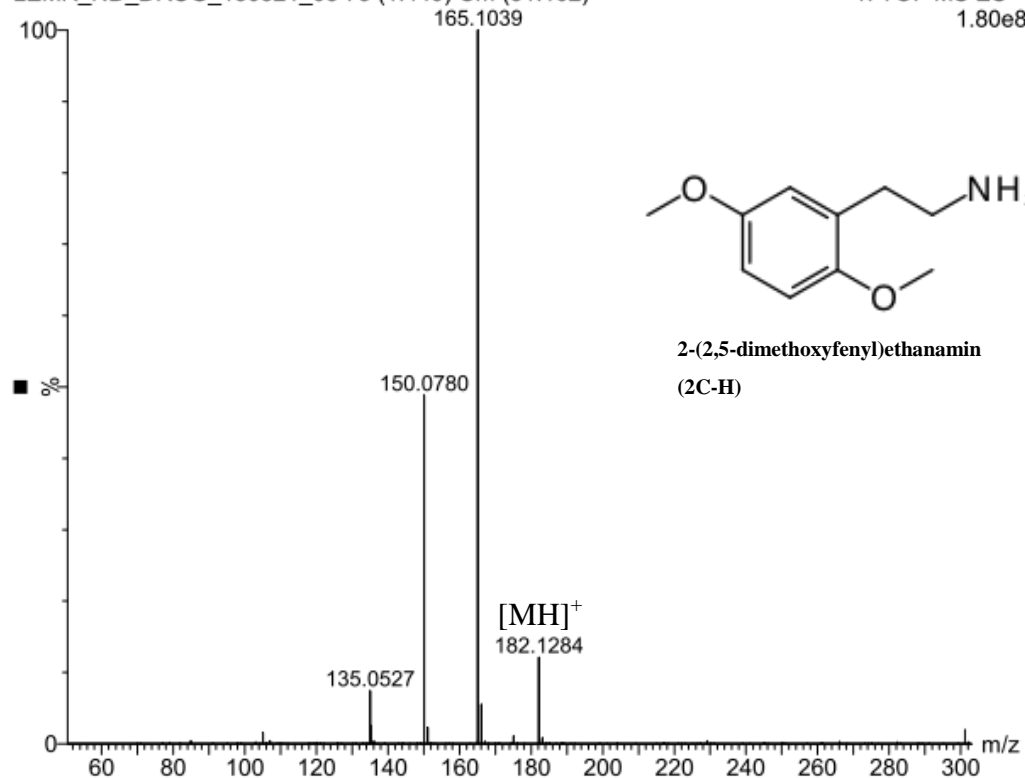
2: TOF MSMS 180.10ES+
1.91e6



Příloha 4 – MS a MS/MS spektrum MDA (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

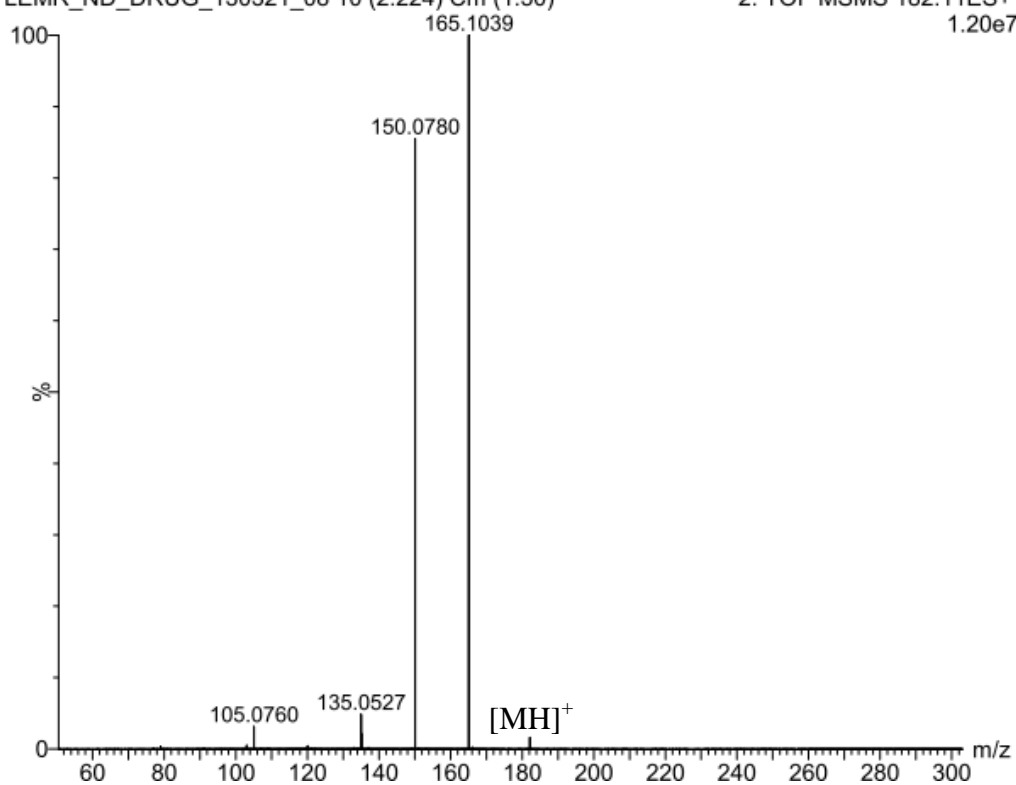
2C-H, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130321_08 73 (1.449) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
1.80e8



LEMUR_ND_DRUG_130321_08 10 (2.224) Cm (1:50)

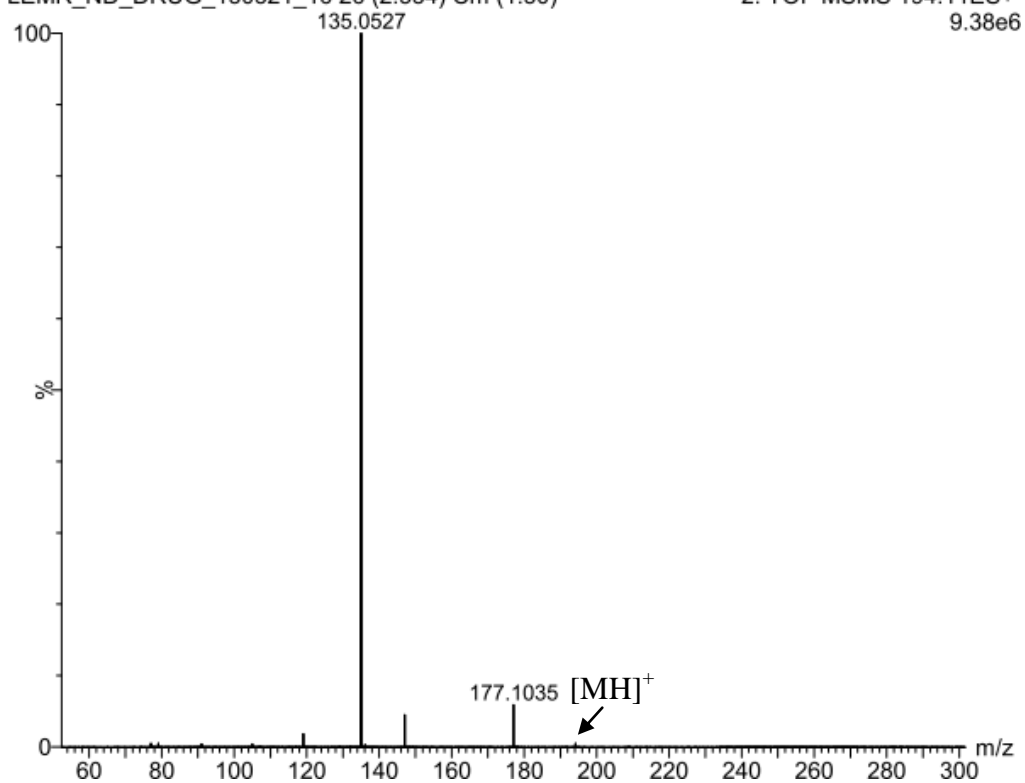
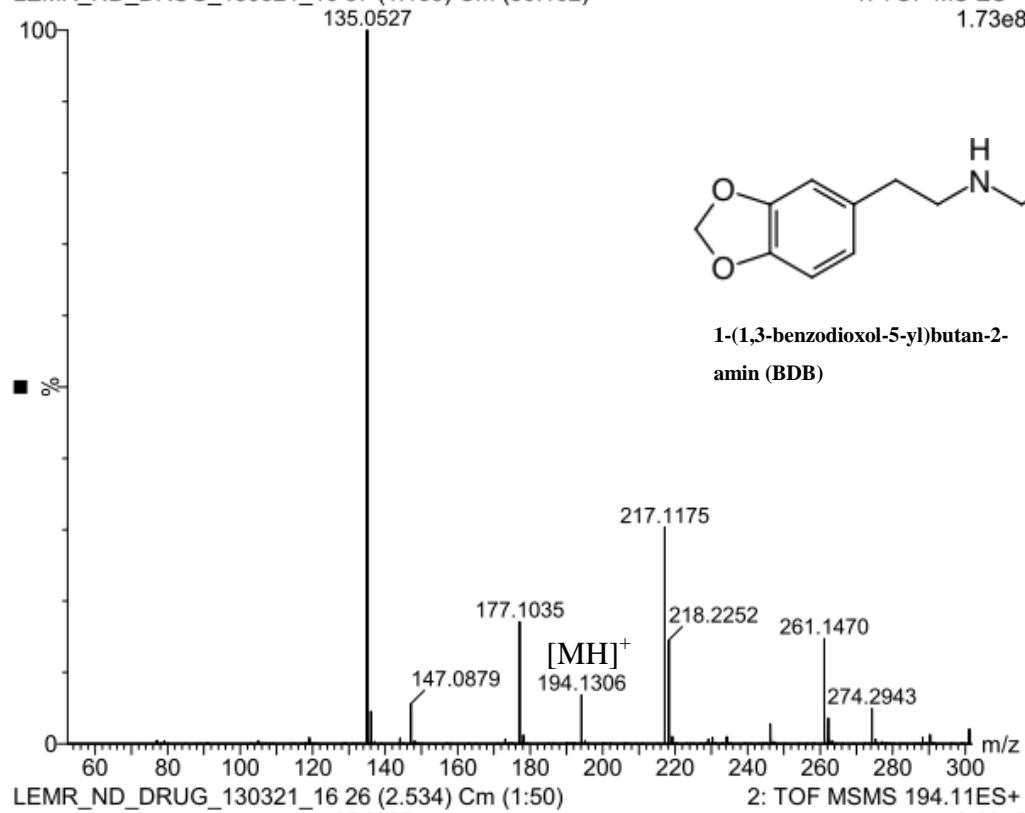
2: TOF MSMS 182.11ES+
1.20e7



Příloha 5 – MS a MS/MS spektrum 2C-H (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

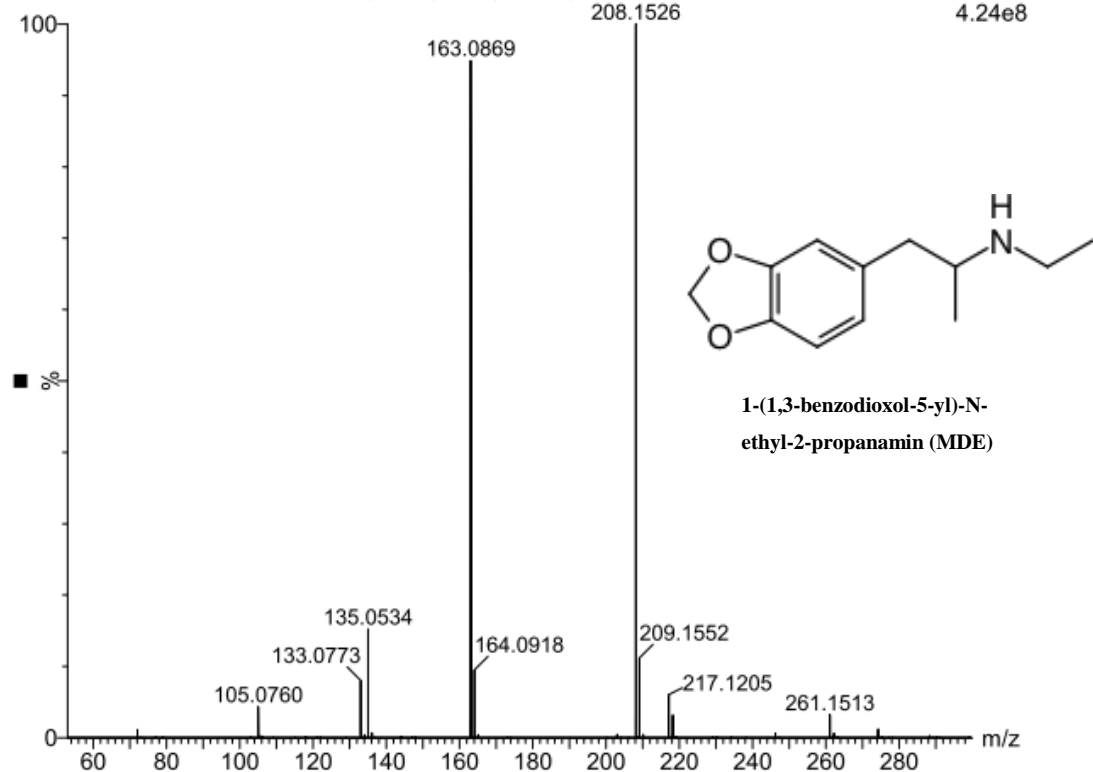
BDB, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130321_16 57 (1.139) Cm (50:102)

1: TOF MS ES+
1.73e8

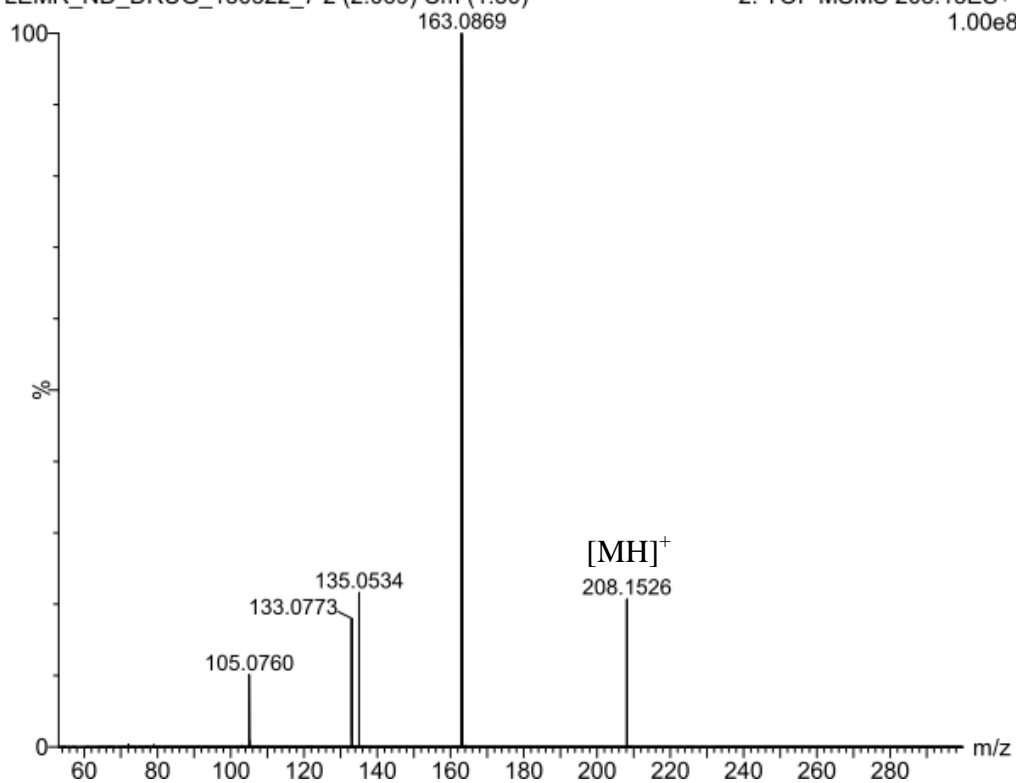


Příloha 6 – MS a MS/MS spektrum BDB (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

MDE, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
 LEMR_ND_DRUG_130322_7 97 (1.914) Cm (51:102) [MH]⁺ 1: TOF MS ES+ 4.24e8



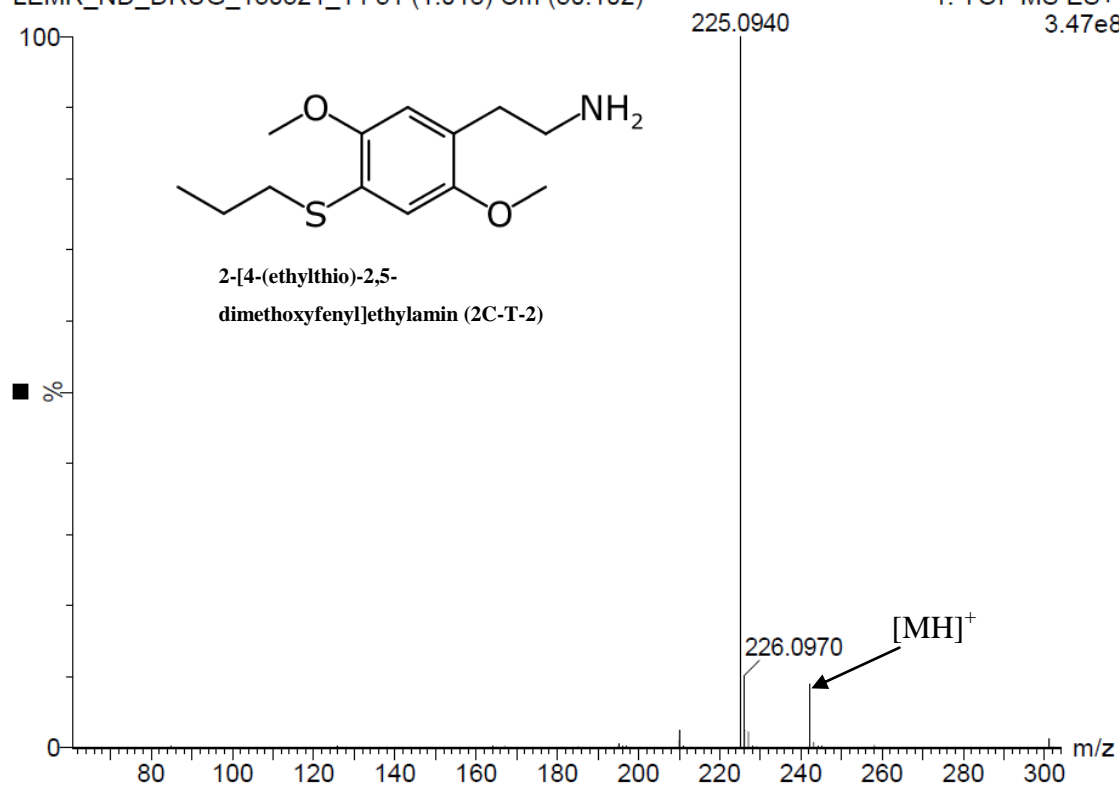
LEMUR_ND_DRUG_130322_7 2 (2.069) Cm (1:50) 2: TOF MSMS 208.13ES+ 1.00e8



Příloha 7 – MS a MS/MS spektrum MDE (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

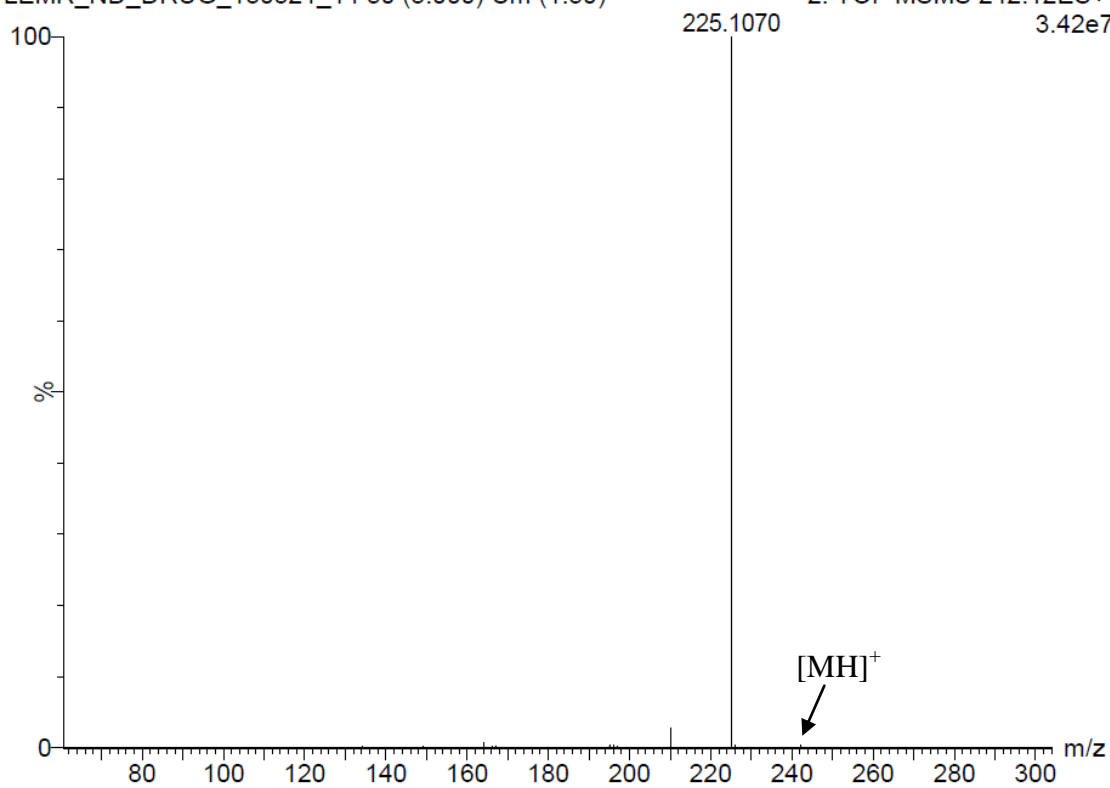
2C-T-2, 1 µg/ml H2O:CH3OH 1:1, 5µl/min
LEMR_ND_DRUG_130321_14 51 (1.018) Cm (50:102)

1: TOF MS ES+
3.47e8



LEMR_ND_DRUG_130321_14 50 (3.000) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 242.12ES+
3.42e7

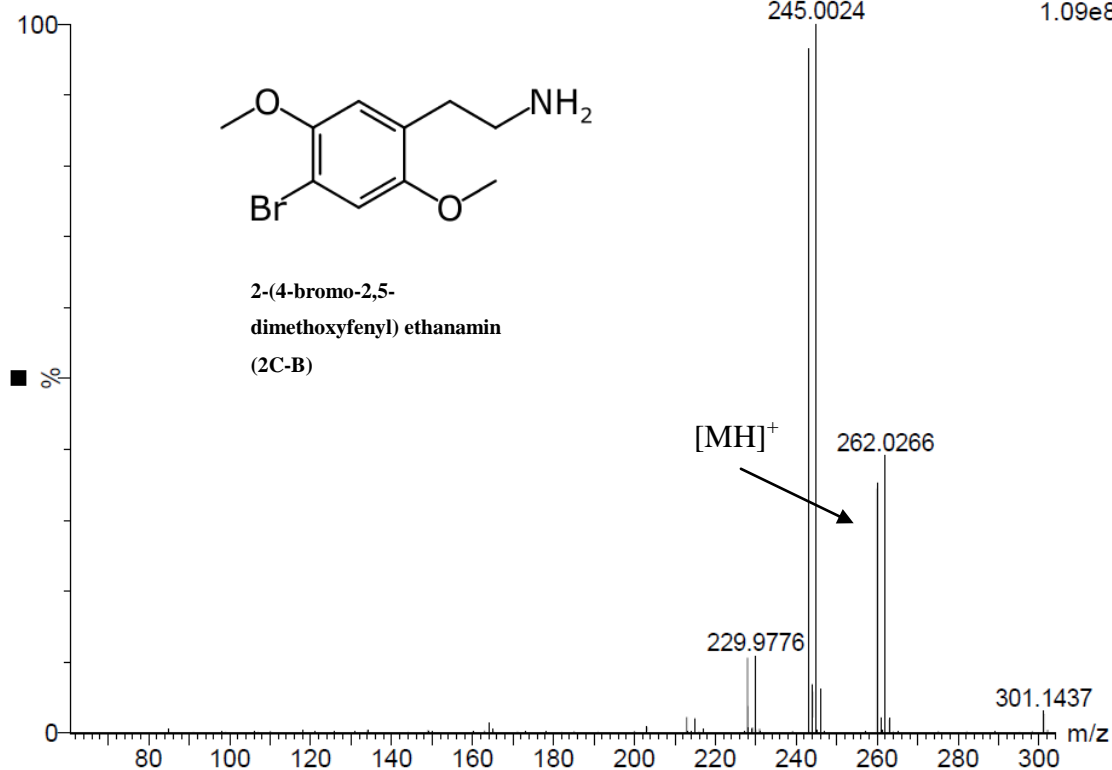


Příloha 8 – MS a MS/MS spektrum 2C-T-2 (1 µg/ml, H2O:CH3OH 1:1 (v/v))

2C-B, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

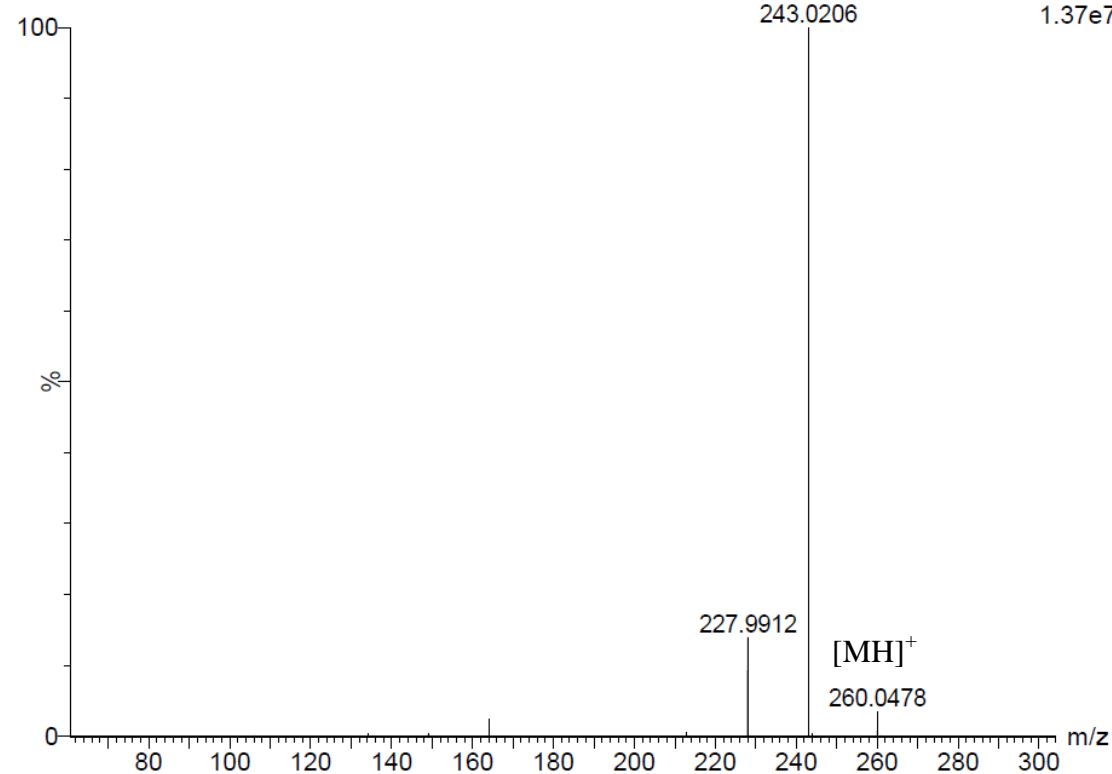
LEMUR_ND_DRUG_130321_12 81 (1.604) Cm (50:102)

1: TOF MS ES+
1.09e8



LEMUR_ND_DRUG_130321_12 1 (2.033) Cm (1:50)

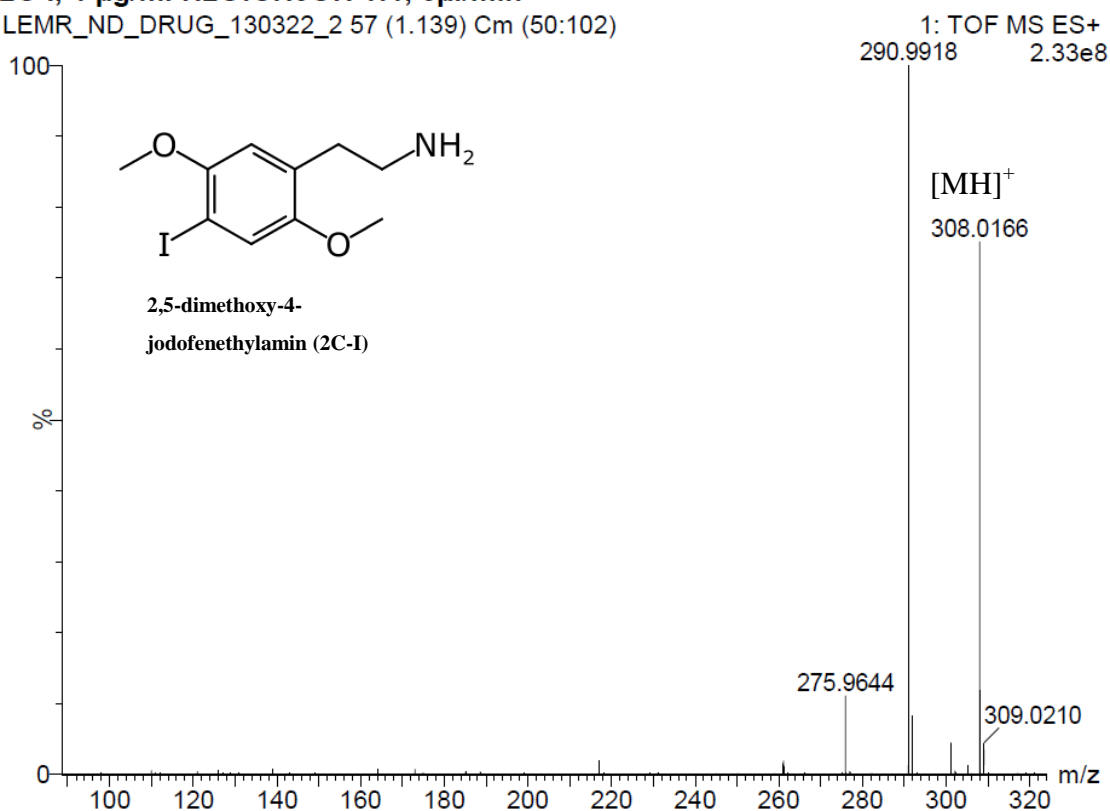
2: TOF MSMS 260.02ES+
1.37e7



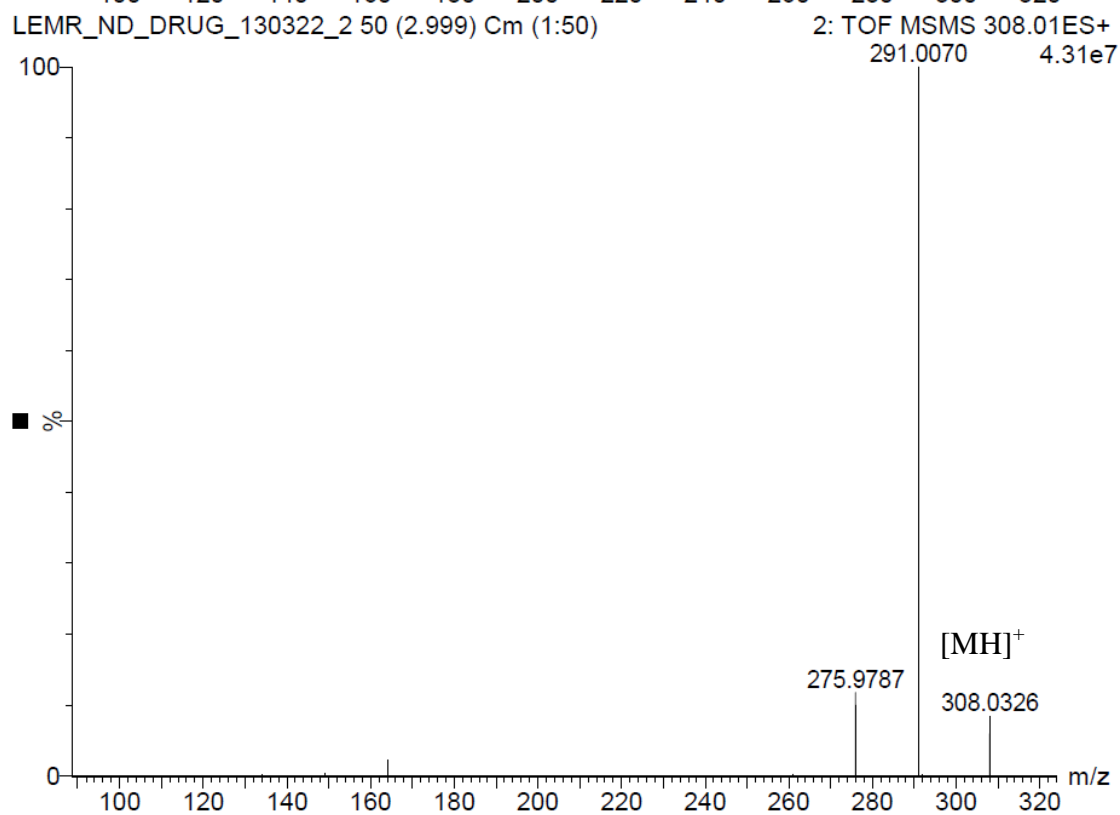
Příloha 9 – MS a MS/MS spektrum 2C-B (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

2C-I, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130322_2 57 (1.139) Cm (50:102)



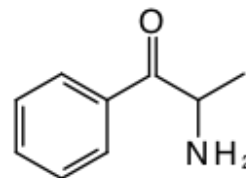
LEMUR_ND_DRUG_130322_2 50 (2.999) Cm (1:50)



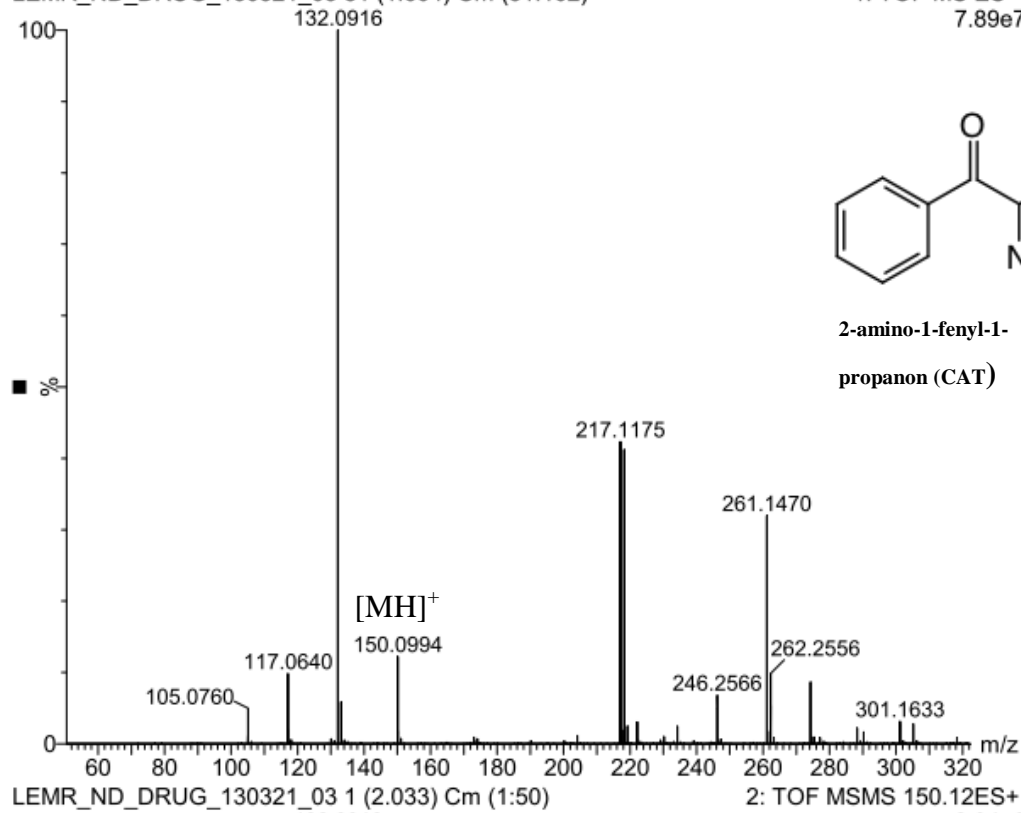
Příloha 10 – MS a MS/MS spektrum 2C-I (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

CAT, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMR_ND_DRUG_130321_03 81 (1.604) Cm (51:102)

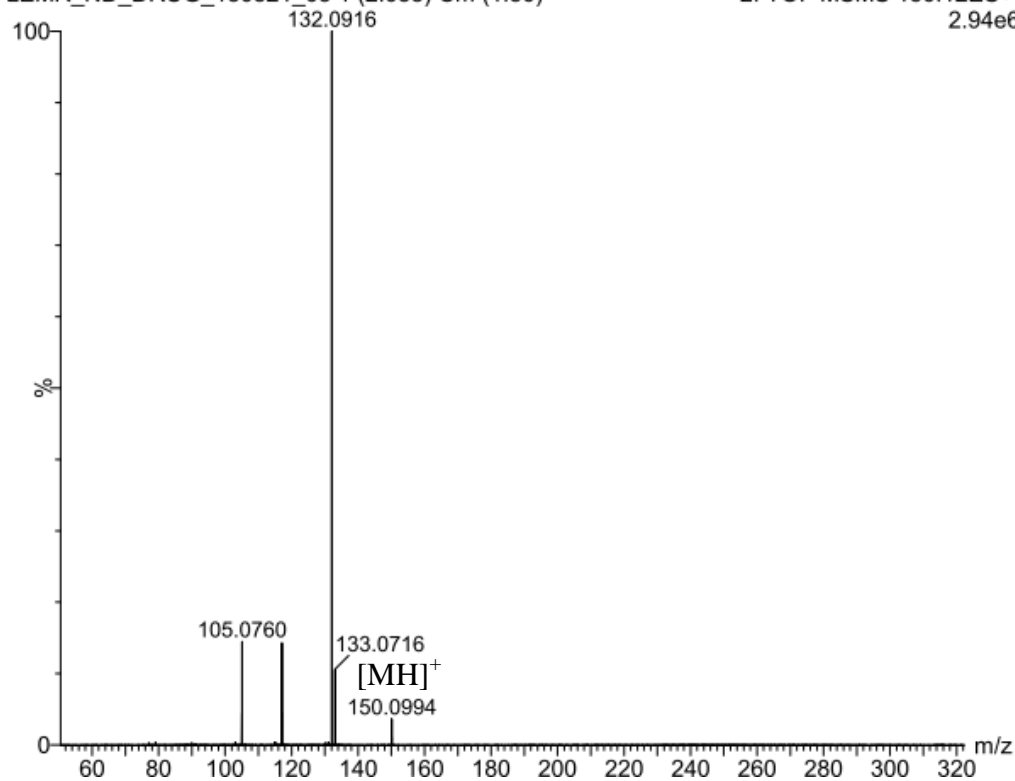
1: TOF MS ES+
7.89e7



2-amino-1-fenyl-1-propanon (CAT)



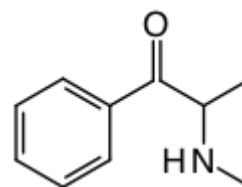
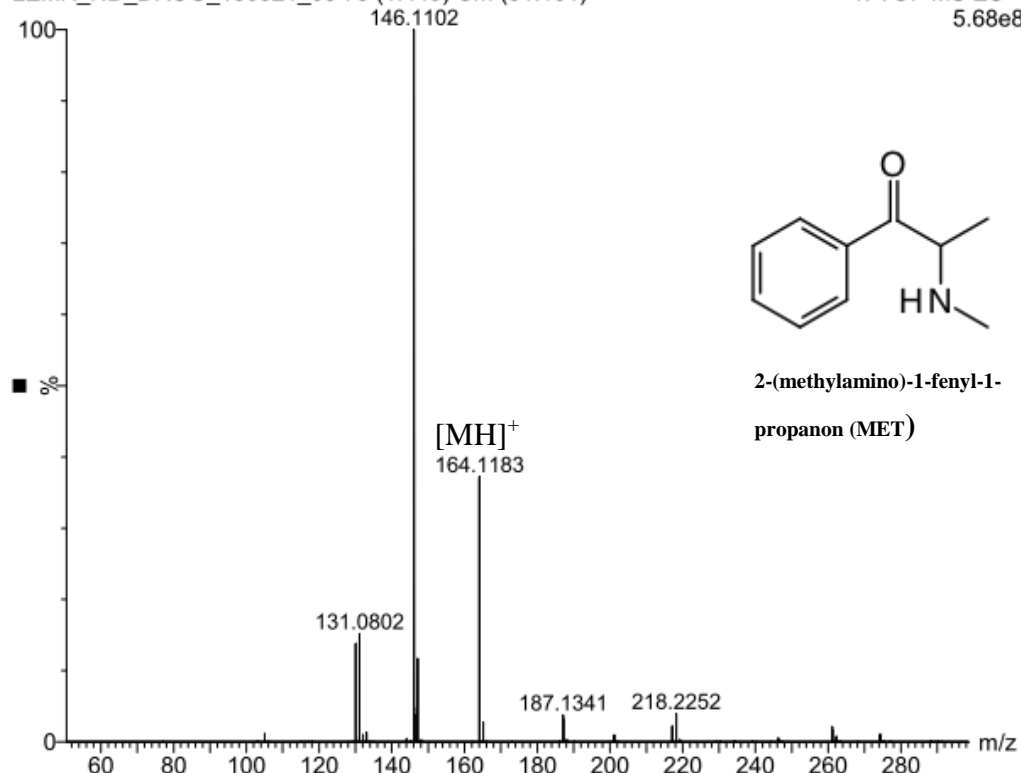
2: TOF MSMS 150.12ES+
2.94e6



Příloha 11 – MS a MS/MS spektrum CAT (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

MET, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMR_ND_DRUG_130321_05 73 (1.449) Cm (51:101)

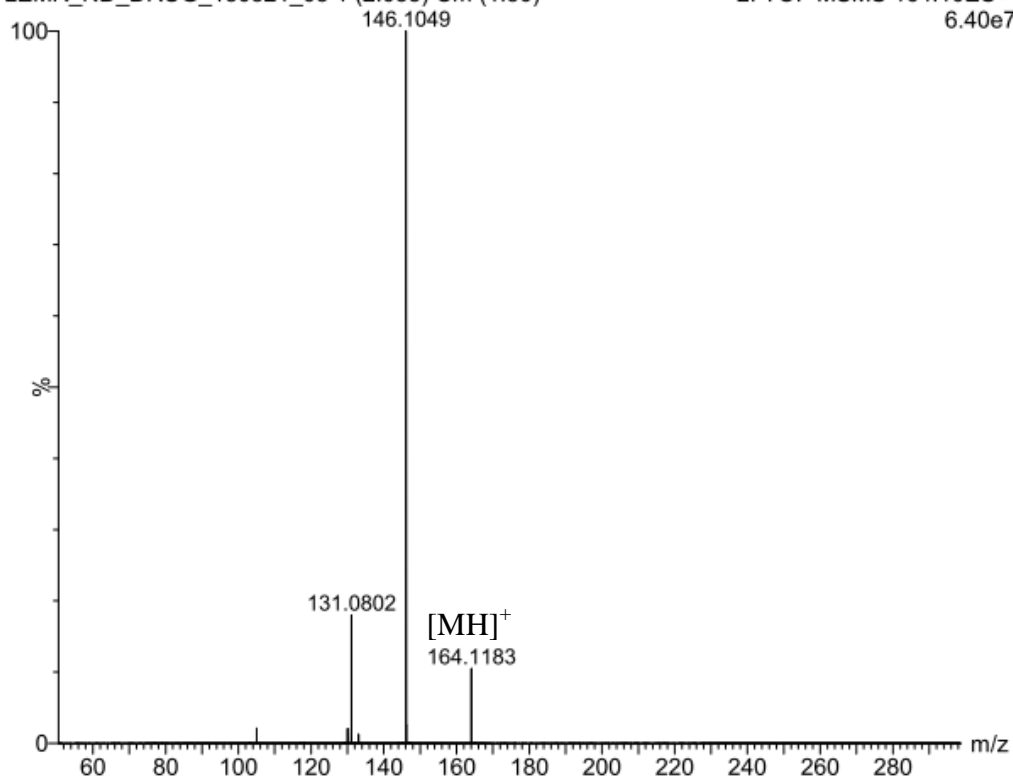
1: TOF MS ES+
5.68e8



2-(methylamino)-1-phenyl-1-propanon (MET)

LEMR_ND_DRUG_130321_05 1 (2.033) Cm (1:50)

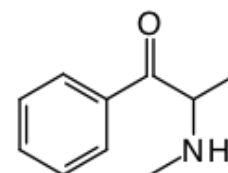
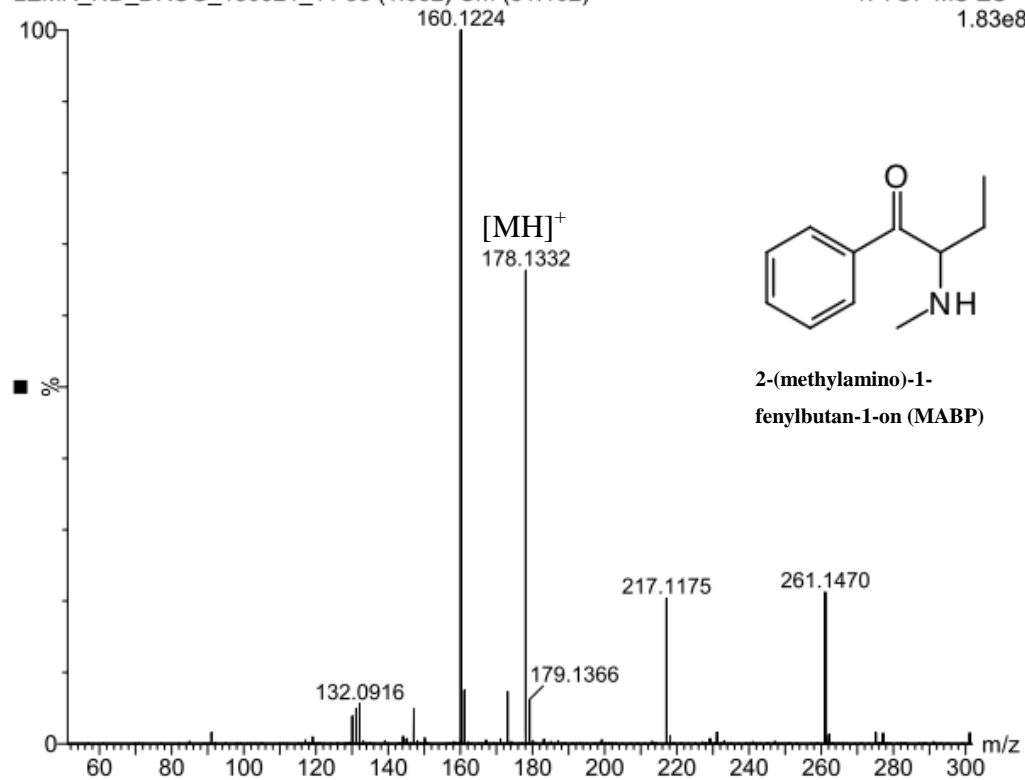
2: TOF MSMS 164.10ES+
6.40e7



Příloha 12 – MS a MS/MS spektrum MET (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

MABP, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5 µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130321_11 53 (1.052) Cm (51:102)

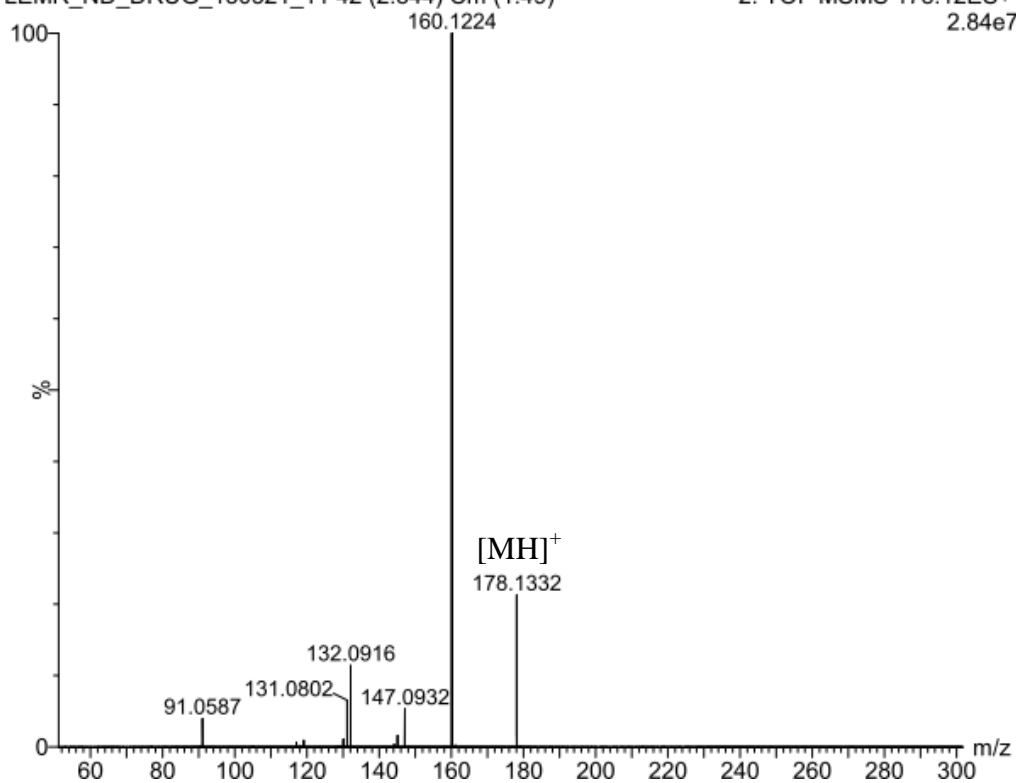
1: TOF MS ES+
1.83e8



2-(methylamino)-1-phenylbutan-1-on (MABP)

LEMUR_ND_DRUG_130321_11 42 (2.844) Cm (1:49)

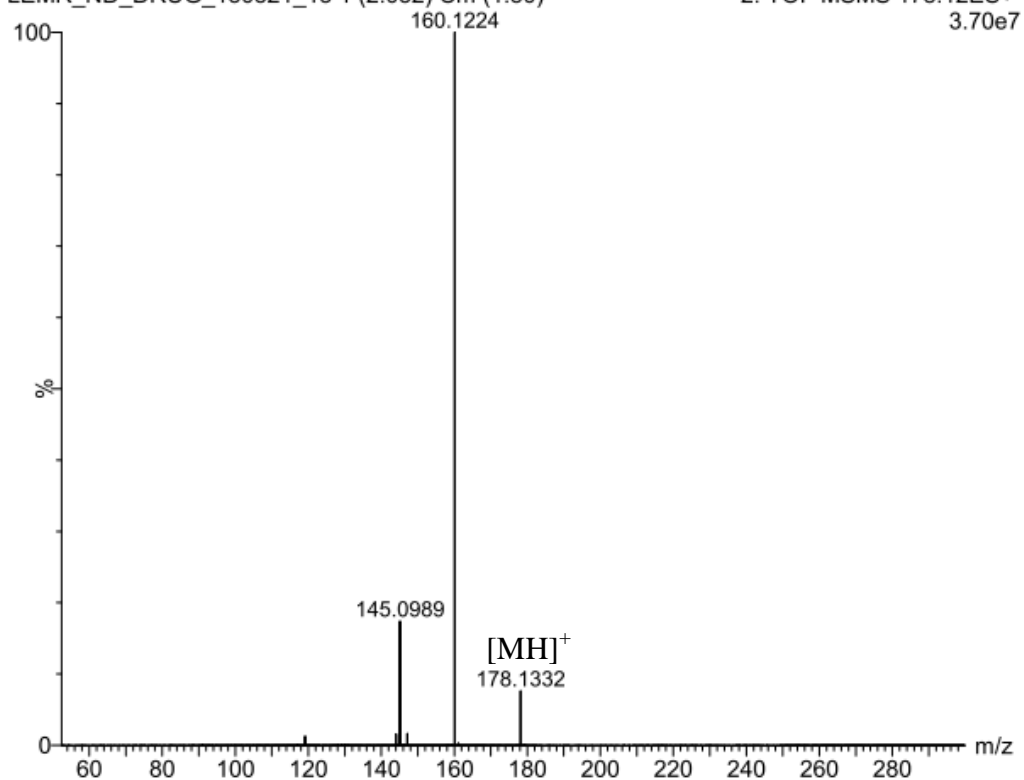
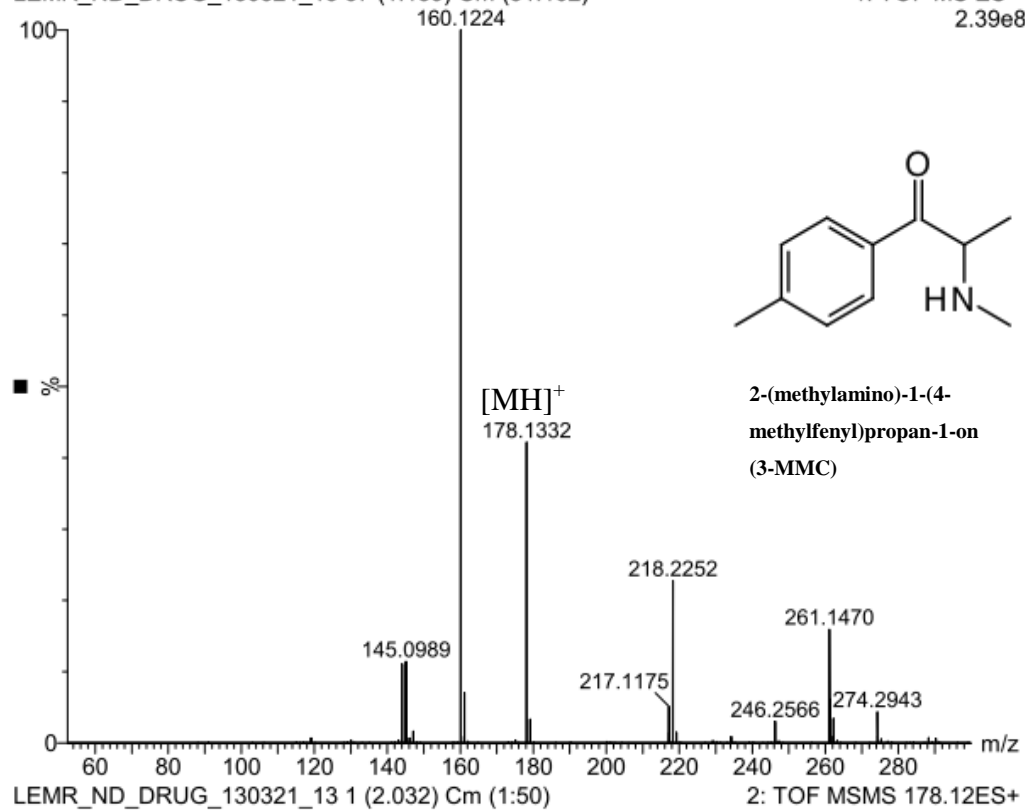
2: TOF MSMS 178.12ES+
2.84e7



Příloha 13 – MS a MS/MS spektrum MABP (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

3-MMC, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5 µl/min
LEMR_ND_DRUG_130321_13 57 (1.139) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
2.39e8

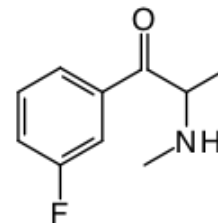
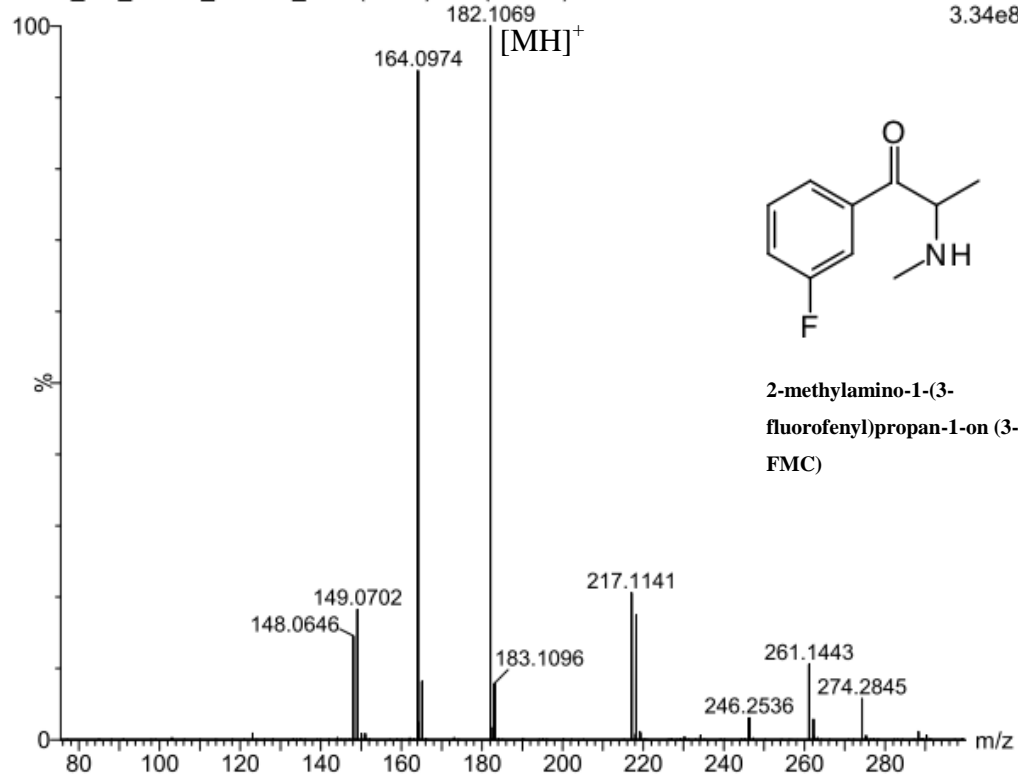


Příloha 14 – MS a MS/MS spektrum 3-MMC (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

3-FMC, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130322_1 51 (1.018) Cm (51:102)

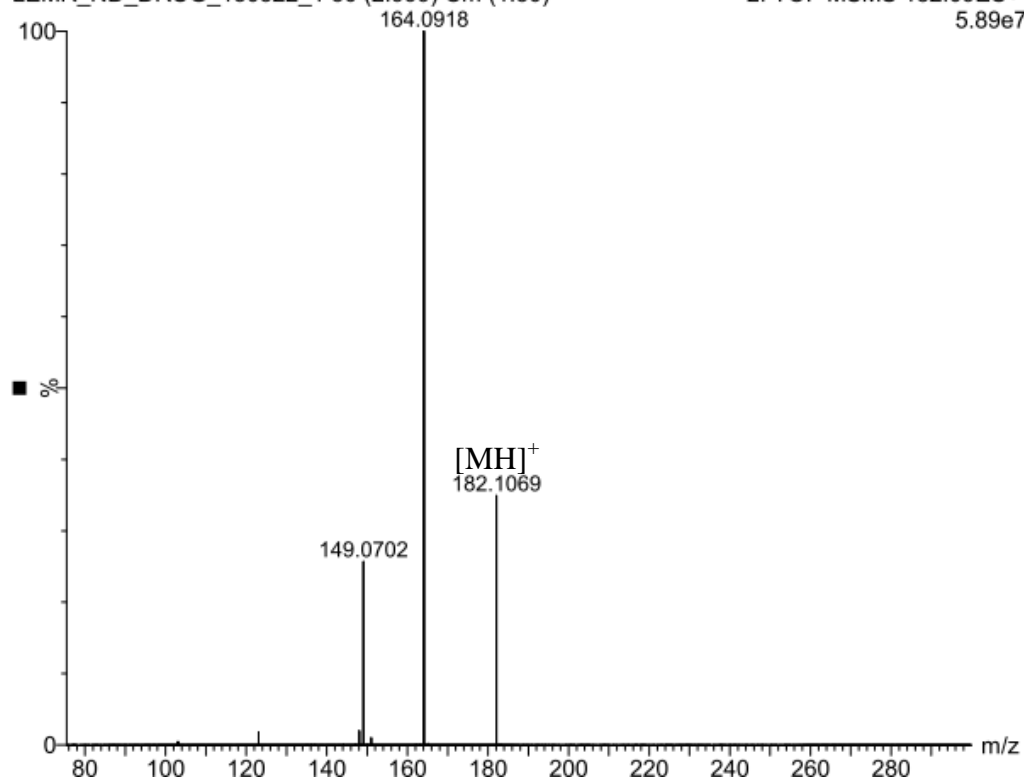
1: TOF MS ES+
3.34e8



2-methylamino-1-(3-fluorophenyl)propan-1-one (3-FMC)

LEMUR_ND_DRUG_130322_1 50 (2.999) Cm (1:50)

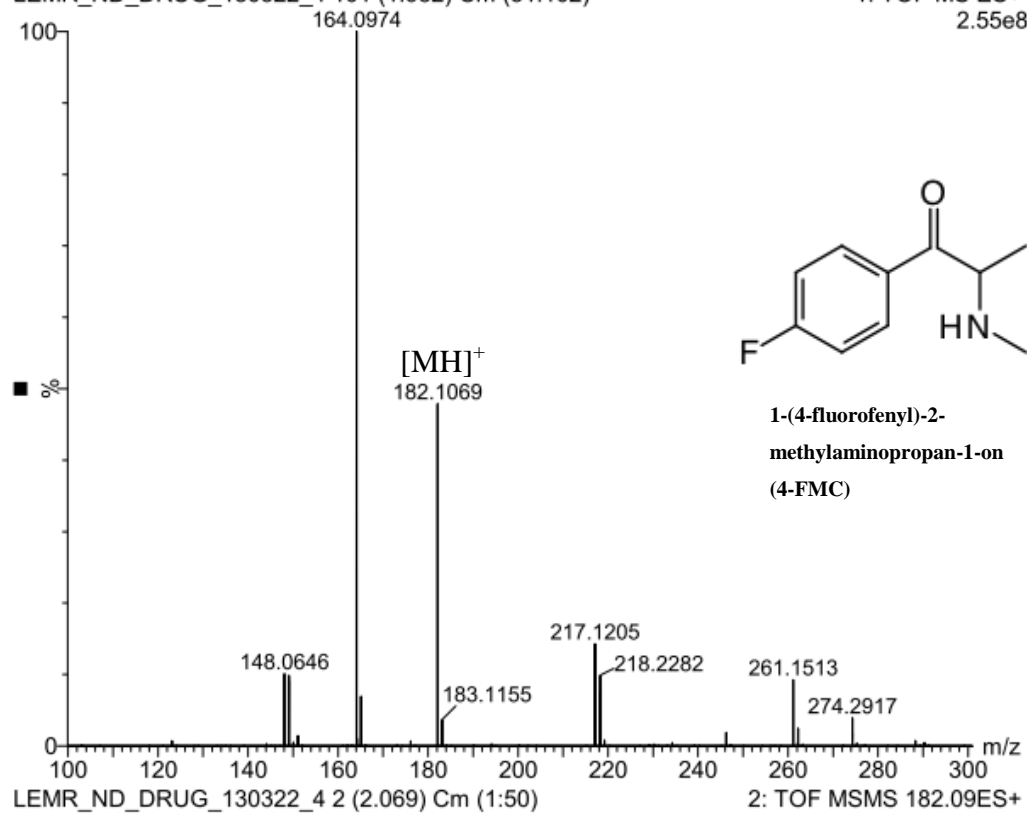
2: TOF MSMS 182.09ES+
5.89e7



Příloha 15 – MS a MS/MS spektrum 3-FMC (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

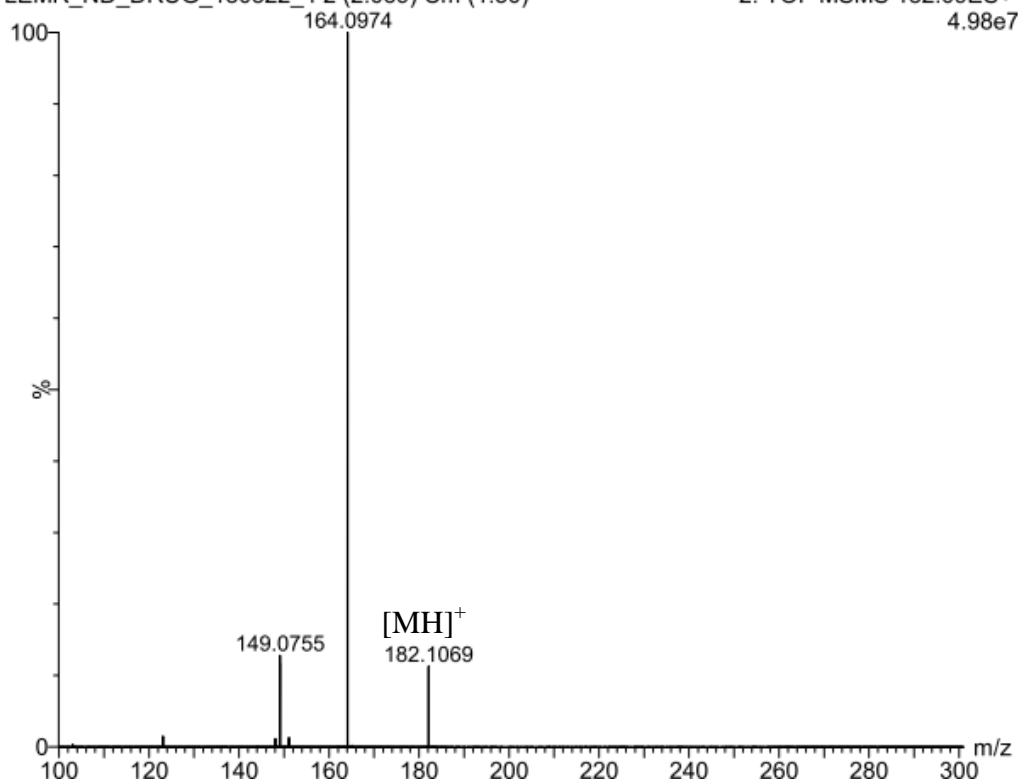
4-FMC, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5 µl/min
LEMR_ND_DRUG_130322_4 101 (1.982) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
2.55e8



LEMR_ND_DRUG_130322_4 2 (2.069) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 182.09ES+
4.98e7

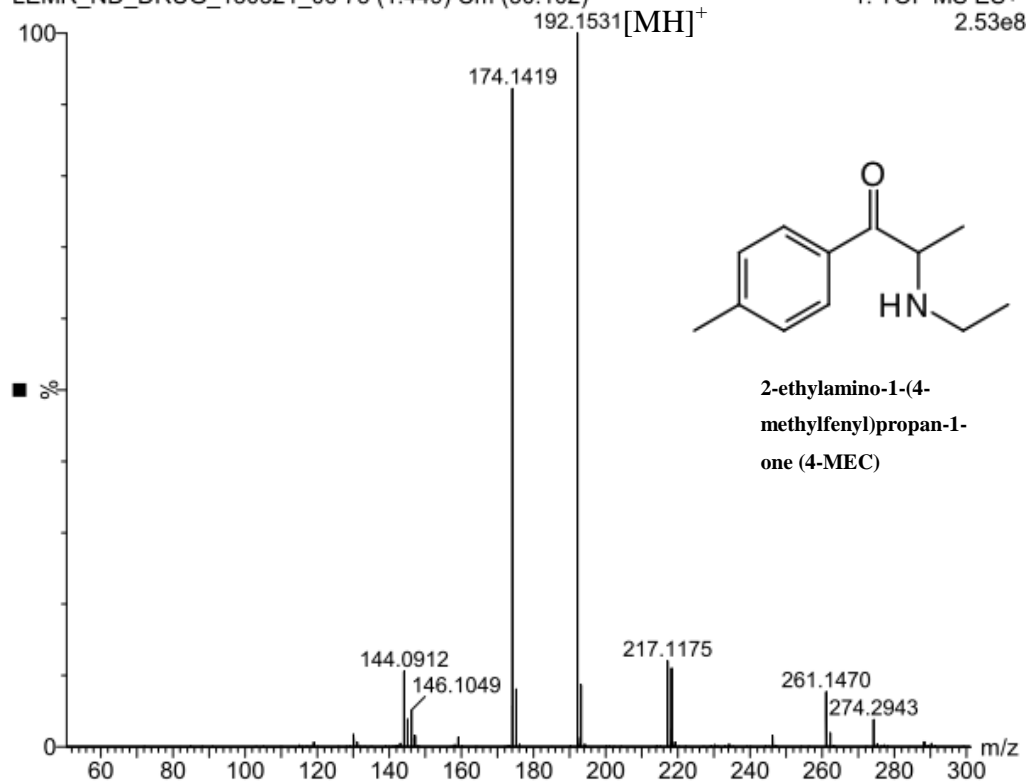


Příloha 16 – MS a MS/MS spektrum 3-FMC (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

4-MEC, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5 µl/min

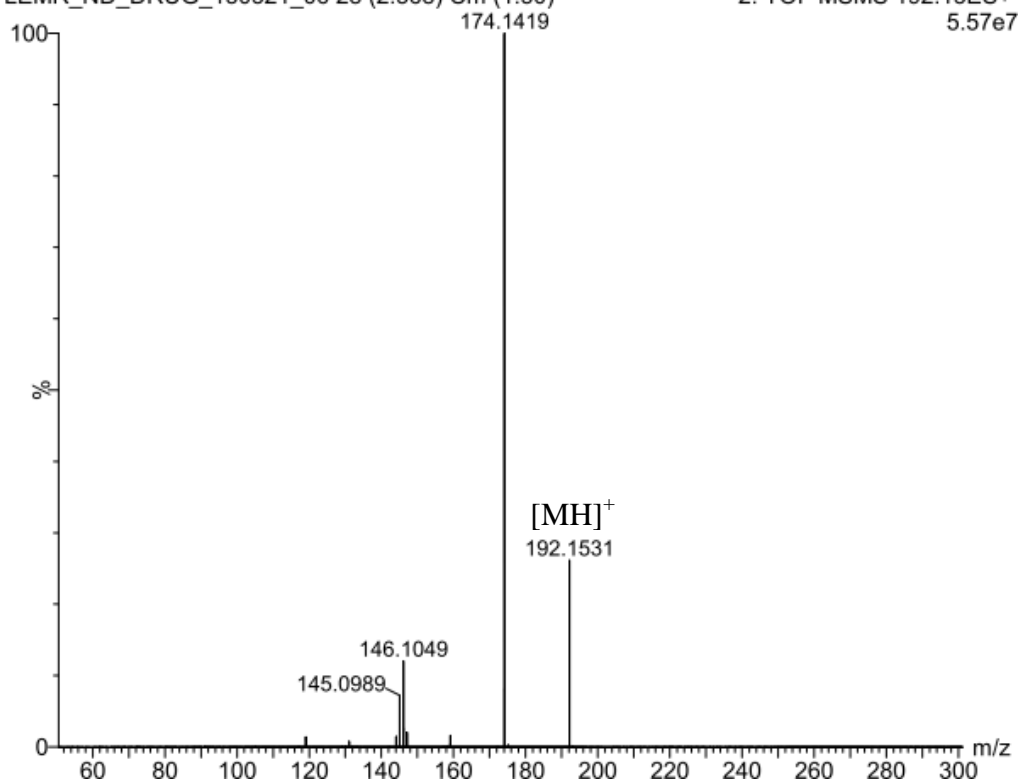
LEMUR_ND_DRUG_130321_06 73 (1.449) Cm (50:102)

1: TOF MS ES+
2.53e8



LEMUR_ND_DRUG_130321_06 28 (2.568) Cm (1:50)

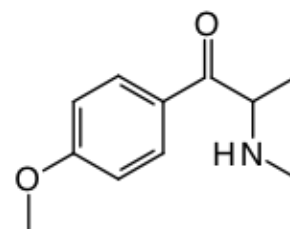
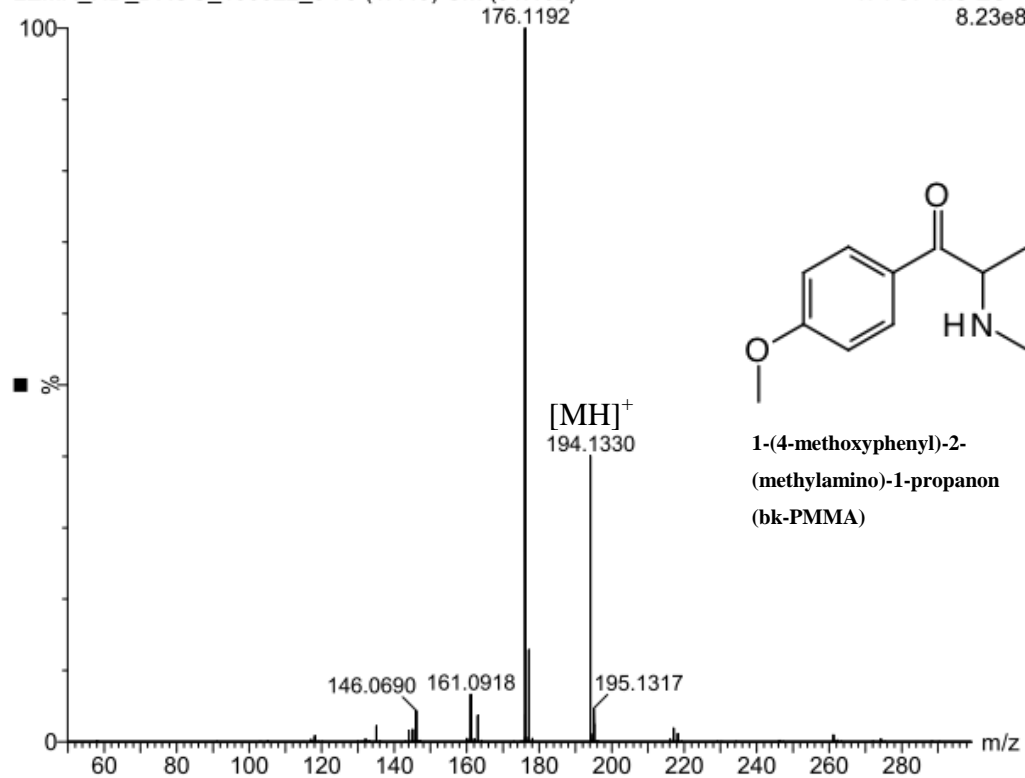
2: TOF MSMS 192.13ES+
5.57e7



Příloha 17 – MS a MS/MS spektrum 4-MEC (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

bk-PMMA, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130322_3 73 (1.449) Cm (51:102)

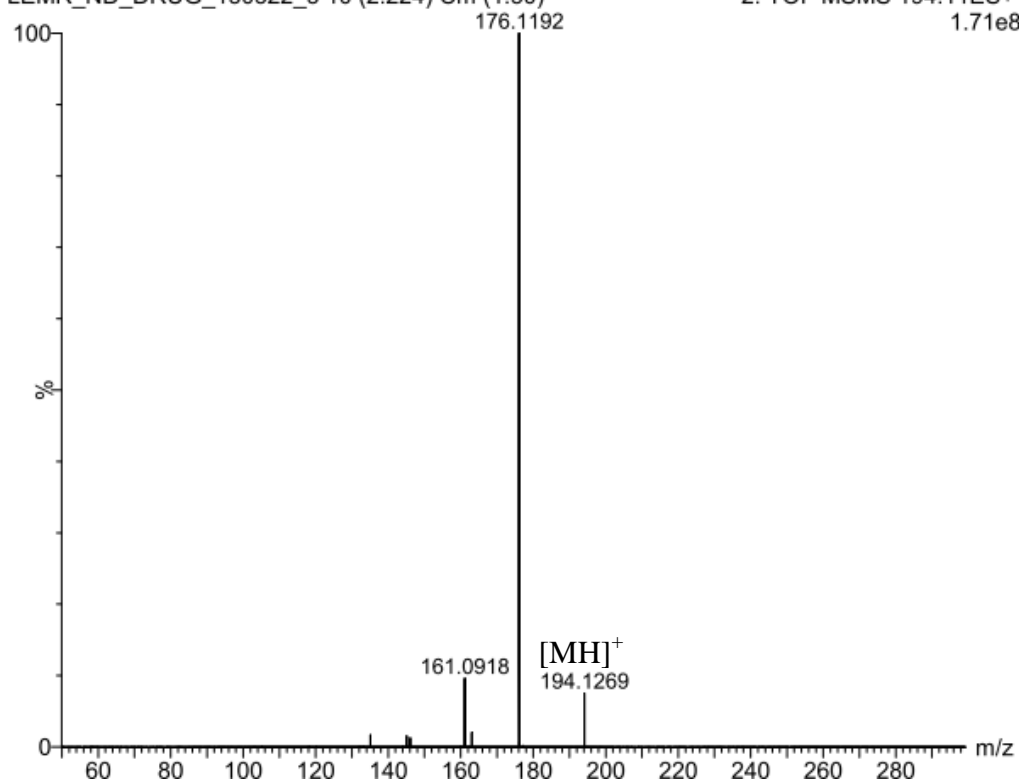
1: TOF MS ES+
8.23e8



1-(4-methoxyphenyl)-2-(methylamino)-1-propanon
(bk-PMMA)

LEMUR_ND_DRUG_130322_3 10 (2.224) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 194.11ES+
1.71e8

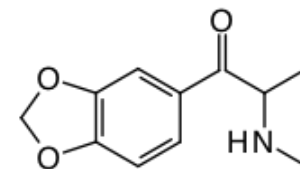
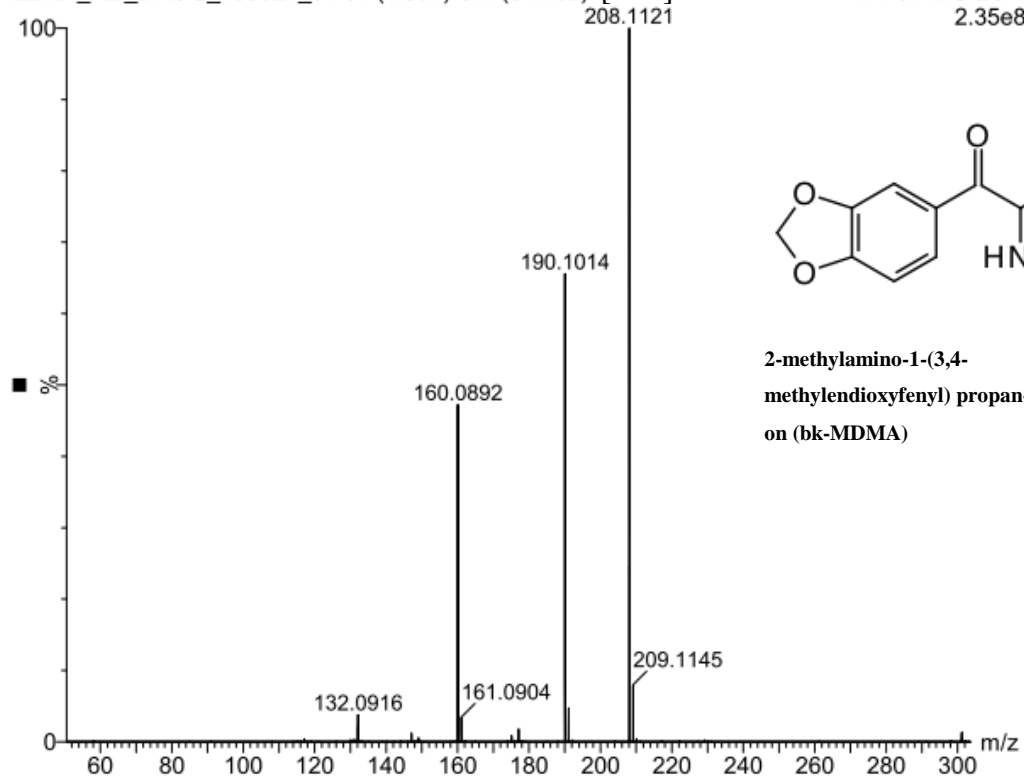


Příloha 18 – MS a MS/MS spektrum bk-PMMA (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

bk-MDMA, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130321_04 81 (1.604) Cm (51:102) [MH]⁺

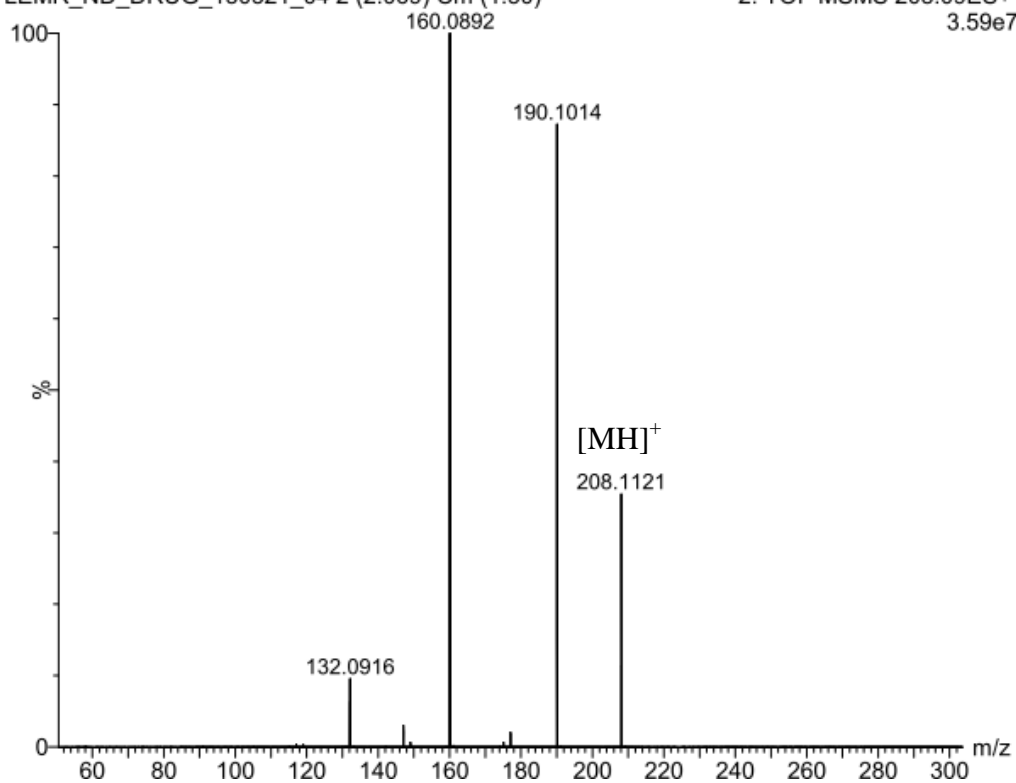
1: TOF MS ES+
2.35e8



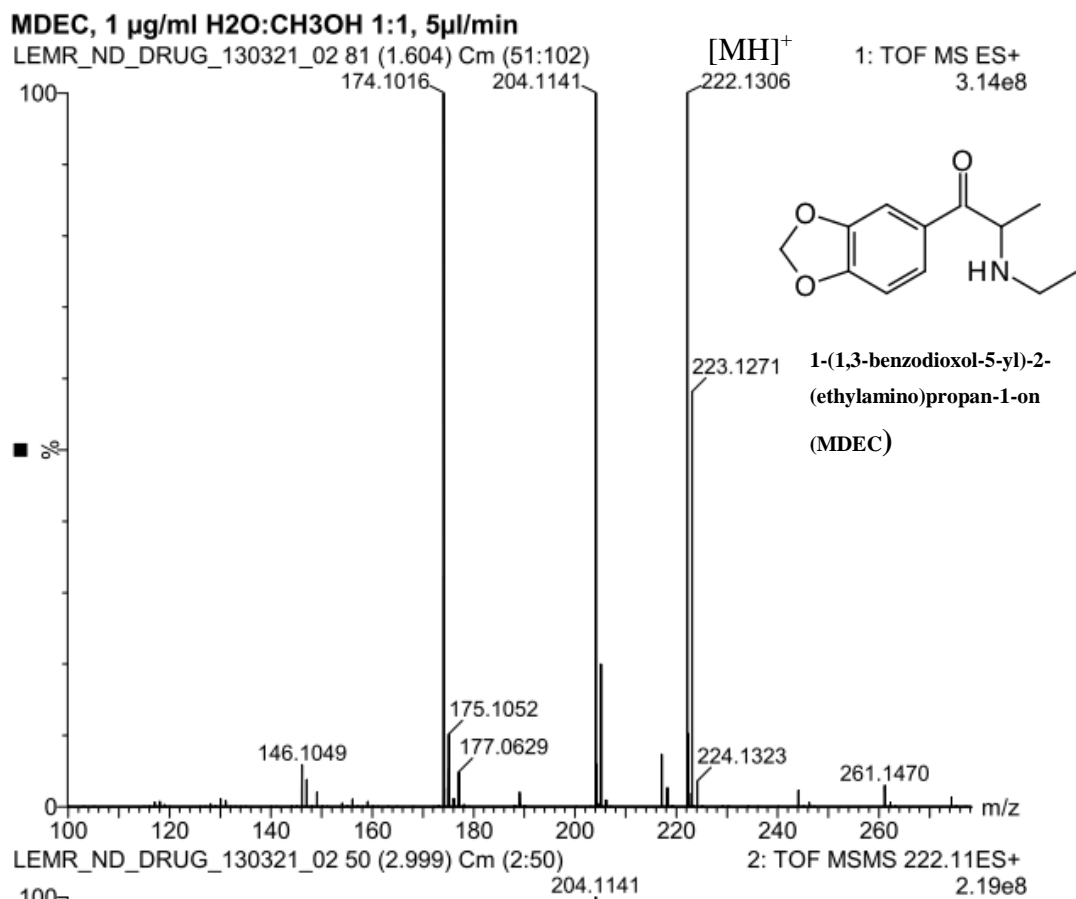
2-methylamino-1-(3,4-methylenedioxyphenyl) propan-1-on (bk-MDMA)

LEMUR_ND_DRUG_130321_04 2 (2.069) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 208.09ES+
3.59e7



Příloha 19 – MS a MS/MS spektrum bk-MDMA (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

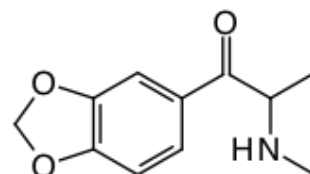
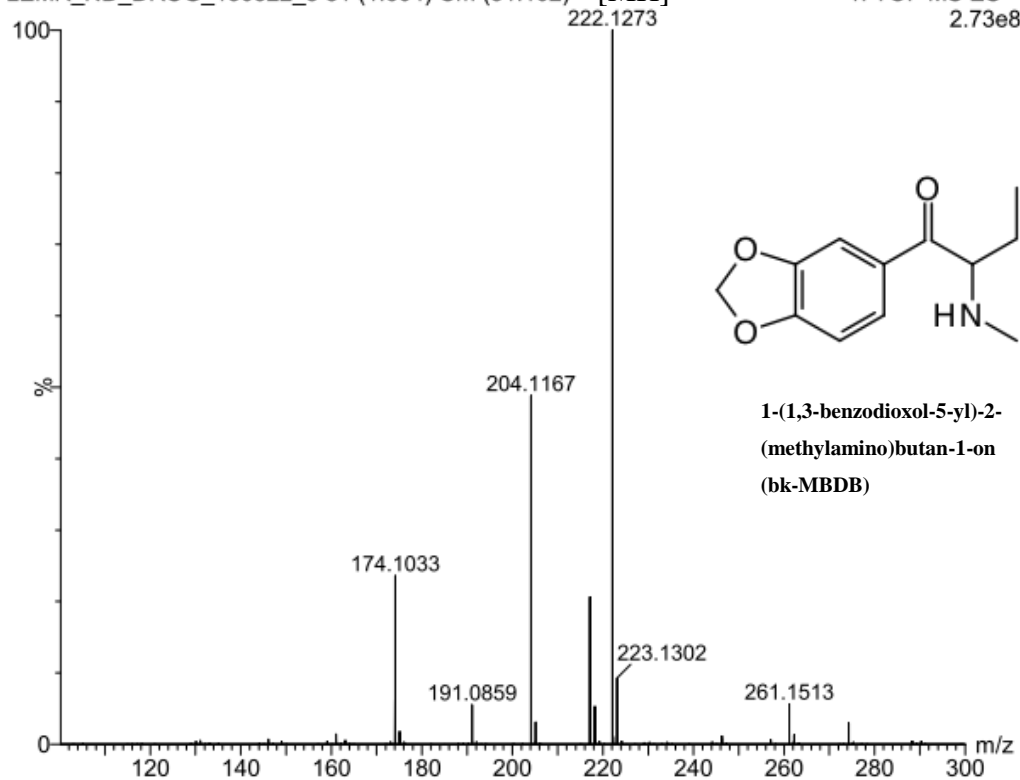


Příloha 20 – MS a MS/MS spektrum MDEC (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

bk-MBDB, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

LEMUR_ND_DRUG_130322_5 81 (1.604) Cm (51:102) [MH]⁺

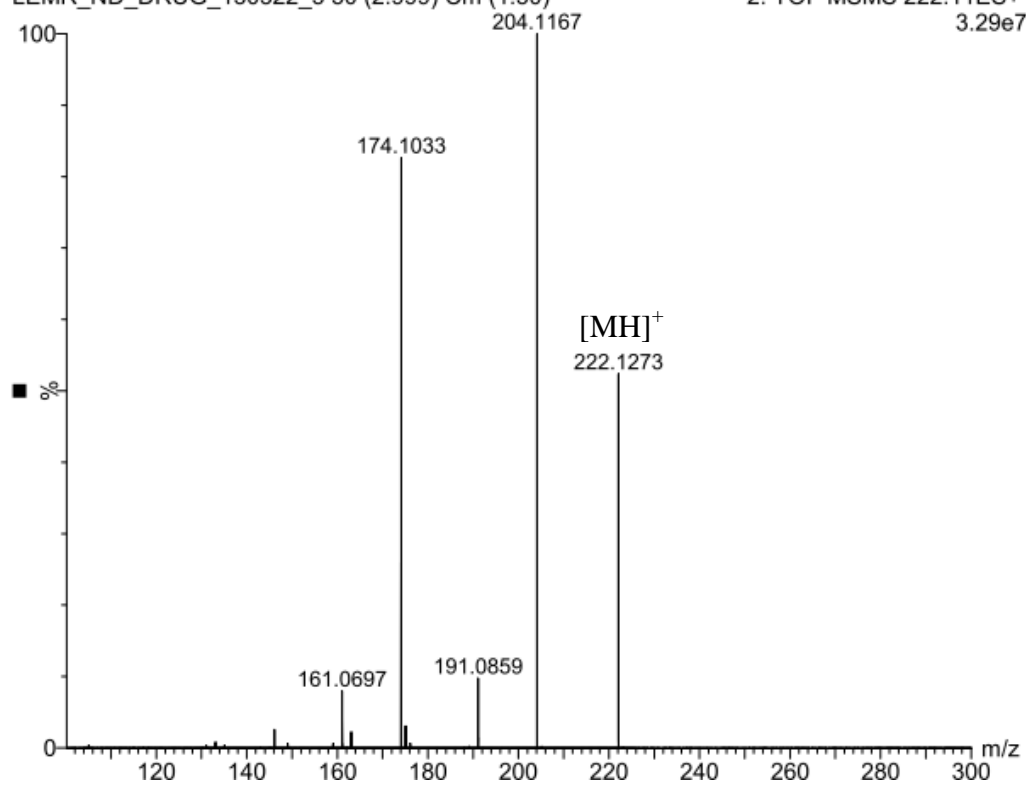
1: TOF MS ES+
2.73e8



1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(methylamino)butan-1-on
(bk-MBDB)

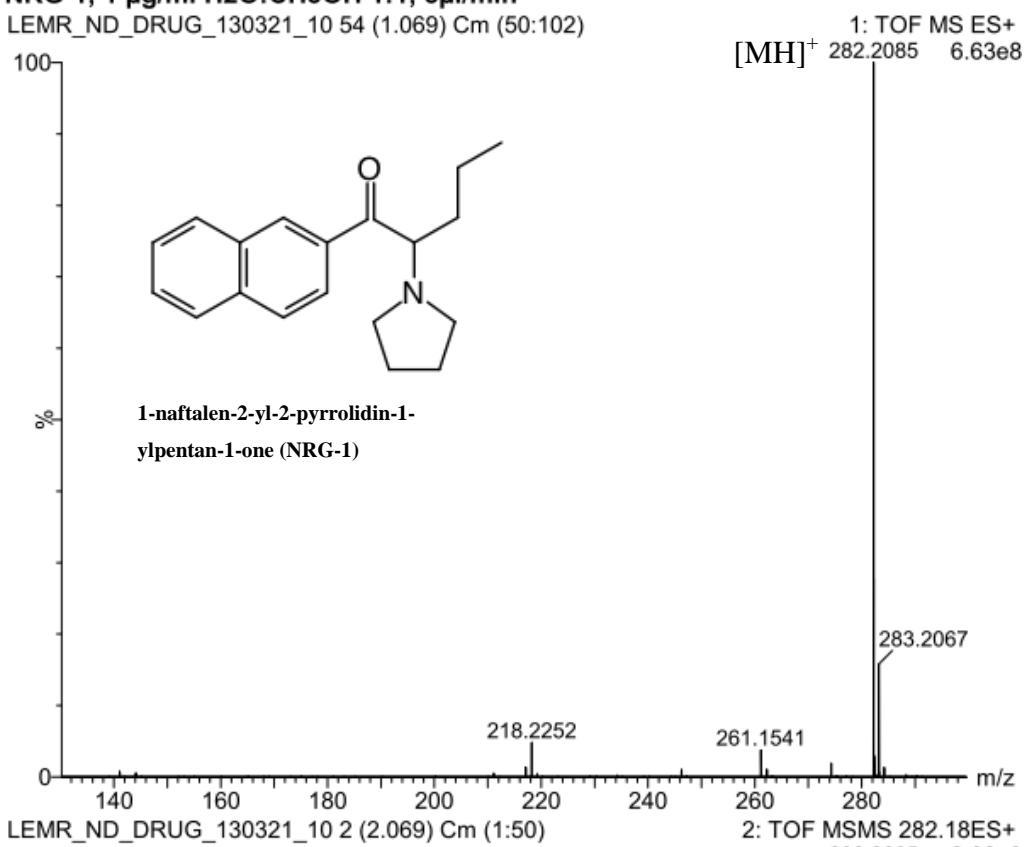
LEMUR_ND_DRUG_130322_5 50 (2.999) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 222.11ES+
3.29e7



Příloha 21 – MS a MS/MS spektrum bk-MBDB (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

NRG-1, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5 µl/min
LEMUR_ND_DRUG_130321_10 54 (1.069) Cm (50:102)

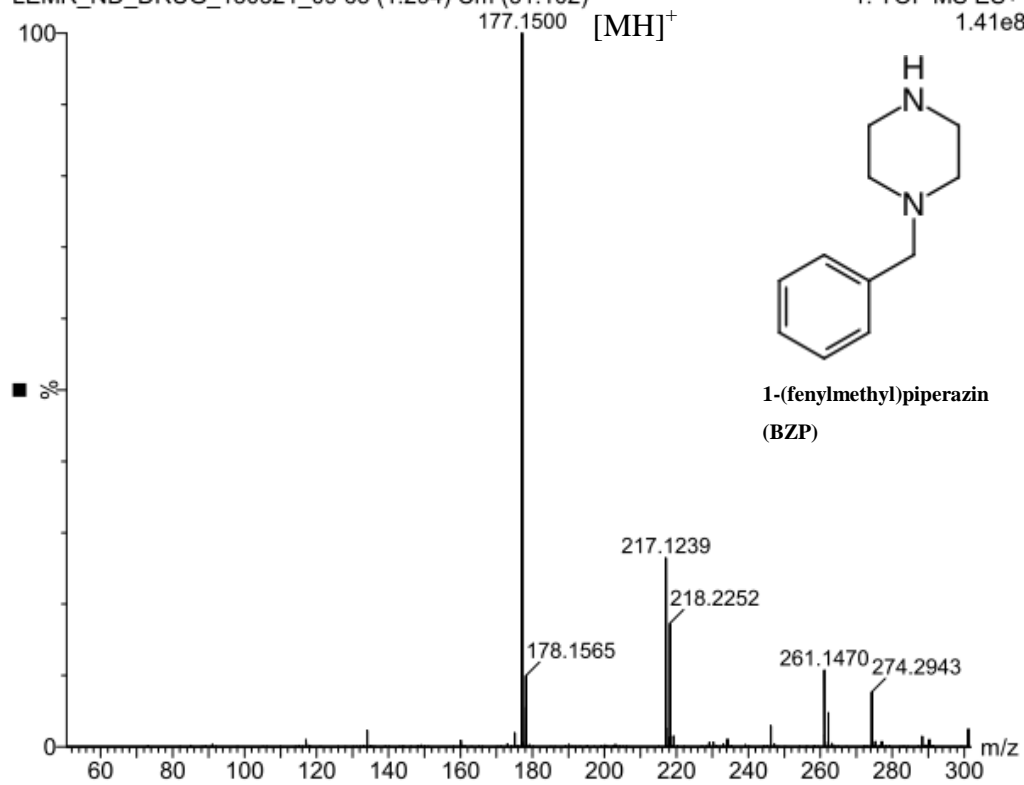


Příloha 22 – MS a MS/MS spektrum NRG-1 (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

BZP, 1 µg/ml H₂O:CH₃OH 1:1, 5µl/min

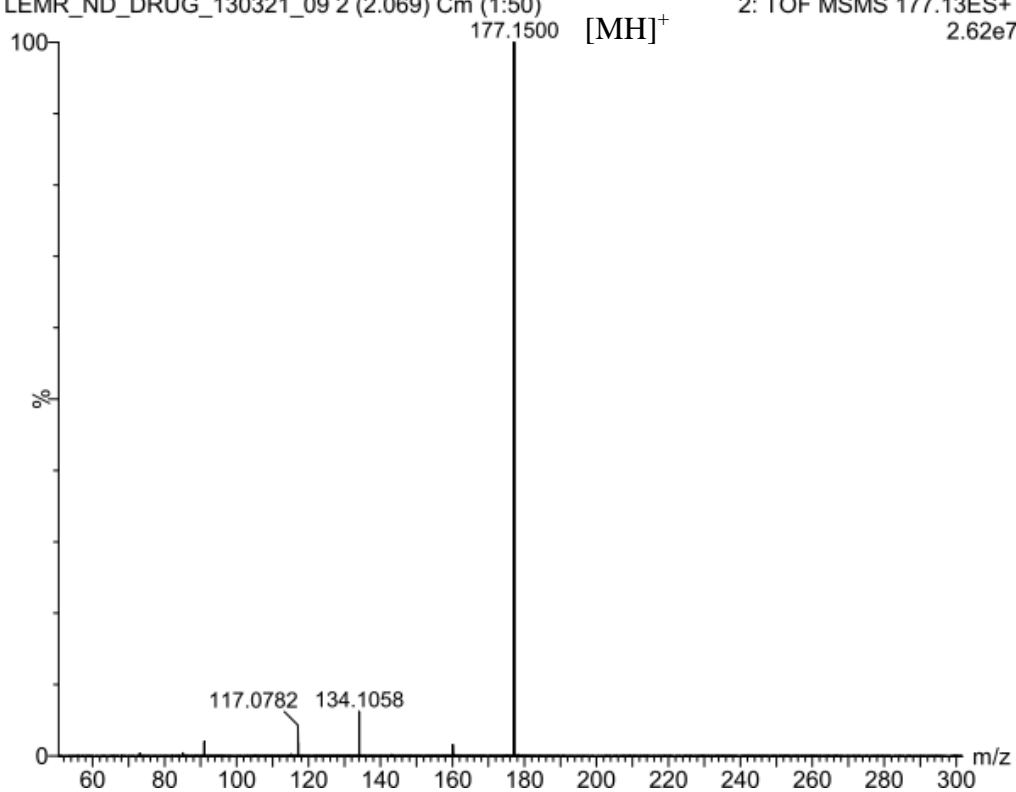
LEMUR_ND_DRUG_130321_09 65 (1.294) Cm (51:102)

1: TOF MS ES+
1.41e8



LEMUR_ND_DRUG_130321_09 2 (2.069) Cm (1:50)

2: TOF MSMS 177.13ES+
2.62e7



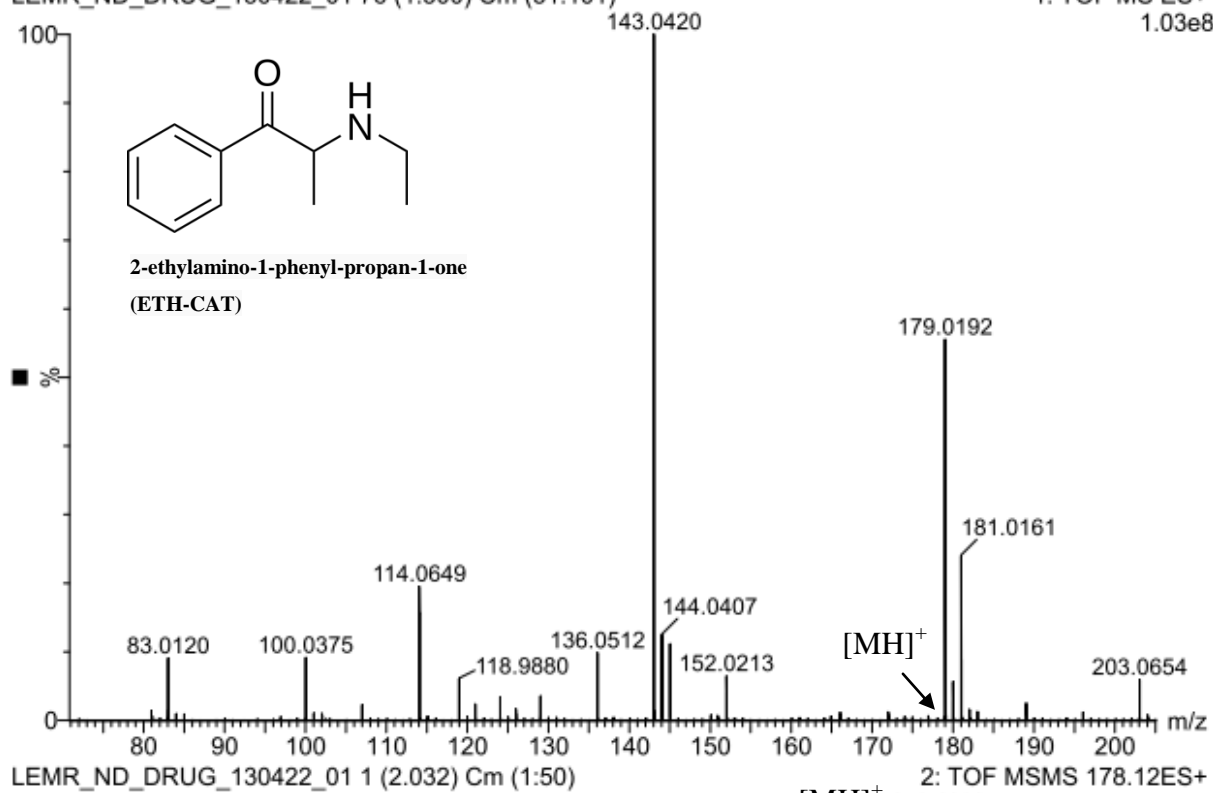
Příloha 23 – MS a MS/MS spektrum BZP (1 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

ETH-CAT, 0.05 µg/ml H₂O:ACN 1:1, 5µl/min
LEMR_ND_DRUG_130422_01 76 (1.500) Cm (51:101)

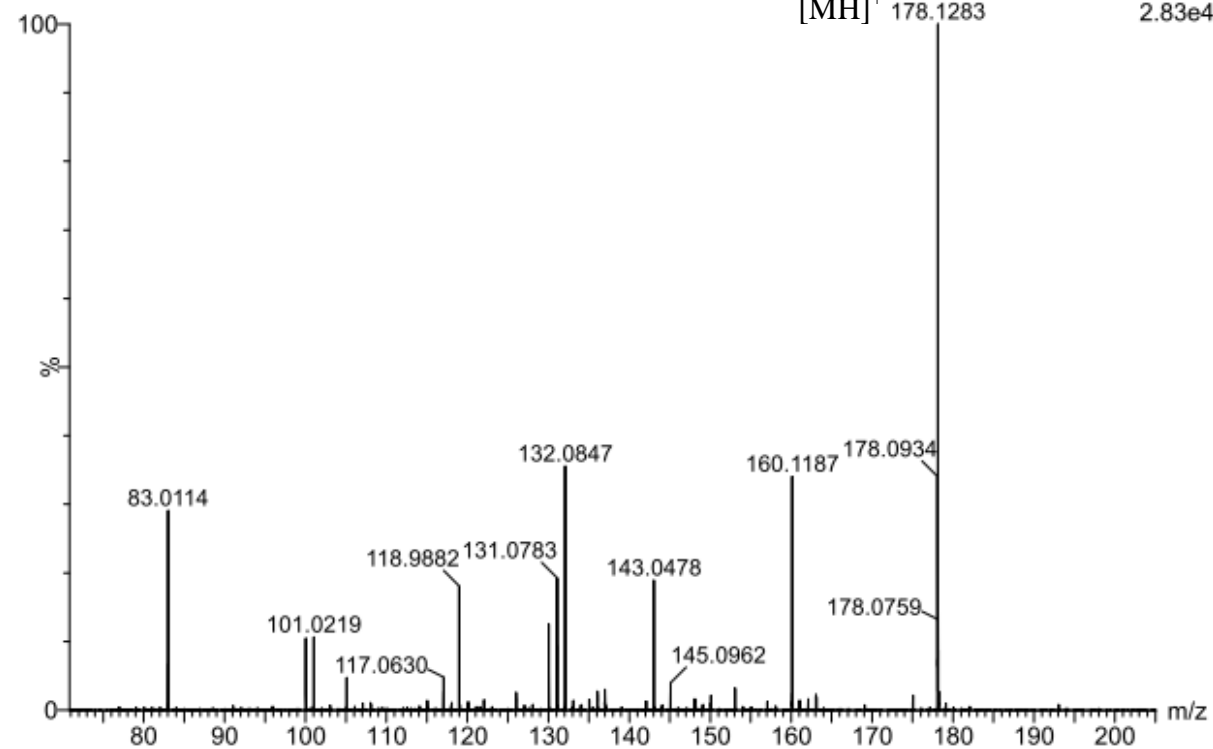
22-Apr-2013 17:36:32

1: TOF MS ES+

1.03e8



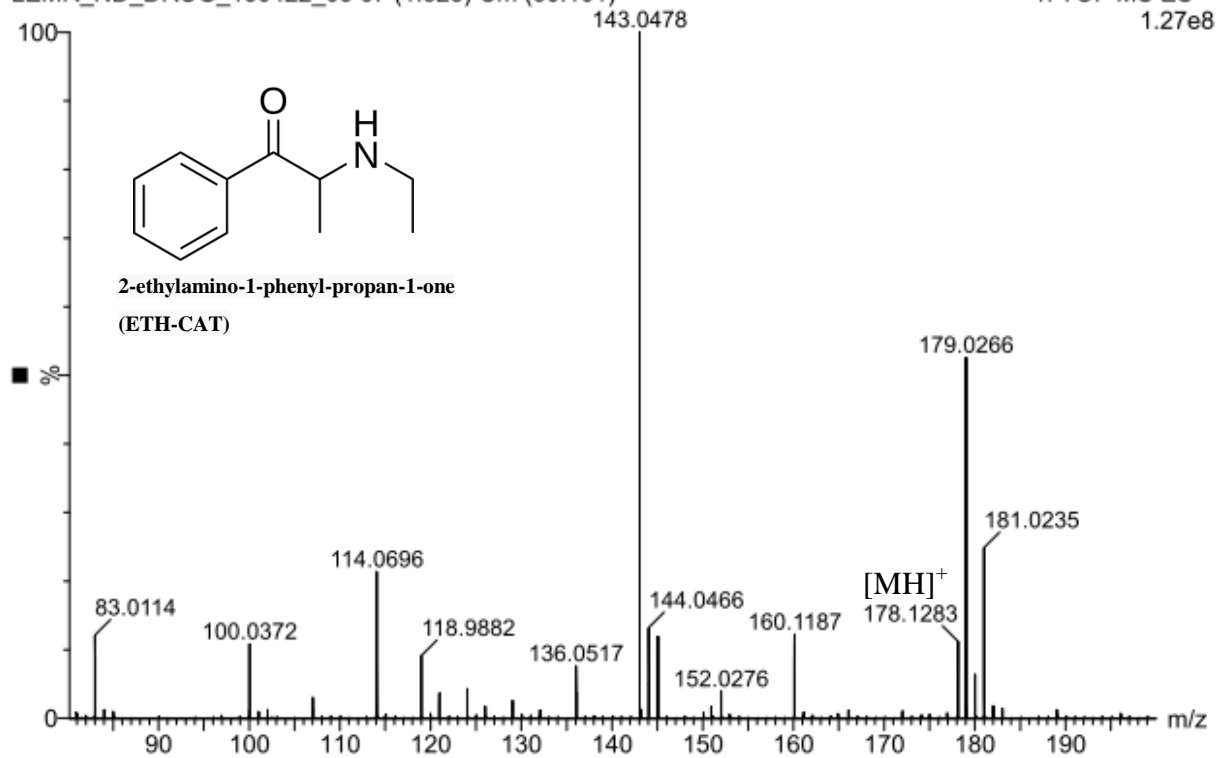
2: TOF MSMS 178.12ES+
[MH]⁺ 178.1283 2.83e4



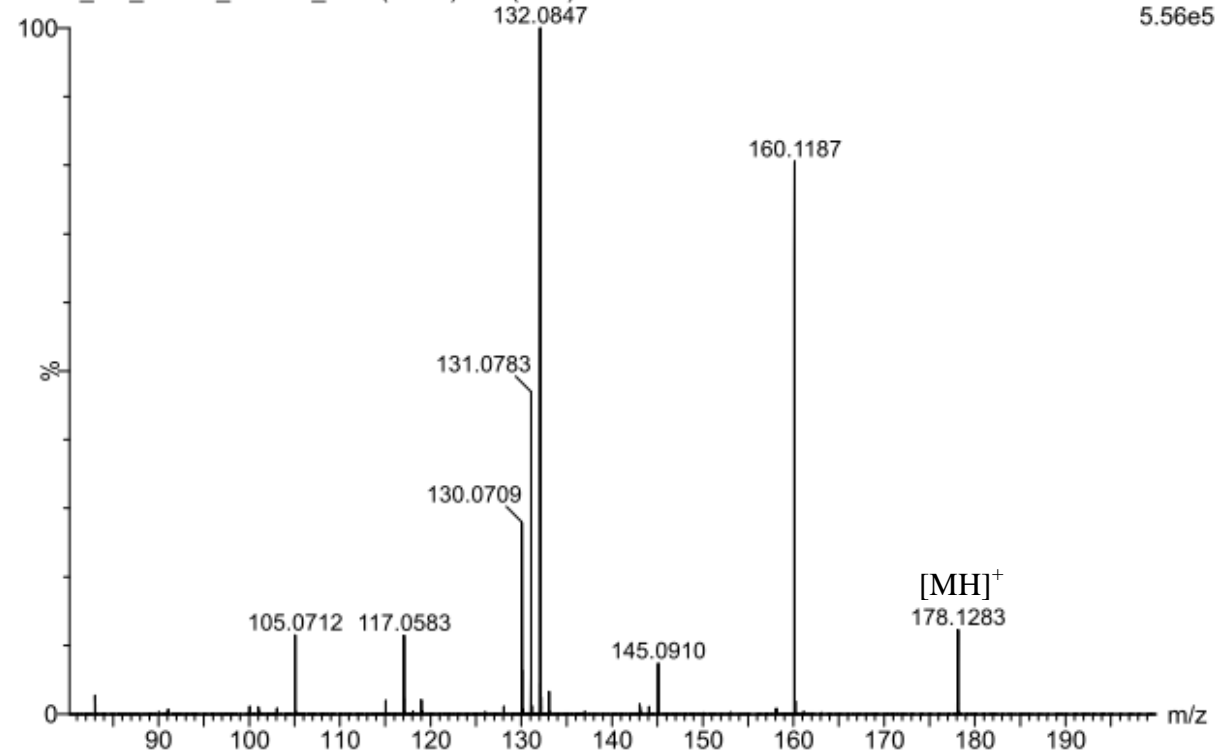
Příloha 24 – MS a MS/MS spektrum ETH-CAT po extrakci z moči (0,05 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

ETH-CAT, 5 µg/ml H2O:ACN 1:1, 5µl/min UEB143
LEMR_ND_DRUG_130422_03 67 (1.328) Cm (50:101)

22-Apr-2013 18:22:51
1: TOF MS ES+
1.27e8



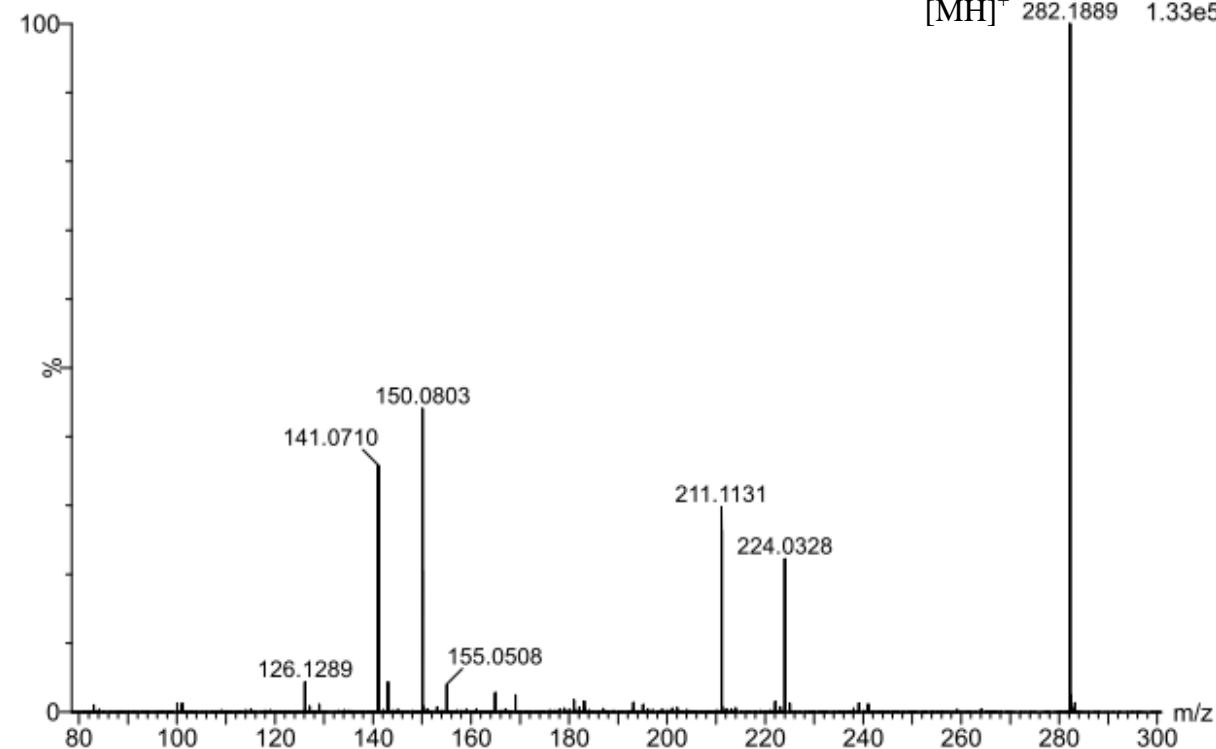
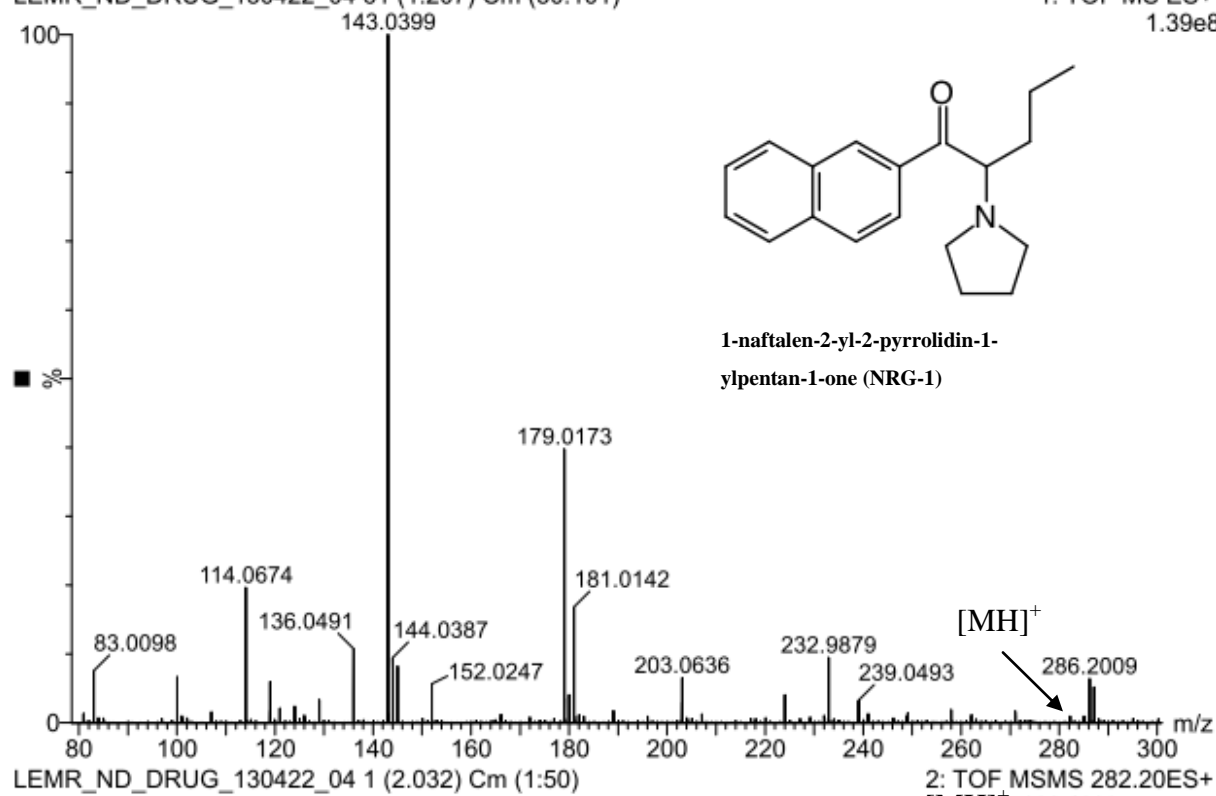
LEMR_ND_DRUG_130422_03 1 (2.032) Cm (1:50) 2: TOF MSMS 178.12ES+
5.56e5



Příloha 25 – MS a MS/MS spektrum ETH-CAT po extrakci z moči (5 µg/ml, H2O:CH3OH 1:1 (v/v))

NRG-1, 0.05 µg/ml H₂O:ACN 1:1, 5µl/min UEB143
LEMR_ND_DRUG_130422_04 61 (1.207) Cm (50:101)

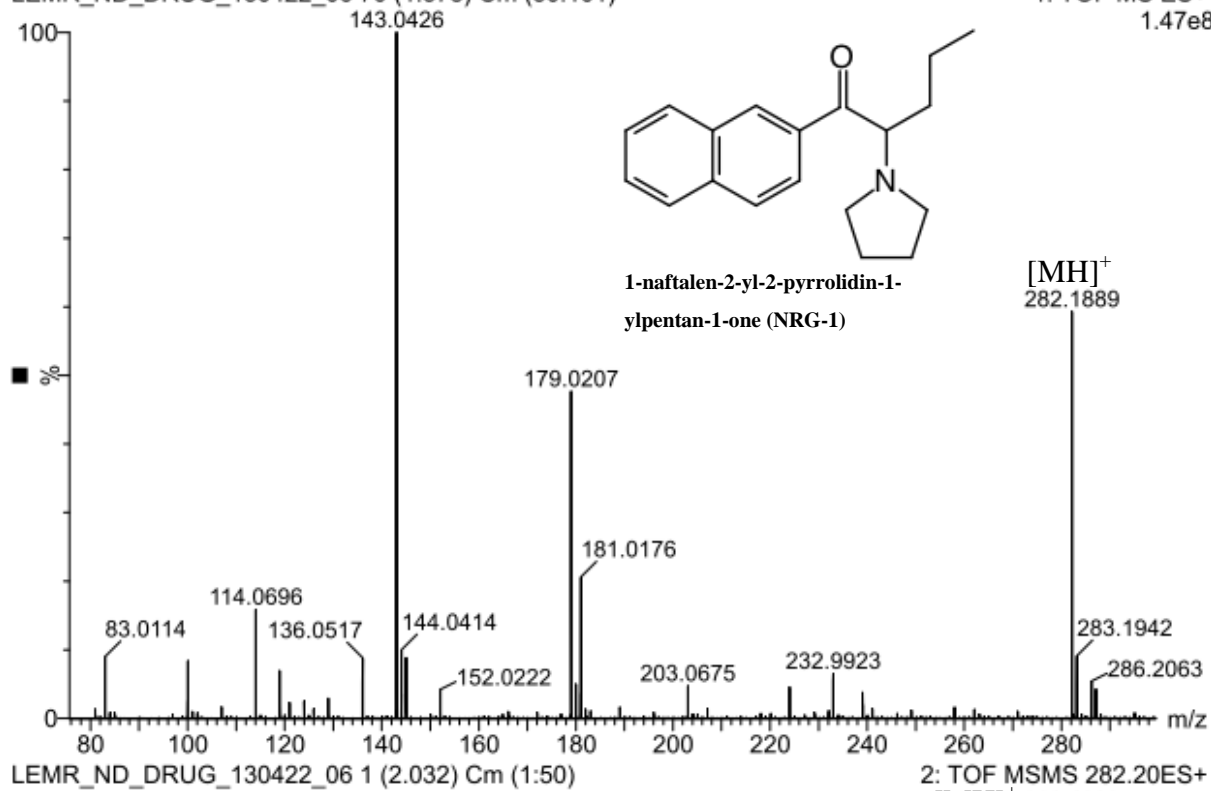
22-Apr-2013 18:48:30
1: TOF MS ES+
1.39e8



Příloha 26 – MS a MS/MS spektrum NRG-1 po extrakci z moči (0,05 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))

NRG-1, 5 µg/ml H₂O:ACN 1:1, 5µl/min UEB143
LEMUR_ND_DRUG_130422_06 70 (1.378) Cm (50:101)

22-Apr-2013 19:20:14
1: TOF MS ES+
1.47e8



Příloha 27 – MS a MS/MS spektrum NRG-1 po extrakci z moči (5 µg/ml, H₂O:CH₃OH 1:1 (v/v))