

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, Ústav chemie přírodních látek

Ústav analytické chemie

a

Národní ústav duševního zdraví

**Stanovení majoritních složek ve vzorcích drog s obsahem syntetických katinonů pomocí
NMR spektroskopie**

Certifikovaná metodika

Barbora Mužíková, Karolína Kubičková, Bohumil Dolenský, Martin Kuchař

Praha, 2020

OBSAH

1	CÍL METODIKY	4
2	VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
2.1	Teoretický úvod	5
2.2	Popis metodiky	6
2.2.1	Princip metody ^1H qNMR pro stanovení kationů ve směsích	6
2.2.2	Přístroje a laboratorní pomůcky	6
2.2.3	Chemikálie a spotřební materiál	6
2.2.4	Příprava a skladování standardů	7
2.2.5	Příprava kalibračních a validačních vzorků	7
2.2.6	Charakteristiky měření, úprava spekter	7
	Parametry ^1H qNMR spektra pro automatizovanou analýzu vzorků	8
2.2.7	Úprava spektra	8
2.2.8	Identifikace a kvantifikace kationu ve vzorku	8
2.3	Pracovní charakteristiky metody	10
2.3.1	Mez stanovitelnosti	10
2.3.2	Přesnost a správnost stanovených hodnot	10
3	NOVOST METODIKY	11
4	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	11
5	SEZNAM LITERATURY	12
6	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	12
7	ODKAZ NA PŘÍSLUŠNÝ PROJEKT VÝZKUMU A VÝVOJE	13
	PŘÍLOHY	14

1 CÍL METODIKY

Jedním z cílů projektu MV ČR bylo vyvinout metodu pro identifikaci nových psychoaktivních látek, které doposud nebyly identifikovány spektroskopickými metodami, tudíž není možné pro jejich identifikaci využít knihoven spekter. Nové psychoaktivní látky se staly fenoménem na evropské drogové scéně na přelomu tisíciletí a vzhledem ke stálým úpravám jejich struktur ze strany výrobců a dodavatelů jsou stálou hrozbou pro lidské zdraví a společnost.

Identifikace a následná kvantifikace těchto nových psychoaktivních látek je důležitá jak z hlediska zjištění jejich přítomnosti v zadržených vzorcích nelegálních drog pro bezprostřední ochranu koncového uživatele v případech intoxikací, ale zejména také kvůli nutnosti postihovat nakládání s těmito látkami podle platných národních i mezinárodních zákonů. NMR spektroskopie se zde ukazuje jako výhodný nástroj, protože umožňuje simultánní identifikaci a kvantifikaci neznámých složek směsí drog bez nutnosti vícenásobného měření. Nejedná se ovšem o metodu konvenční, proto jsou její výhody omezené a její využití je efektivní zejména u vzorků, které jsou zcela nové a není možné je identifikovat jiným způsobem (např. hmotnostní spektrometrií, infračervenou nebo Ramanovou spektroskopií s využitím spektrální knihovny).

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Teoretický úvod

Nové psychoaktivní látky (NPS, new psychoactive substances) jsou sloučeniny, které jsou svými účinky či strukturami podobné již známým omamným a psychotropním látkám (OPL). Ne všechny jsou kontrolovány mezinárodními nebo národními legislativami¹. NPS jsou v dnešní době dostupné zejména prostřednictvím internetu nebo darknetu a pocházejí především z asijských zemí, odkud je prodávající ilegálně importují do států Evropské unie buďto ukryté ve spotřebním zboží nebo maskované za jiné zboží (koupelové soli, chemikálie apod.)²⁻⁴. Do kategorie NPS se řadí syntetické kanabinoidy, syntetické katinony, benzodiazepiny, fenethylaminy, opioidy, tryptaminy, piperaziny a další látky².

Ke konci roku 2018 sledovalo Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA) přes 730 nových psychoaktivních látek. V roce 2017 obsahovalo 24 % zachycených vzorků nahlášených do systému včasného varování syntetické katinony⁵.

Legislativa České republiky upravuje nakládání s NPS zákonem č. 167/1998 Sb. o návykových látkách, jehož prováděcím předpisem je Nařízení vlády č. 463/2013 Sb. o seznamech návykových látek. Seznam návykových látek je periodicky obnovován, nejnovější aktualizace proběhla ke dni 17. 10. 2018 Nařízením vlády č. 242/2018 Sb. o seznamech návykových látek⁶⁻⁸.

Katinony jsou deriváty účinné látky katinonu obsaženého v rostlině *Catha edulis* rozšířené zejména na Arabském poloostrově a ve východní Africe. Katinony interagují s monoaminovými membránovými transportéry, zejména dopaminovým, serotoninovým a noradrenalinovým transportérem, což vede k synaptické akumulaci těchto neurotransmiterů. Katinony se od analogických amfetaminů liší keto-skupinou v poloze beta, což je u některých označeno předponou bk⁹. Většinou se vyskytují ve formě prášku nebo tablet a jsou užívány orálně nebo nasálně, méně často také injekčně u uživatelů primárně zvyklých na heroin nebo amfetaminy^{2, 10}. Katinony jsou nebezpečné zejména jejich častým zaměňováním za běžně dostupné „tradiční“ stimulanty (např. MDMA), což může u neznalého či nezkušeného uživatele vést k intoxikaci. Dále také vzhledem k variabilitě ve strukturách a přítomnosti heteroatomů (zejména fluoru) mohou některé z těchto látek vykazovat nežádoucí vedlejší účinky s potenciálně vážnými dlouhodobými následky.

Do tablet se přidávají jak ředící látky zvyšující ziskovost nelegálního prodeje, tak další látky zlepšující efekt či snižující vedlejší účinky. Mezi nejčastější příměsi patří kofein, lidokain, škrob, benzokain a další¹¹.

Ne všechny analogy kathinonu jsou popsány a jejich spektra přítomná v knihovnách. Proto bylo nutné vyvinout metodu, kterou bude možné implementovat právě v těchto nestandardních případech. Ta by měla umožnit identifikaci neznámé látky a zároveň i její kvantifikaci.

2.2 Popis metodiky

2.2.1 Princip metody ¹H qNMR pro stanovení kathinonů ve směsích

V praxi je využívána buď relativní nebo absolutní kvantifikace. Relativní kvantifikace je používána v případech, kdy jsou všechny složky směsi známy a zároveň poskytují integrovatelný signál v NMR spektru (tzv. analýza do 100 %). Pro stanovení množství kathinonů ve vzorcích zachycených drog je využívána kvantifikace absolutní, a to z důvodu neznámého složení směsi, či přítomnosti některé složky, kterou nelze v NMR pozorovat (např. soli, omítka). Výpočet zastoupení jednotlivých látek ve směsi je vztahován k použitému vnitřnímu standardu. Vnitřní standard musí splňovat podmínku vysoké čistoty, musí být chemicky inertní, netěkavý a rozpustný v použitém NMR rozpouštědle, nesmí být překryt jinými signály¹²⁻¹⁴.

2.2.2 Přístroje a laboratorní pomůcky

- NMR spektroskop; zde použit JNM-ECZ500R se sondou 5 mm FG/RO Autotune Probe, Jeol Resonance (indukce 11,74 T, pracovní frekvence ¹H 500 MHz)
- Analytické váhy New Classic MF (tolerance ± 0,02 mg), Mettler Toledo, s využitím elektrostatické brány
- Kyvety – SKU: WG-1000-7: High Throughput, Material: Class B Glass, OD: 5 mm, ID: 4 mm, Wilmad Labglass
- Automatické pipety, Eppendorfovy zkumavky a třepačka Vortex

2.2.3 Chemikálie a spotřební materiál

- Hydrochlorid methylonu, HPLC čistota ≥ 99 %
- Hydrochlorid flefedronu, HPLC čistota ≥ 99 %
- Dimethylsulfoxid-*d*₆ (DMSO-*d*₆, deuterace 99,80%), Eurisotope
- Kyselina fumarová, čistota ≥ 99,8 %, Sigma Aldrich

2.2.4 Příprava a skladování standardů

Rozpouštědlo DMSO- d_6 se uchovává v exsikátoru. Zásobní vzorkovnice se standardem se uchovává uzavřená a izolovaná Parafilmem v lednici při 5 °C.

2.2.5 Příprava kalibračních a validačních vzorků

Modelové směsi byly připraveny navážením jednotlivých kationů do Eppendorfových zkumavek. Následně byla do každé zkumavky navážena kyselina fumarová a přidáno 400 μ l DMSO- d_6 . Obsah zkumavky byl poté promíchán použitím třepačky Vortex a převeden do NMR kyvety. Pro zajištění kvantitativního přenosu vzorku byla zkumavka vypláchnuta 200 μ l DMSO- d_6 , a roztok přidán do kyvety. Veškeré přídavky byly váženy diferenčně.

2.2.6 Charakteristiky měření, úprava spekter

Pro analýzu vzorků je použito ^1H qNMR spektrum, tedy ^1H NMR spektrum měřené za kvantitativních podmínek ¹⁴.

Standardní měření ^1H qNMR každého vzorku zahrnuje:

- temperování vzorku v přístroji NMR po dobu 10 minut při teplotě 25 °C a rotaci 15 Hz
- automatické nastavení *lock* frekvence ^2H , automatické 1D gradientové ladění homogenity magnetického pole, automatické ladění sondy na ^1H a ^{13}C , automatické nastavení zesilovače přijímače
- změření standardního ^1H NMR spektra
- nastavení středu spektra (*offset*) a spektrální šířky (*sweep*) tak, aby signály spektra zaujímali maximálně 60 % celého naměřeného spektra (bráno od krajních signálů) a na každém konci spektra tedy bylo nejméně 20 % spektra bez signálů
- kalibraci 90° pulsu
- stanovení relaxačních časů T_1 jednotlivých ^1H jader; nastavení prodlevy mezi akvizicemi na pětinašobek zjištěného T_1 nejpomaleji relaxujícího jádra
- počet akvizicí je volen tak, aby bylo dosaženo poměru signál-šum (SNR) alespoň 250, pokud možno u všech signálů využitých k analýze.
- změření ^1H qNMR

V případě, že koncentrace některých stanovovaných analytů je velmi nízká a jejich signály se překrývají s rotačními či satelitními signály ^{13}C isotopologů majoritních složek vzorku,

doporučujeme měřit spektrum s dekaplinkem ^{13}C a bez rotace vzorku^{12, 14, 15}. Standardní užití ^{13}C dekaplinku značně prodlužuje čas měření, neboť je z důvodu ochrany dekaplovací cívky přístroje nutné dodržet prodlevu cca 60 s mezi jednotlivými akvizicemi. V případě vysoce homogenního pole a kvalitních kyvet lze standardně měřit bez rotace vzorku s minimální ztrátou rozlišení a citlivosti.

Parametry ^1H qNMR spektra pro automatizovanou analýzu vzorků

Pro automatizované měření vzorků byly odvozeny parametry, které ve většině případů poskytují spektra v dostatečné kvalitě pro kvantitativní stanovení. Vzorky, u kterých není získáno spektrum dostatečné kvality (např. nevhodný rozsah spektra či nízký poměr signál-šum), je nezbytné změřit standardním způsobem s individuálním nastavením.

Nastavení experimentu pro automatizované měření ^1H qNMR:

- temperování vzorku na 25 °C po dobu 10 minut v přístroji,
- automatické nastavení *lock* frekvence ^2H
- *offset* 5 ppm
- *sweep* 20 ppm
- 64 akvizicí
- 65536 bodů
- *relaxation delay* 60 s

2.2.7 Úprava spektra

U každého naměřeného spektra se upraví fáze spektra, základní linii (baseline) a provede reference na rozpouštědlo (DMSO- d_6). Dále je vhodné použít doplnění na dvojnásobný počet bodů než při měření a nastavit apodizační funkci na exponenciální s faktorem 0,3 Hz^{12, 14}.

2.2.8 Identifikace a kvantifikace kationů ve vzorku

Složku směsi pro kvantifikaci lze identifikovat buď porovnáním spektra se spektrem standardu či s predikovaným spektrem nebo určit její strukturní vzorec pomocí korelačních experimentů NMR spektroskopie užívaných ve strukturní analýze. Jednotlivé složky vzorku mají integrální hodnoty vlastních signálů v celočíselném poměru (**příloha 2**).

Pro každý sledovaný kation je vybrán takový signál, který není překryt jiným signálem a lze jej tedy integrovat jako samostatný signál. Pro kvantifikaci spektra nejsou vhodné signály vodíku od

hydroxylových či amidových skupin z důvodu jejich velké šířky a závislosti chemického posunu na podmínkách daného vzorku. Následně se pro každý signál zjistí poměr signál-šum (*SNR*), jehož hodnota je pro přesnou integraci nejméně 250. V případě, že je *SNR* výrazně nižší, je výsledek analýzy zatížen chybou, a je doporučeno zvýšit počet akvizicí, nebo připravit nový vzorek o větší koncentraci^{12, 14}.

Obecným doporučením pro integraci singletového signálu v NMR je integrovat oblast dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky ($w_{1/2}$) na každou stranu^{12, 14}. V případě integrace multipletu doporučujeme nejprve stanovit šířku intenzivních píků multipletu v polovině výšky, horní hranici integrované oblasti stanovit jako chemický posun levého píku multipletu v Hz zvýšeného o dvacetinásobek stanovené šířky, dolní hranici integrované oblasti stanovit jako chemický posun pravého píku multipletu v Hz sníženého o dvacetinásobek stanovené šířky (**příloha 1**).

V případech, kdy při integraci vybraného signálu pro kvantifikaci dochází k zahrnutí vedlejšího signálu do integrace, je potřeba zúžit integrovanou oblast i za cenu snížení přesnosti integrace. Při použití dvacetinásobku $w_{1/2}$ je v integrované oblasti zahrnuto 99 % plochy signálu, při použití desetinasobku $w_{1/2}$ je zahrnuto 97 % plochy signálu^{12, 16}.

Pro výpočet hmotnosti stanovované složky po integraci používáme vztah

$$m_{vz} = \frac{m_{std} \cdot N_{std} \cdot A_{vz} \cdot M_{vz}}{A_{std} \cdot M_{std} \cdot N_{vz}}$$

kde *m* je hmotnost, *N* je počet jader náležících signálu, *A* je integrální hodnota signálu (integrál), *M* je molární hmotnost a indexy *vz* a *std* značí vzorek a standard.

Pro výpočet koncentrace stanovované složky používáme vztah

$$c_{vz} = \frac{c_{std} \cdot N_{std} \cdot A_{vz}}{N_{vz} \cdot A_{std}}$$

kde *c* je molární koncentrace, *N* je počet jader náležících signálu, *A* je integrální hodnota signálu (integrál) a indexy *vz* a *std* značí vzorek a standard.

Množství kvantifikované složky je vhodné vyjadřovat jako hmotnost či koncentraci dané složky ve formě volné báze, protože pomocí NMR spektroskopie není u směsných vzorků obvykle možné jednoznačně stanovit, zda se jedná o hydrochlorid či jinou formu látky.

Pro vyhodnocování NMR spekter je vhodné využít program Mnova od firmy Mestrelab Research.

2.3 Pracovní charakteristiky metody

2.3.1 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je nejmenší množství analytu, které je za daných podmínek možné stanovit s definovanou přesností. Pro stanovení kathinonů s využitím vnitřního standardu je mez stanovitelnosti 1 mg/ml. Mez stanovitelnosti závisí zejména na množství vnitřního standardu (doporučené minimální množství je 0,5 mg na 1 kyvetu) a také na parametrech měření a použitém spektroskopu.

2.3.2 Přesnost a správnost stanovených hodnot

Přesnost stanovení kathinonů v roztoku je charakterizována variačním koeficientem (CV), který je získán opakovanou analýzou nezávislých vzorků. Pro nízké koncentrace analytů (1-6 mg/ml) je CV 5 %, pro vyšší koncentrace analytů (cca 10-14 mg/ml) je CV 12 %. Hodnoty opakovatelnosti (n = 5, resp. n = 3) jsou uvedeny v **příloze 4**.

Správnost byla testována proti původní navážce kathinonů v roztoku a byla vyjádřena pomocí relativní chyby. Relativní chyba při stanovení byla <15 % při koncentraci 1-6 mg/ml a <10 % při koncentraci 10-14 mg/ml.

3 NOVOST METODIKY

Námi navržená metodika pro identifikaci a kvantifikaci syntetických katinonů ve vzorcích drog je vhodnou alternativní analýzou k běžně zavedeným metodám jako jsou LC-MS či GC-MS. Její velkou výhodou je minimální časová náročnost na přípravu vzorku. Pro identifikaci látek není nutné použití knihoven spekter, metoda tedy umožňuje stanovit v zadrženém vzorku drogy i katinony s dosud neznámým strukturním vzorcem a následně určit pomocí interního standardu jejich množství ve vzorku.

Pro zajištění správných a přesných výsledků analýz je potřeba používat deuterovaná rozpouštědla a doporučený postup v této práci.

4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je primárně určena pro forenzní pracoviště zabývající se identifikací a kvantifikací omamných a psychotropních látek, zejména jejich podkategorií nových psychoaktivních látek, kde není možné využít jiných metod. Zavedení metodiky vyžaduje dostupnost instrumentace, tedy NMR spektroskopu. Další náklady (nákup standardů, rozpouštědel a provozní náklady spektroskopu) nepředstavují zvýšenou finanční zátěž pro běžně fungující analytickou laboratoř.

5 SEZNAM LITERATURY

1. Běláčková, V.; Drápalová, E.; Grohmannová, K.; Janíková, B.; Kmentonyová, D.; Kvíčalová, M.; Mravčík, V.; Pospíchalová, D.; Štefunková, M.; Šustková, M.; Zábranský, T., *Nové psychoaktivní látky v České republice: výskyt, rizika a související opatření*. Klinika adiktologie 1. LF UK v Praze a VFN v Praze: Praha, 2015.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction *Evropská zpráva o drogách*; 2017.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction *Drugs and Darknet: Perspectives for Enforcement, Research and Policy*; 2017.
4. Národní protidrogová centrála *Výroční zpráva 2017*.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction *Evropská zpráva o drogách*; 2019.
6. Parlament České republiky, Zákon č. 167/1998 Sb. o návykových látkách. 1998.
7. Úřad vlády České republiky, Nařízení vlády č. 463/2013 Sb. o seznamech návykových látek. 2013.
8. Úřad vlády České republiky, Nařízení vlády č. 242/2018 Sb., kterým se mění nařízení vlády č. 463/2013 Sb., o seznamech návykových látek. 2018.
9. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction *Evropská zpráva o drogách*; 2018.
10. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction *Perspectives on drugs: Injection of Synthetic Cathinones*; EMCDDA: 2015.
11. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction *EMCDDA-Europol Joint Report on a New Psychoactive Substance: MDPV (3,4-methylenedioxyvalerone)*; 2014.
12. Bharti, S. K.; Roy, R., Quantitative H-1 NMR spectroscopy. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5-26.
13. Richards, S. A.; Hollerton, J. C., *Essential practical NMR for organic chemistry*. First publish ed.; Wiley: Chichester, West Sussex, 2011.
14. Claridge, T. D. W.; Amin, N., *Quantitative NMR Spectroscopy*. University of Oxford, 2017.
15. Shoenberger, T., Guideline for qNMR analysis. ENFSI Drugs Working Group: Germany, 2019.
16. Griffiths, L.; Irving, A. M., Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits. *Analyst* **1998**, *123* (5), 1061-1068.

6 SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

Mužiková, B. Identifikace nových psychoaktivních látek metodou NMR. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2018.

Kubíčková, K. Analýza kokainu a ředicích látek pomocí NMR. Bakalářská práce, VŠCHT Praha, 2019.

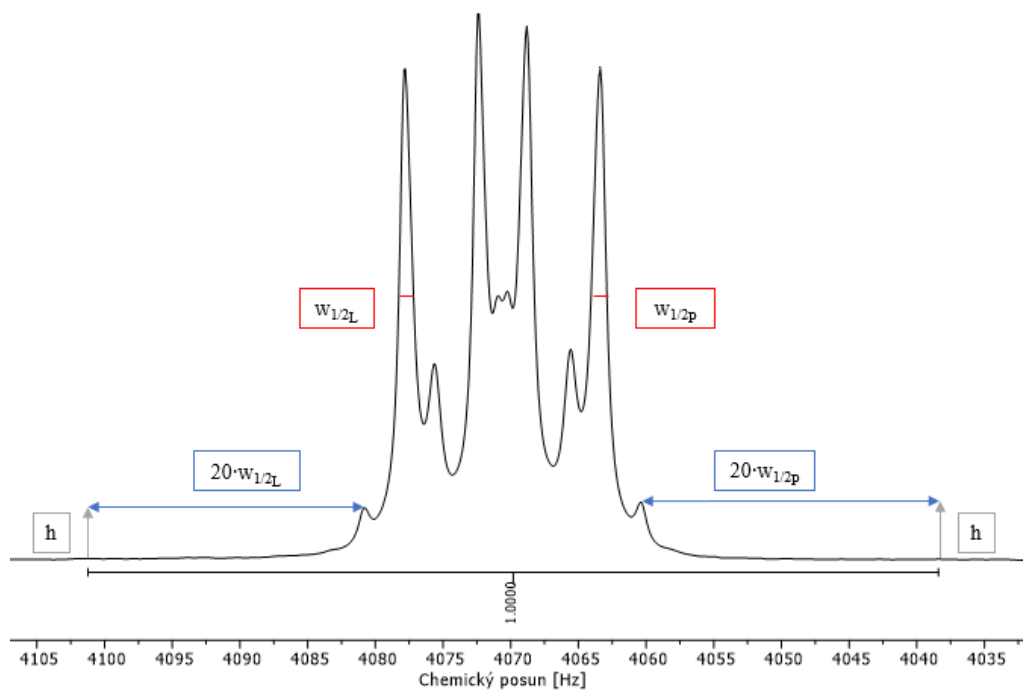
Mužiková, B. Identifikace a kvantifikace bioaktivních složek ve vzorcích omamných a psychotropních látek pomocí NMR. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2020.

7 ODKAZ NA PŘÍSLUŠNÝ PROJEKT VÝZKUMU A VÝVOJE

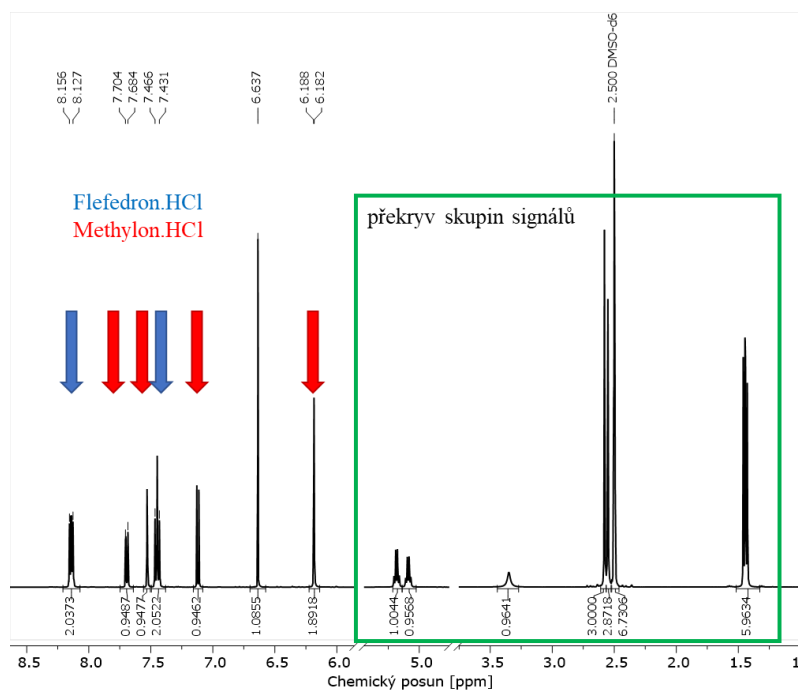
Metodika byla zpracována za finanční podpory Ministerstva vnitra České republiky v rámci řešení projektu bezpečnostního výzkumu VI20172020056: Nové syntetické drogy – komplexní mezioborové výzkumné centrum a podpory programu NPU I Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v projektu LO1611: Sustainability for the National Institute of Mental Health.

PŘÍLOHY

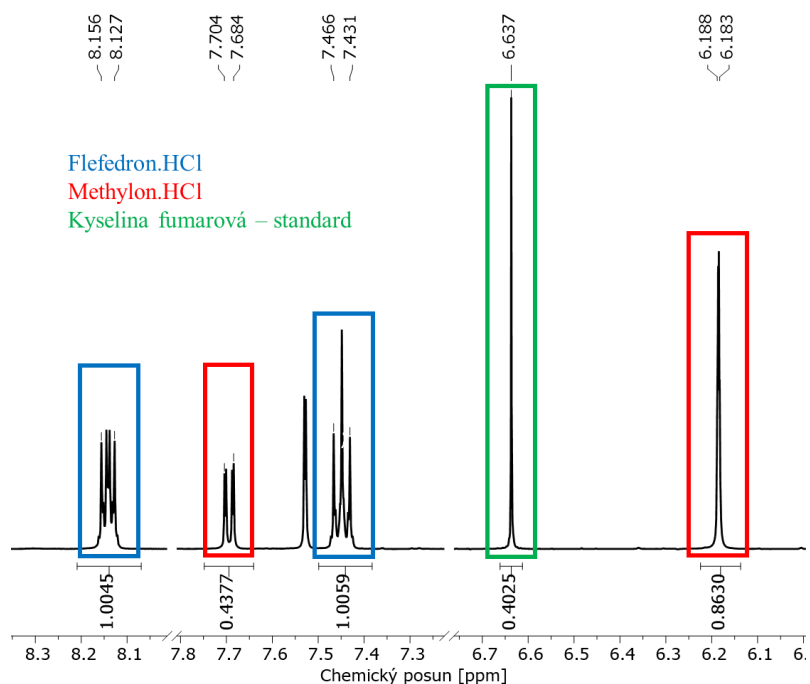
Příloha 1: Schéma integrace multipletu



Příloha 2: Přiřazení signálů složkám směsi



Příloha 3: Integrované spektrum směsi katinonů a vnitřního standardu



Příloha 4: Hodnoty pro určení přesnosti a správnosti

c = 1-6 mg/ml (n = 5)	C _{experimentální} /C _{navážka}					mean	SD	CV
	1	2	3	4	5			
Flefedron.HCl (8,142 ppm)	0,91227	0,84712	0,81799	0,8791	0,81065	0,85342	0,04256	4,99%
Flefedron.HCl (7,447 ppm)	0,92698	0,85181	0,84073	0,90213	0,82230	0,86879	0,04397	5,06%
Methylon.HCl (7,695 ppm)	0,87477	0,83521	0,87955	0,92579	0,81218	0,86550	0,04381	5,06%
Methylon.HCl (6,185 ppm)	0,88722	0,83814	0,88700	0,93737	0,82136	0,87422	0,04587	5,25%

Průměrný variační koeficient: CV = 5,09 %

c = 1-6 mg/ml (n = 5)	Relativní chyba					mean
	1	2	3	4	5	
Flefedron.HCl (8,142 ppm)	8,77%	15,29%	18,20%	12,09%	18,93%	14,66%
Flefedron.HCl (7,447 ppm)	7,30%	14,82%	15,93%	9,79%	17,77%	13,12%
Methylon.HCl (7,695 ppm)	12,52%	16,48%	12,05%	7,42%	18,78%	13,45%
Methylon.HCl (6,185 ppm)	11,28%	16,19%	11,30%	6,26%	17,86%	12,58%

Průměrná relativní chyba: $\delta = 13,45 \%$

c = 10-14 mg/ml (n = 3)	C _{experimentální} /C _{navážka}			mean	SD	CV
	8	9	10			
Flefedron.HCl (8,142 ppm)	1,13026	0,91329	0,94204	0,99520	0,11785	11,84%
Flefedron.HCl (7,447 ppm)	1,13183	0,92518	0,94899	1,00200	0,11307	11,28%
Methylon.HCl (7,695 ppm)	1,15873	0,91346	0,94201	1,00473	0,13413	13,35%
Methylon.HCl (6,185 ppm)	1,14231	0,91370	0,93919	0,99840	0,12528	12,55%

Průměrný variační koeficient: CV = 12,26 %

c = 10-14 mg/ml (n = 3)	Relativní chyba			mean
	8	9	10	
Flefedron.HCl (8,142 ppm)	13,03%	8,67%	5,80%	9,16%
Flefedron.HCl (7,447 ppm)	13,18%	7,48%	5,10%	8,59%
Methylon.HCl (7,695 ppm)	15,87%	8,65%	5,80%	10,11%
Methylon.HCl (6,185 ppm)	14,23%	8,63%	6,08%	9,65%

Průměrná relativní chyba: $\delta = 9,38 \%$