

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**ELEKTROMEMBRÁNOVÁ EXTRAKCE  
AMFETAMINŮ A KATINONŮ ZE SMOLKY**

Diplomová práce

Adéla Dvořáková

Školitel: Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Hradec Králové, 2023



## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

.....  
Adéla Dvořáková



## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce PharmDr. Haně Bavlovič Piskáčkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Alžbětě Nemeškalové, Ph.D. z VŠCHT za poskytnutí reálného vzorku smolky, který byl analyzován v experimentální části této práce. Práce vznikla za podpory SVV 260 547. Na závěr bych chtěla moc poděkovat svým nejbližším za velkou podporu během celého studia.



## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studentka: Adéla Dvořáková

Školitel: PharmDr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Název diplomové práce: *Elektromembránová extrakce amfetaminů a katinonů ze smolky*

Užívání drog patří celosvětově k dlouhodobým problémům. Mezi nejužívanější tvrdé drogy v České republice patří amfetaminy (zejména metamfetamin). Amfetaminy a jejich strukturně podobné látky syntetické katinony patří mezi psychostimulancia a mají stimulační účinek na centrální nervový systém. Zvyšují hladinu dopaminu, noradrenalinu a serotoninu na synapsích pomocí jejich sníženého zpětného vychytávání.

Užívání drog v těhotenství poškozuje nejen matku, ale i plod a může vést k abnormalitám, kdy mohou vznikat malformace orgánů plodu, opožděný vývoj plodu, nízká porodní váha novorozence, předčasný porod nebo riziko hypoxie. Dále hrozí riziko vzniku abstinčního syndromu novorozence (NAS).

Při prenatálním vystavení plodu drogám tedy hrozí nejen komplikace při těhotenství a porodu, ale poté i pozdější důsledky. Většina dětí vykazuje vývojové poruchy, kognitivní problémy a problémy chování až do školního věku. Proto má stanovení expozice plodu drogám tak velký význam pro budoucí vývoj novorozence.

Analýza smolky patří mezi zlatý standard pro testování drog a léčiv u prenatální expozice. Začíná se tvořit na začátku druhého trimestru těhotenství (mezi 12. a 14. týdnem). Drogy užívané matkou během těhotenství procházejí placentou pomocí pasivní difuze a následně se kumulují pomocí depozitu ve smolce. Mezi výhody smolky patří snadný neinvazivní odběr, dlouhé detekční okno a relativně velké množství vzorku.

Smolka je komplexní biologická matrice a vyžaduje úpravu vzorku před samotnou analýzou. Cílem úpravy vzorku je přečištění a odstranění interferujících látek ve složité matrici. V této práci jsme použili elektromembránovou extrakci (EME), což je hybridní mikroextrakční

technika kombinující extrakci z kapaliny do kapaliny a elektroforézu. Přenos ionizovaného analytu je zde zprostředkován z donorového do akceptorového roztoku přes kapalnou membránu (SLM) pomocí vloženého napětí, které v systému vytvoří elektrické pole. Tato extrakce probíhala v miniaturizovaném 96-jamkovém uspořádání.

Optimalizace metody zahrnovala několik kroků – výběr organického rozpouštědla pro SLM, optimalizace složení donorového a akceptorového roztoku, množství smolky, délka extrakce a množství vkládaného napětí.

Optimalizované podmínky naší extrakční metody: složení donorového a akceptorového roztoku tvořila 1% kyselina mravenčí, organické rozpouštědlo pro SLM bylo použito ENB s 1-undekanolem v poměru 1:1 (V/V), množství smolky 45-50 mg na jamku, intenzita třepání 1050 ot/min, délka extrakce 20 minut a velikost vkládaného napětí 15 V, po 1 minutě zvýšeno na 30 V.

Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS. Optimalizovaná metoda byla validována dle směrnice FDA a ověřena analýzou reálného vzorku smolky, který byl pozitivní.



## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Adéla Dvořáková

Supervisor: PharmDr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Title of diploma thesis: *Electromembrane extraction of amphetamines and cathinones from meconium*

Drug use is one of the long-term problems worldwide. Amphetamines (especially methamphetamine) belong among the most used hard drugs in the Czech Republic. Amphetamines and their structurally similar substances synthetic cathinones are psychostimulants and have a stimulating effect on the central nervous system. They increase the level of dopamine, norepinephrine, and serotonin at the synapses through their reduced reuptake.

Drug use during pregnancy does not harm only the mother, but also the fetus and can lead to abnormalities that may occur malformations of fetal organs, delayed fetal development, low birth weight of the newborn, premature birth, or risk of hypoxia. There is also a risk that a newborn will have neonatal abstinence syndrome (NAS).

Prenatal drug exposure not only risks complications during pregnancy and childbirth, but also later consequences. Most children have developmental disorders, cognitive problems, and behavioral problems until school age. Therefore, the determination of fetal exposure to drugs is very important for the future development of the newborn.

Meconium analysis is the gold standard of alternative biological matrix for testing drugs and medications in prenatal exposure. It starts to form at the beginning of the second trimester (between the 12th and 14th week). Drugs used by the mother during pregnancy pass through the placenta by passive diffusion and are subsequently accumulated through a deposit in the meconium. The advantages of meconium analysis include easy non-invasive collection, long detection window and relatively large amount of sample.

Meconium is a complex biological matrix and requires sample preparation before analysis itself. The goal of sample preparation is to purify the sample and to remove interfering substances in a complex matrix. In this project we use electromembrane extraction (EME), which is hybrid microextraction laying between liquid-liquid extraction and electrophoreses. Here, the transfer of the ionized analytes from the donor to the acceptor solution, through the supported liquid membrane (SLM) is mediated by an applied voltage which create an electric field in the system. This extraction was performed in a miniaturized 96-well plate.

The optimization of this method included several steps – choice of organic solvent for SLM, optimization of donor and acceptor solution, amount of meconium for extraction, length of extraction time, and amount of applied voltage.

The optimized conditions of our extraction method: the donor and acceptor solution were 1% formic acid, the organic solvent for SLM was ENB with 1-undecanol in a ratio of 1:1 (V/V), amount of meconium 45-50 mg / well, vortex intensity 1050 rpm, length of extraction 20 minutes, and the size of the applied voltage 15 V, after 1 minute increased to 30 V.

The samples were analyzed using UHPLC-MS/MS. The optimized method was validated using the FDA guideline and verified by analyzing a real sample of meconium that was positive.

## Seznam použitých zkratek

3-CMC	3-chloromethcathinone
3-MMC	3-methylmethcathinone
4-MEC	4-methylethcathinone
5-HT	serotonin
AMF	amfetamin
A-PHP	$\alpha$ -pyrrolidinohexiofenon
A-PVP	$\alpha$ -pyrrolidinopentiofenon
CE	kapilární elektroforéza
D	dopamin
DDA	dodecylacetát
DEHP	di(ethylhexyl)fosfát
DEHPi	bis(2-ethylhexyl)fosfit
DES	eutektická směs (deep eutectic solvent)
DHE	dihexyl ether
DI-HF-LPME	mikroextrakce pomocí dutého vlákna v imerzním provedení (direct immersion hollow-fiber liquid-phase microextraction)
DI-SDME	mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla v imerzním provedení (direct immersion single-drop microextraction)
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid-liquid microextraction)
EMA	Evropská léková agentura (European medicines agency)
EME	elektromembránová extrakce (electromembrane extraction)
ENB	1-ethyl-2-nitrobenzen
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
GC	plynová chromatografie
HF-LPME	mikroextrakce pomocí dutého vlákna (hollow-fiber liquid-phase microextraction)
HS-HF-LPME	mikroextrakce pomocí dutého vlákna v headspace provedení (headspace hollow-fiber liquid-phase microextraction)
HS-SDME	mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla v headspace provedení (headspace single-drop microextraction)
IS	vnitřní standard

LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction)
LLOQ	spodní limit kvantifikace (lower limit of quantification)
MAMF	metamfetamin, pervitin
MDMA	3,4-methylenedioxy- <i>N</i> -metamfetamin, extáze
MDPV	menthylenedioxyprovaleron
ME	matricové efekty
MS/MS	hmotnostní spektrometrie v tandemovém uspořádání
NA	noradrenalin
NAS	abstinenční syndrom novorozence (neonatal abstinence syndrome)
NPOE	2-nitrofenyl(oktyl)ether
NPPE	2-nitrofenyl(pentyl)ether
NPS	nové psychoaktivní substance (new psychoactive substance)
PALME	paralelní extrakce pomocí syntetické kapalně membrány (parallel artificial liquid membrane extraction)
PP	proteinová precipitace (protein precipitation)
PVDF	polyvinylidenfluorid
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDME	mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla (single-drop microextraction)
SLE	extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená pevnou fází (solid supported liquid-liquid extraction)
SLM	kapalná membrána (supported liquid membrane)
SPE	extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction)
SRM	skan vybraných reakcí
TBP	tributylfosfát
TEHP	tris(2-ethylhexyl)fosfát
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií v tandemovém uspořádání
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

## Obsah

Abstrakt .....	5
Abstract.....	7
Seznam použitých zkratk .....	9
1. Úvod .....	15
2. Teoretická část .....	17
2.1. Psychostimulancia .....	17
2.1.1. Amfetaminy a jejich deriváty .....	17
2.1.2. Syntetické katinony .....	21
2.2. Poškození novorozence při užívání drog.....	24
2.2.1. Abstinenční syndrom novorozence .....	24
2.2.2. Postnatální následky a pozdější důsledky.....	25
2.3. Biologický materiál .....	25
2.3.1. Smolka.....	25
2.4. Úprava biologického vzorku .....	27
2.4.1. Proteinová precipitace .....	27
2.4.2. Extrakce na pevnou fázi .....	28
2.4.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	29
2.4.4. Další extrakční techniky .....	30
2.4.5. Mikroextrakční metody odvozené od LLE.....	30
2.5. Elektromembránová extrakce .....	37
2.5.1. Princip metody.....	38
2.5.2. Extrakční parametry .....	39
2.6. Validace bioanalytických chromatografických metod .....	41

3.	Cíle práce .....	46
4.	Experimentální část .....	47
4.1.	Použité chemikálie.....	47
4.2.	Příprava roztoků a pufrů .....	47
4.3.	Smolka.....	48
4.4.	UHPLC-MS/MS .....	48
4.5.	EME.....	49
5.	Výsledky a diskuze .....	50
5.1.	UHPLC-MS/MS .....	50
5.2.	Optimalizace metody EME .....	51
5.2.1.	Optimalizace složení SLM .....	51
5.2.2.	Optimalizace složení donorové a akceptorové fáze .....	53
5.2.3.	Množství smolky .....	55
5.2.4.	Homogenizace smolky .....	55
5.2.5.	Délka extrakčního času.....	56
5.2.6.	Optimalizace napětí .....	57
5.2.7.	Intenzita třepání .....	58
5.2.8.	Výsledné podmínky optimalizované metody .....	58
5.3.	Validace .....	58
5.4.	Reálný vzorek s neznámým analytem a neznámou koncentrací .....	63
6.	Závěr.....	65
7.	Seznam použité literatury .....	66

## 1. Úvod

Amfetaminy jsou psychostimulační drogy, které jsou velmi často zneužívány pro svůj euforizující a stimulační účinek. V České republice patří amfetaminy mezi jedny z nejvíce užívaných drog. Velmi populární jsou od nich odvozené látky s mírnou obměnou chemické struktury – syntetické katinony, které jsou také velmi rozšířené. [1, 2]

Tyto látky mají strukturální podobnost s monoaminovými neurotransmitery (D, NA, 5-HT) a svým účinkem patří mezi nepřímé agonisty, protože zvyšují jejich hladinu na synapsích pomocí jejich sníženého zpětného vychytávání. Amfetamin a metamfetamin mají větší podobnost s dopaminem a noradrenalinem, zatímco extáze má větší podobnost se serotoninem. [3, 4]

Užívání drog v těhotenství poškozuje nejen matku, ale i plod a může vést k abnormalitám, kdy mohou vznikat malformace orgánů plodu, opožděný vývoj plodu, nízká porodní váha novorozence, předčasný porod nebo riziko hypoxie. Dále hrozí riziko vzniku abstinčního syndromu novorozence (NAS). [5, 6]

Při prenatálním vystavení plodu drogám tedy hrozí nejen komplikace při těhotenství a porodu, ale poté i pozdější důsledky. Většina dětí vykazuje vývojové poruchy, kognitivní problémy a problémy chování až do školního věku. Proto má stanovení expozice plodu drogám tak velký význam pro budoucí vývoj novorozence. [5, 6, 7, 12]

Analýza smolky patří mezi zlatý standard pro testování drog a léčiv u prenatální expozice (*in utero*). Začíná se tvořit na začátku druhého trimestru těhotenství (mezi 12. a 14. týdnem). Drogy užívané matkou během těhotenství procházejí placentou pomocí pasivní difuze a následně se kumulují pomocí depozitu žluči a spolknuté plodové vodě ve smolce. Mezi výhody analýzy smolky patří snadný neinvazivní odběr, dlouhé detekční okno a relativně velké množství vzorku. [8, 9, 10, 11]

Smolka je komplexní biologická pevná matrice a vyžaduje úpravu před samotnou analýzou. Cílem úpravy vzorku je přečištění vzorku, odstranění interferujících látek v složité matici a následná kompatibilita s analytickým systémem. [14, 15]

V této práci jsme použili elektromembránovou extrakci v miniaturizovaném 96-jamkovém uspořádání. [16] Tato extrakční metoda zde byla poprvé použita pro extrakci analytů ze smolky.

Cílem práce bylo optimalizovat podmínky EME amfetaminů a vybraných kationů ze smolky a poté optimalizovanou extrakční metodu s následnou LC-MS analýzou validovat.



## 2. Teoretická část

### 2.1. Psychostimulancia

Psychostimulancia neboli stimulační drogy jsou látky, které ovlivňují bdělost a stav vědomí, kdy způsobují celkové povzbuzení organismu a zvyšují nejen duševní, ale i tělesnou aktivitu. Tyto látky stimulují centrální nervový systém, proto po užití dochází k euforii, pocitům vzrušení, bdělosti a výkonnosti. [17, 18]

Mezi psychostimulancia řadíme kofein, kokain, amfetaminy a jejich deriváty. [19]

#### 2.1.1. Amfetaminy a jejich deriváty

##### *Vývoj amfetaminu a jeho derivátů*

Kdysi byly amfetaminy předepisovány při léčbě obezity, astmatu, deprese nebo při narkolepsii. V ČR ale tyto látky nemají klinické využití a lidé je zneužívají jako nelegální drogy. [1, 2, 20]

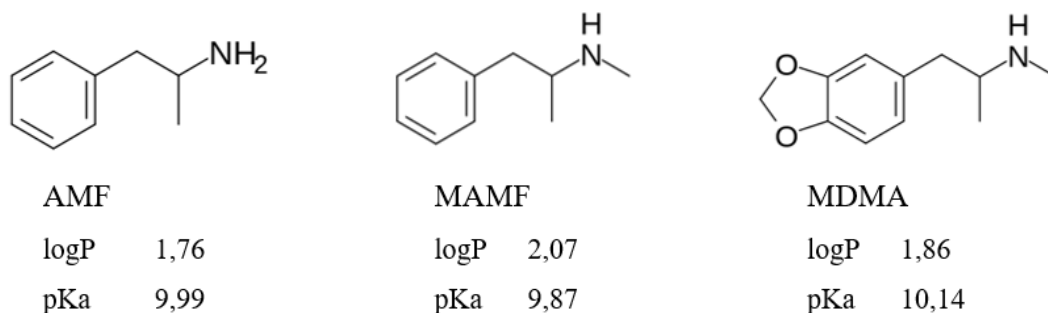
Nejprve byl syntetizován amfetamin (AMF), který měl terapeutické využití při léčbě astmatu a narkolepsie. Poté byly prováděny výzkumy, které se soustředily na stimulační účinky, kdy amfetamin navozoval zlepšenou výkonnost. Byl tedy terapeuticky využíván k léčbě obezity, Parkinsonovy choroby a jako dekonjestant nosní sliznice. [20, 21, 22]

Mnohem známější je ale metamfetamin (MAMF), známý také pod názvem pervitin. Jako prekurzor byl použit efedrin, který pochází z rostliny *Ephedra vulgaris* (chvojník dvouklasý). V dnešní době je ale přednostně syntetizován z pseudoefedrinu, který se nachází ve volně prodejných přípravcích na léčbu nachlazení (konkrétně v přípravcích Modafen, Nurofen Stopgrip či Paralen Plus). [23, 24, 25, 26, 27]

Následně byla objevena extáze (3,4-methylenedioxy-*N*-metamfetamin, MDMA), která byla nejprve používána jako lék na hubnutí, poté se používala v psychoterapii. Později však začala patřit mezi zakázané látky a byla hojně zneužívána v tanečních klubech jako taneční droga nebo droga lásky. [28, 29]

Ve 20. století měly tyto látky využití v terapii deprese, při poruchách nálad nebo poruchách osobnosti, při obezitě či anorexii. Během 2. světové války byly amfetaminy používány pro zlepšení výkonu, zvýšení koncentrace, a hlavně k potlačení hladu a únavy. Poté se tyto látky sice přestaly terapeuticky využívat, avšak i nadále byly zneužívány jako nelegální drogy. [22]

Velký rozvoj amfetaminových drog je také kvůli tomu, že je zde velká výroba z prekurzorů, kdy k výrobě stačí pouze syntetické látky bez potřeby přírodních zdrojů a jejich relativně nízká cena na černém trhu. Amfetaminy tedy patří mezi syntetické chemické látky, které jsou pro svůj euforizující účinek hojně zneužívány jako nelegální drogy. Amfetaminy patří mezi deriváty fenyliisopropylaminu (obrázek č. 1), kam patří amfetamin, metamfetamin a extáze. [21, 30]



**Obrázek č. 1:** Chemická struktura amfetaminu a od něj odvozené struktury s vybranými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Převzato z [89].

### *Charakteristika a účinky amfetaminů*

Amfetaminy jsou syntetické látky, vzhledem jde o jemné krystalické prášky, zpravidla bez zápachu, mají dobrou rozpustnost ve vodě i alkoholu. Nejčastější způsob užití je perorálně, ale lze je užít i nazálně, inhalačně či intravenózně. [31]

Při užití amfetaminů dochází ke zvýšení tepové i dechové frekvence, hypertenzi a s tím spojenou vazokonstrikci. [32]

Mezi další projevy patří euforie, motorický neklid, mydriáza, pocení, hypertermie, urychlení myšlení a kognitivních funkcí (ale na úkor jejich kvality), přílivu energie, změnám psychiky a myšlení jedince, lehce vyprovokovatelnému a násilnickému chování

a rychlé proměně nálad. Ustupuje tedy únava, hlad, ale i zábrany. [32]

Extáze se navíc řadí mezi empatogeny (kdy se zvyšuje empatie) a entaktogeny (zvyšuje se intenzita vnímání doteků, vjemů a požitků), člověk lépe navazuje kontakty s okolím a je pohybově neklidný. [33]

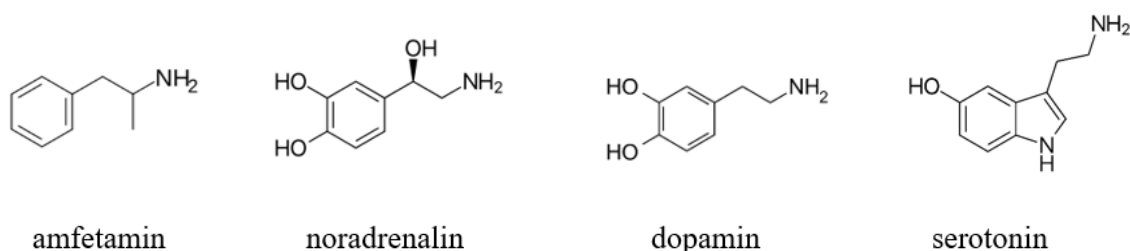
Amfetamin, metamfetamin i extáze mají vysoké riziko psychické závislosti s nástupem velké tolerance dávek. To vede ke zvyšování dávek těchto drog, čímž se zvyšuje riziko předávkování. U injekčního podání hrozí vysoké a neúměrné podání drogy, kdy při předávkování může dojít k silné bolesti hlavy až nevolnosti projevené zvracením, neostrým viděním, poruchám srdečního rytmu, křečím, přehřátím, sliněním, kómatem, akutním infarktem myokardu a v nejhorším případě i k smrti. Při akutním předávkování je hlavní negativní dopad na kardiovaskulární systém, kdy se projevují závažné arytmie, hypertermie, tachykardie, tachypnoe, svalový třes a záškuby. V závažných případech může dojít až k přehřátí, srdečnímu, renálnímu, jaternímu selhání až kómatu. [32, 34, 35]

Při dlouhodobém užívání dochází k vyčerpání katecholaminů v synapsích a nervových zakončeních a z toho také plynou následky: hrozí riziko toxické psychózy – ztráta kontroly nad realitou, paranoidní a agresivní chování, živé halucinace, bludy (chování podobné paranoidní schizofrenii), destrukce osobnosti, známky deprese, nesoustředěnost, ztráta výkonnosti, velká únava a vyčerpání, podvýživa, poruchy srdeční činnosti, neadekvátní chování, které může být nebezpečné jak jedinci samotnému, tak i jeho okolí, narušená kvalita spánku a větší riziko křečí (riziko rozvoje parkinsonismu v pozdějším věku). Mnoho uživatelů proto končí na psychiatrii. [32, 34, 36]

Jelikož jde obvykle o velmi těžkou závislost, je i léčba obvykle velmi náročná. Odvykání se vyznačuje hlavně psychickými projevy. Nejprve následuje únava, poté velký hlad, epizody deprese, úzkosti a někdy sebevražedné myšlenky. Časté je bažení po droze, podrážděnost a poruchy spánku. [32, 34]

## Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti amfetaminů

Z chemického hlediska jsou amfetaminy deriváty fenylisopropylaminu a jejich struktura je velmi podobná struktuře dopaminu, noradrenalinu a serotoninu (obrázek č. 2). Díky této strukturní podobnosti s neurotransmitery amfetaminy narušují funkci jejich transportérů, tím nepřímo ovlivňují jejich hladiny a řadí se tak mezi nepřímá sympatomimetika. Jde o lipofilní, slabě bazické sloučeniny, které mají chirální charakter, kdy *S*-enantiomery mají až 5× vyšší psychostimulační účinek než *R*-enantiomery. [21, 37]



**Obrázek č. 2:** Strukturní podobnost amfetaminu s neurotransmitery. Převzato z [89].

## Farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti

Metamfetamin je užíván většinou perorálně, intravenózně, šňupáním nebo kouřením. Amfetamin je užíván perorálně nebo intravenózně. Extáze se nejčastěji užívá perorálně, ale lze i šňupáním. Maximální účinek nastupuje nejrychleji po intravenózním podání přibližně do 15 minut, do 20 minut po kouření či šňupání a během 180 minut po perorálním užití. [38]

Účinky metamfetaminu a amfetaminu jsou velmi podobné a užití konkrétní látky se dá rozlišit pouze pomocí laboratorní analýzy. [39] Obě látky působí jako nepřímá sympatomimetika se stimulačním účinkem jak na centrální, tak na periferní úrovni. Účinek je daný strukturní podobností neurotransmitterům – dopaminu, noradrenalinu a serotoninu. Amfetaminy mají inverzní účinek na transportéry zpětného vychytávání neurotransmitterů v synapsích, a tak nepřímo zvyšují jejich hladinu. Protože jsou si amfetaminy s neurotransmitery strukturně podobné, snadno se dostávají přes tyto přenašeče přímo do synapsí a tím zvyšují uvolňování neurotransmitterů z vezikul do synaptických štěrbin. Amfetamin a metamfetamin mají nejvyšší afinitu

k noradrenalinovým a dopaminovým přenašečům. K serotoninovému přenašeči má vyšší afinitu extáze. [17, 18, 21]

## 2.1.2. Syntetické katinony

### *Charakteristika syntetických katinonů*

Syntetické katinony se řadí mezi tzv. nové psychoaktivní substance (NPS). NPS se nově objevují na ilegálním trhu s drogami. Dochází k lehkým obměnám chemické struktury již známých klasických drog, tím tak látka dočasně spadá pod nezakázanou látku a tím ilegální výrobci obcházejí legislativní normy. Látka dočasně není na seznamu kontrolovaných omamných a psychotropních látek a prekursorů pro jejich výrobu nepatří mezi monitorované substance, jsou volně dostupné a tím jejich syntéza není nijak omezena a teoreticky není nezákonná. [40, 41, 42]

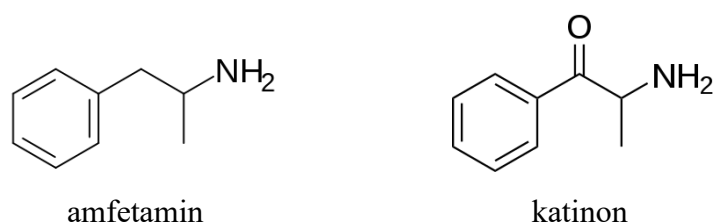
Syntetické katinony jsou skupina psychostimulačních látek příbuzných katinonu, což je hlavní psychoaktivní látka v listech rostliny *Catha edulis* (kata jedlá). Katinon je sám o sobě chemicky podobný amfetaminu (obrázek č. 3) a je mezinárodně kontrolován jako často zneužívaná substance. [40, 43]

Syntetické katinony patří mezi druhou nejrozšířenější kategorií NPS a jsou legálně prodávány jako náhrady kontrolovaných stimulantů, jako je amfetamin, metamfetamin a extáze. Aby jejich prodej byl ještě více ulehčen, mohou se prodávat pod různými názvy s nejednoznačnými informacemi o jejich skutečném obsahu. Nejčastěji se tak přezdívají jako bath salts (koupelové soli). [41, 42, 44]

### *Struktura a vlastnosti katinonů*

Svým účinkem se podobají účinkům drog fenylisopropylaminových derivátů (AMF, MAMF, MDMA) a také selektivně uvolňují serotonin, dopamin a noradrenalin. Působí entaktogenně a stimulačně. Od amfetaminů se liší tím, že mají charakteristickou

keto skupinu na postranním řetězci na prvním uhlíku vedle aromatického jádra v  $\beta$ -pozici, proto jsou někdy označovány jako bk-amfetaminy ( $\beta$ -keto-amfetaminy). [45]



**Obrázek č. 3:** Strukturální podobnost amfetaminu a katinonu. Převzato z [89].

Nejčastěji mají katinony bílou barvu, někdy jsou lehce zbarveny do žluta až hněda a jsou typicky bez zápachu v práškové nebo krystalické formě. [46, 48]

Mezi první známé deriváty patřil methylon a butylon, později také mefedron. Po jejich zákazu následovala blízká analoga jako 4-MEC, 3-MMC a halogenované deriváty. V poslední době jsou hojně rozšířené pyrolidinofenonové katinony zahrnující např.  $\alpha$ -PVP či MDPV, které navíc způsobují velký psychický návyk a způsobují složité odvykací stavy. [46, 47, 49] Vybrané syntetické katinonové deriváty jsou zobrazeny na obrázku č. 4.

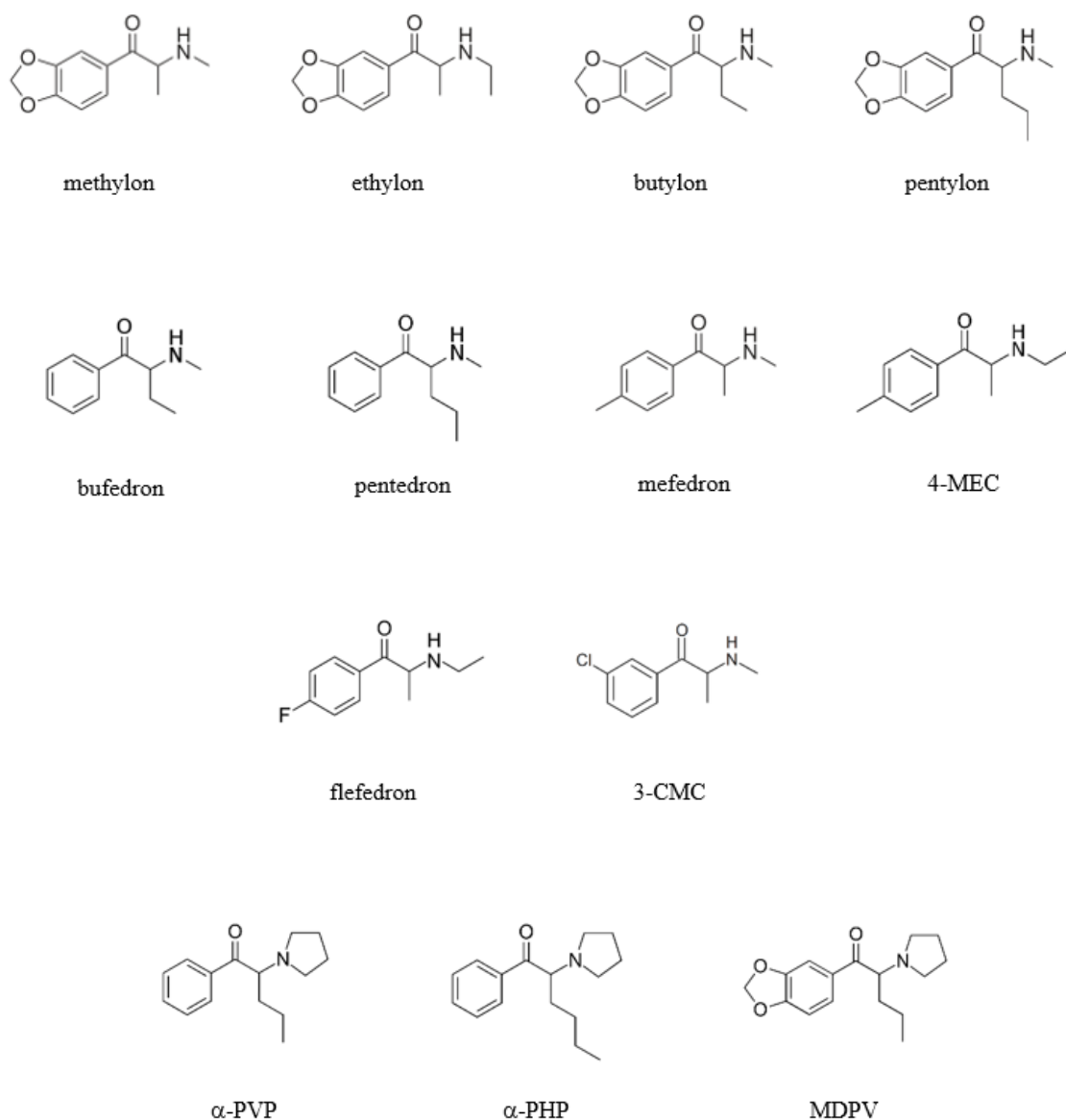
### *Účinky katinonů*

Katinony mají velmi podobné účinky jako již zmíněné amfetaminy, tedy zlepšují náladu, dodávají pocit blízkosti a větší důvěru k lidem v okolí. Uživatelé mají větší tendenci se přátelit, být společenší a citlivější. Mezi další účinky patří pocit euforie, zvýšená pozornost a hyperaktivita. Rovněž ovlivňují produkci dopaminu (způsobuje euforické pocity) a noradrenalinu (zvyšuje krevní tlak a zrychluje srdeční tep). Po euforii se dále dostavuje sexuální stimulace, zvýšená pozornost a celkové vybuzení organismu. [46, 50, 51]

Katinony jsou při opakovaném užívání neurotoxické, kdy hlavní dopad mají na kardiovaskulární systém a hrozí riziko vzniku serotoninového syndromu. Serotoninový syndrom je stav, kdy dochází ke změně vědomí (zmatenost, agitovanost,

halucinace, kóma), neuromuskulární aktivitě (projevující se třesem, křečemi a záškuby), a také autonomní nestabilitě (s rizikem tachykardie, hypertenze či hypotenze, hypertermie, zvracení nebo průjmy). V závažných případech nebo při předávkování dochází k dehydrataci, generalizovaným křečím, rhabdomyolýze, koagulopatii, renálnímu selhání či kómatu. [50, 52]

Tyto látky mohou být mnohem nebezpečnější než známé drogy díky nedostatku informací o rizicích jejich užívání, nekontrolovatelné dostupnosti, ale také jsou na černém trhu často v různých kombinacích či s různými neznámými nebo neuvedenými příměsemi, což může představovat další rizika. Lehká obměna chemické struktury může také vyvolat další nežádoucí účinky, o kterých doposud nebylo známo. [53]



**Obrázek č. 4:** Chemické struktury derivátů syntetických katinonů. Převzato z [89].

## 2.2. Poškození novorozence při užívání drog

Užívání drog v těhotenství poškozuje nejen matku, ale i plod. Amfetaminy se během těhotenství dostávají do organismu novorozence pomocí pasivní difuze přes placentu. [54]

Užívání drog během těhotenství může vést k jeho abnormalitám – může docházet k opožděnému či nepříznivému vývoji plodu, malformaci orgánů, riziku odloučení placenty, hypoxii, nízké porodní váze, předčasnému porodu nebo potratu. [5, 6, 7, 57]

Při expozici může docházet k prenatálnímu poškození, kdy může dojít k neurotoxicitě, předčasnému uvolnění placenty, asfyxii, syndromu dechové nedostatečnosti, nebezpečí zástavy dýchání, dušnosti, vznětlivosti, motorickému neklidu nebo zvýšené náchylnosti ke stresu. [5, 6, 55]

Stanovení expozice plodu drogám má proto velký význam pro budoucí vývoj novorozence. [12, 57]

### 2.2.1. Abstinenční syndrom novorozence

Při užívání amfetaminů v těhotenství hrozí riziko vzniku novorozeneckého abstinenčního syndromu (NAS). Je to stav, který vzniká při odnětí drogy a jde o diagnózu nemoci. Tento syndrom má neurologické projevy (hyperexcitabilita, ospalost, křeče, dráždivost, ospalost), gastrointestinální projevy (omezený příjem tekutin, špatné přibírání na váze, zvracení, průjem) a projevy autonomního svalstva (hypotonie, pocení, tachykardie). Projev a závažnost syndromu je závislý na četnosti a velikosti dávky užití drogy či formě jejího podání. [7, 12]

Klinické symptomy se mohou objevit ihned po porodu, ale také později, většinou během 36-72 hodin po porodu. Při zjištění, že novorozenec trpí abstinenčním syndromem, je zvolen nefarmakologický postup formou podpůrné péče. Při vážnějším abstinenčním syndromu je novorozenec monitorován a je nutná terapie v nemocničním neonatologickém zařízení. Při těžkých symptomech stav vyžaduje farmakoterapii. [7, 12]



## 2.2.2. Postnatální následky a pozdější důsledky

Při vystavení plodu drogám tedy hrozí nejen komplikace při těhotenství a porodu, ale hrozí i pozdější následky. Většina těchto dětí vykazuje vývojové poruchy ve formě opožděného vývoje řeči, opožděný motorický vývoj díky zvýšenému svalovému napětí s omezenou pohyblivostí, hyperextenzi kloubů a sníženému ohybu kloubů. Dále se vyskytují kognitivní problémy, zejména poruchy pozornosti, paměťové poruchy, poruchy učení, horší zvládání stresu, úzkostlivost, agresivita a deprimovanost až do školního věku. [56]

## 2.3. Biologický materiál

Amfetaminy a jejich deriváty můžeme detekovat v různých biologických matricích. Výběr správné matrice závisí na účelu prokázání drogy a časovém oknu, kdy k expozici drogou došlo. Během pár minut můžeme najít stopy amfetaminů v krvi nebo slinách, poté během několika hodin až dní v moči a během několik týdnů až měsíců například ve smolce, vlasech či nehtech. [15, 58]

### 2.3.1. Smolka

Smolka (latinsky *meconium*) je první novorozenecká stolice. K jejímu vyloučení dochází během prvních hodin života novorozence při jeho prvním pohybu střev. U donošených a zdravých dětí dochází k průchodu smolky okolo 12 hodin po narození a většinou je vylučována až po dobu 48 hodin. Předčasně narozené děti nebo novorozenci s nízkou porodní váhou mají typicky opožděné vylučování smolky. [10, 15]

Smolka bývá hustého a lepkavého charakteru, většinou zelené, žluté nebo hnědé barvy a typicky bez zápachu. Jedná se o velmi komplexní biologickou matici, která obsahuje směs odpadních látek, materiálů a sekretů, které polkne plod v gastrointestinálním traktu během těhotenství. Obsahuje požitou plodovou vodu, střevní sekrety, žluč, pankreatické enzymy, plazmatické proteiny, dlaždicové buňky epitelu, žlučová barviva, steroidy, steroly, slizové glykoproteiny, metabolity hemoglobinu

(bilirubin, porfyriny), zbytky odloupených tkání (z úst, kůže, trávicího traktu), různé ionty a je bohatá na lipidy a bílkoviny. [10, 15]

Smolka se začíná tvořit v tlustém střevě na začátku druhého trimestru (mezi 12. a 14. týdnem těhotenství), kdy se začíná vyvíjet polykací reflex u plodu a umožňuje tak polykání plodové vody. [10, 58] Drogy užívané matkou během těhotenství procházejí placentou převážně pasivní difuzí a následně se kumulují ve smolce pomocí depozitu ve žluči a spolknuté plodové vodě. [54]

Analýza smolky má relativně nový vědecký vývoj. Různé analytické postupy a techniky existují hlavně pro screening drog, jejich metabolitů a někdy i léčiv. Mezi nejčastěji stanovované látky ve smolce patří kokain, amfetamin (a metabolit p-hydroxyamfetamin), metamfetamin (a metabolit p-hydroxymetamfetamin), syntetické katinony, heroin, morfin, kodein, opioidy, barbituráty, benzodiazepiny, konopí, nikotin a alkohol. [10, 13]

Stanovení expozice plodu drogám má velký význam hlavně pro budoucí vývoj novorozence. Smolka proto představuje vynikající depozit těchto substancí, kterým byl plod vystaven. Správnou diagnostikou expozice drog *in utero* během těhotenství umožňuje pro novorozence získat případnou specializovanou léčbu a péči, která napomůže lepšímu vývoji a také zamezit abstinenčnímu syndromu, který by plodu kvůli expozici mohl hrozit. Smolka tak patří k důkaznímu materiálu, protože analýza umožňuje detekci delšího období při expozici drog než například moč a také jsou zde i mnohem vyšší koncentrace. [11, 12, 15, 57]

K dosažení prokazatelným pozitivním výsledkům je nutná častá a dlouhodobá expozice, zejména během třetího trimestru těhotenství. Analýza drog ve smolce tak vede velmi málo k falešně pozitivním výsledkům. U novorozenců s podobnou expozicí se mohou vyskytovat různé koncentrace drog nebo jejich metabolitů ve smolce kvůli rozdílnému fetálnímu metabolismu a rozdíly mezi placentami. [9, 15]

Mezi výhody patří neinvazivní snadný odběr vzorku z pleny, poskytuje velmi široké okno detekce, velké množství vzorku (okolo 20 až 60g). [10, 59]

Nevýhodou jsou aspekty, kdy je smolka uvolněna v děloze již během porodu a screening tak může detekovat i léčiva použítá při něm, což by vedlo ke zkresleným

výsledkům. Také dochází k nepravděpodobné akumulaci smolky ve střevě plodu, kdy se po 38. týdnu hromadí okolo 80 % smolky. Pokud je plod vystaven expozici drog během těhotenství, tak s největší pravděpodobností bude mít i nízkou porodní hmotnost, která může vést k opožděnému vyloučení smolky. Analýza drog ve smolce navíc neposkytuje informace o expozici plodu během prvního trimestru. [10, 15]

## 2.4. Úprava biologického vzorku

Smolku, jako ostatní biologické matrice, je potřeba před samotnou analýzou upravit. Tato úprava se provádí za účelem přečištění a odstranění interferujících látek z komplexní biologické matrice a ideálně také zakoncentrování detekovaného analytu. [14, 60]

Mezi nejčastější interferující látky patří fosfolipidy, soli, sacharidy nebo proteiny, které pak mohou ve vzorku svou přítomností, v případě detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), způsobovat matricové efekty. Také mohou být ve vzorku v mnohem větším množství než sledovaný analyt, což by také znemožňovalo analýzu, a navíc jsou často nekompatibilní s následným analytickým systémem. [60]

Tento krok bývá často velmi pracný a zdoluhavý. Je ale velmi důležitý, protože ovlivňuje jak citlivost, tak selektivitu a reprodukovatelnost, a jde tedy o klíčovou část celé analýzy. [14, 60]

Mezi nejpoužívanější metody úpravy vzorku v bioanalytických laboratořích patří proteinová precipitace (PP), extrakce na pevnou fázi (SPE) nebo extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). [60, 61]

### 2.4.1. Proteinová precipitace

Tato metoda je ze všech tří konvenčních technik nejjednodušší a je vhodná pro matrice, které jsou bohaté na proteiny (plazma, sérum či plná krev). Spočívá v tom,

že k analytu přidáme precipitační činidlo, které dané proteiny denaturuje, vytvoří se precipitát a odebere se pouze supernatant – analyt zbavený proteinů. [60, 61]

Mezi precipitační činidla řadíme organická rozpouštědla – methanol, ethanol, acetonitril nebo aceton, která jsou hojně využívána v bioanalýze. Výhodou je i to, že jsou kompatibilní s chromatografickým systémem. Dále můžeme použít silné kyseliny – např. kyselinu trifluoroctovou, trichloroctovou, chloristou, fosforečnou nebo chlorovodíkovou. U používání silných kyselin musíme brát ohled na výsledné pH vzorku a také na stabilitu analytu při nízkém pH. Dále jako precipitační činidla můžeme použít soli těžkých kovů jako síran zinečnatý či síran měďnatý. [60, 61]

Mezi výhody PP patří, že je rychlá, levná a poměrně efektivní (okolo 95-99%). Mezi nevýhody PP patří, že dochází k odstranění pouze proteinů, a ne dalších endogenních látek, které mohou dále interferovat s analytem. Také může část analytu být ztracena, pokud se naváže na precipitát a také dochází k naředění vzorku. [60, 61]

## 2.4.2. Extrakce na pevnou fázi

Metoda extrakce na pevnou fázi je založena na separaci analytu mezi dvě nemísitelné fáze, kdy jedna z nich je pevná. Nejprve se provádí kondicionace, což je příprava sorbentu k použití, kdy v suchém stavu jsou funkční skupiny neaktivní a je nutná jejich solvatace např. polárním organickým rozpouštědlem (methanolem nebo acetonitrilem). Tím se upraví prostředí, kdy se aktivují funkční skupiny sorbentu. Poté kolonku promyjeme vodným rozpouštědlem a nanese vzorek, který se selektivně zadrží na kolonce pomocí funkčních skupin. Poté dojde k promytí kolonky vhodným rozpouštědlem a tím se zbavíme balastních látek. Pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od rozpouštědla, kterým jsme promývali kolonku, musíme nejprve kolonku vysušit proudem inertního plynu (většinou dusíkem). Nakonec dojde k eluci analytu pomocí promytí elučním rozpouštědlem, kdy je narušena interakce analytu se sorbentem a je uvolněn ze zadržené kolonky a připraven na analýzu. [60, 61, 62]

Látka se naváže díky fyzikálně-chemickým vlastnostem analytu, zejména pomocí hydrofobních interakcí, dipólových interakcí, elektrostatických

interakcí, tvorbou vodíkových můstků nebo pomocí  $\pi$ -interakcí násobných vazeb. Sorbent se tedy vybírá podle vlastností analytu. [60, 61, 62]

Mezi výhody SPE patří, že je velmi efektivní, selektivní, automatizovatelná, existuje velký výběr ze sorbentů, umožňuje zakoncentrování vzorku a extrakční účinnost se blíží 100%. Mezi nevýhody SPE patří vyšší cena a časová náročnost. [60, 61]

### 2.4.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny

U této extrakce je principem separace analytu mezi dvě nemísitelné kapalné fáze, kdy jedna fáze je vodná a druhá organická nemísitelná s vodou. Důležité je, aby extrahovaný analyt byl v neionizované formě, aby mohl přejít do organické fáze. Poté se k analytu přidá organické rozpouštědlo, které musí splňovat dané požadavky: musí být nemísitelné s vodou, mělo by mít vhodnou polaritu pro extrahované analyty, být těkavé a mít odpovídající čistotu. Pokud najdeme vhodné rozpouštědlo, musí být mezi oběma fázemi dobrý kontakt, který se zajistí třepáním. Rozdělení analytu mezi extrakční činidlo probíhá na základě rozdělovacího koeficientu logP (při poměru oktanol/voda), kdy platí úměra – čím vyšší je koeficient logP, tím je látka lipofilnější. [60, 61]

Někdy ale potřebujeme zlepšit výtěžnost extrakce, kdy pro extrakci použijeme směs organických rozpouštědel nebo dále můžeme přidat iontově párové činidlo v případě ionizovatelných látek či upravit pH vodné složky (abychom potlačili ionizaci a elektroneutrální iontový pár byl extrahovaný do organické fáze), přidat anorganickou sůl (aby byly solvatovány anorganické ionty přidané do vzorku a analyt bude méně solvatován a sníží se tak jeho rozpustnost ve vodné fázi a dojde tím ke zvýšení rozpustnosti v organické fázi) nebo můžeme analyt derivatizovat (pro umožnění analýzy nebo zlepšení detekce látky). [60, 61]

Mezi výhody LLE patří dobrá výtěžnost a reprodukovatelnost, jednoduchost na provedení, nevyžaduje speciální vybavení, umožňuje i zakoncentrování vzorku, je vhodná pro různě velká množství analytu a umí redukovat matricové efekty, protože obvykle dobře odstraňuje soli i fosfolipidy. Mezi nevýhody LLE řadíme to,

že je pracná, hůře automatizovatelná, mohou se tvořit emulze na fázovém rozhraní a není vhodná pro extrakci více polárních látek. [60, 61]

#### 2.4.4. Další extrakční techniky

Ideální extrakční technika by měla být jednoduchá, rychlá, účinná, selektivní, dobře automatizovatelná a v ideálním případě, aby byla nízká spotřeba rozpouštědel. Z tohoto důvodu se stále vyvíjí nové extrakční techniky inovací konvenčních technik. [63, 64]

Moderní trendy tedy kladou důraz na miniaturizaci (jak rozpouštědel, tak analyzovaného vzorku), automatizaci, zvýšení citlivosti a selektivity, snížení nákladů na extrakci, zpracování co nejvíce vzorků najednou a také on-line spojení s extrakční technikou. [63, 64]

#### 2.4.5. Mikroextrakční metody odvozené od LLE

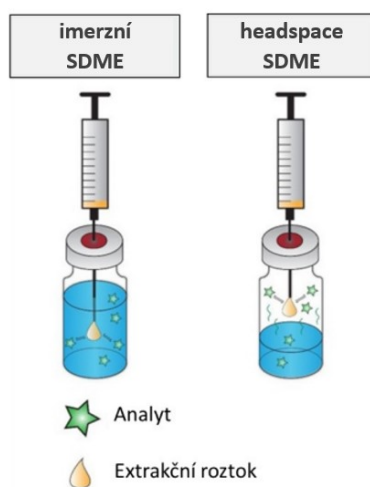
Miniaturizované metody odvozené od LLE fungují na stejném principu, ale s menším množstvím jednak organického rozpouštědla (nemísitelného s vodou), tak našeho sledovaného analytu. To vede k menší spotřebě daných rozpouštědel, a tím k šetrnějšímu přístupu k životnímu prostředí. [63, 64]

Mezi tyto miniaturizované metody zahrnujeme mikroextrakci do jediné kapky rozpouštědla (SDME), mikroextrakci do kapalné fáze s využitím dutého vlákna (HF-LPME), elektromembránovou extrakci (EME), paralelní extrakci pomocí syntetické kapalné membrány (PALME), disperzní mikroextrakci z kapaliny do kapaliny (DLLME) nebo extrakci z kapaliny do kapaliny s využitím pevné fáze (sorbentu) (SLE). [62, 64]

Výhody těchto metod jsou – minimální spotřeba rozpouštědel, pro analýzu stačí malé množství vzorku, umožňují zakoncentrování vzorku a jsou bez rizika tvorby emulzí. [64]

### *Mikroextrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME)*

Tato metoda byla popsána v roce 1996 a jde o první miniaturizovanou metodu odvozenou od LLE. Je prováděna pomocí mikrostříkačky, kdy se na jejím konci vytvoří malá kapka, kterou tvoří organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou o objemu 2-3  $\mu\text{l}$ . Analyt je extrahován z vodného roztoku do kapky pomocí pH gradientu pasivní difuzí. Extrakce může probíhat dvěma způsoby. Buď jde o imerzní způsob DI-SDME, kdy je kapka ponořena do vodného roztoku, kde probíhá extrakce nebo jde o HS-SDME, kdy je využíváno tzv. headspace techniky a kapka je vložena do prostoru nad hladinou vodného roztoku, kde probíhá extrakce. Headspace způsob se využívá především u těkavých látek. Oba tyto způsoby SDME extrakce můžeme vidět na obrázku č. 5. Po extrakci je kapka vtažena zpátky do jehly mikrostříkačky. Během extrakce je nutné, aby byl roztok míchán. Tato metoda je jednoduchá a nevyžaduje speciální vybavení. Mezi hlavní nevýhodu ale patří nestabilita kapky a s tím spojená špatná opakovatelnost metody. [14, 63, 64]



**Obrázek č. 5:** Extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME) a její dva způsoby provedení – v módu imerzním nebo headspace technikou. Převzato a upraveno z [65].

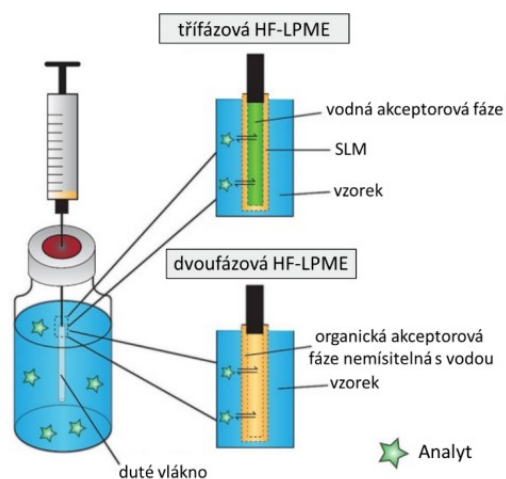
### *Mikroextrakce s využitím dutého vlákna (HF-LPME)*

U této metody, jak už z názvu vypovídá, probíhá extrakce do kapalně fáze pomocí dutého vlákna (tzv. hollow fiber) a byla poprvé popsána v roce 1999. Porézní vlákno je tvořeno polypropylenem, kdy vnitřní stěna vlákna je potažena organickým

rozpouštědlem nemísitelným s vodou a vyplňuje póry. Když dojde k ponoření vlákna do organického rozpouštědla, vlákno se impregnuje a vytvoří se tzv. tekutá membrána (SLM). Uvnitř dutého vlákna se nachází akceptorové médium, do kterého jsou analyty extrahovány. I u této metody lze použít jak imerzní mód (DI-HF-LPME), tak headspace mód (HS-HF-LPME). Přechod zkoumaného analytu do akceptorového roztoku probíhá pasivní difuzí pomocí pH gradientu. [14, 62, 63, 65, 66, 67]

U této metody jsou dva způsoby provedení (obrázek č. 6) – dvojfázový nebo trojfázový systém. U dvojfázového systému máme v pórech (tvořící SLM) i vnitřku vlákna (tvořené akceptorovým médiem) obsažené stejné organické rozpouštědlo (nemísitelné s vodou), které tvoří jednu fázi. Druhou fází tvoří vodný roztok s analytem. Tento způsob lze využít u hydrofóbních analytů nebo pokud bude následná analýza prováděna pomocí GC instrumentace. [63, 67]

U trojfázového systému je v pórech (tvořící SLM) použito organické rozpouštědlo (nemísitelné s vodou), které tvoří jednu fází. Další fází tvoří jiné organické rozpouštědlo (mísitelné s vodou), které je použito na akceptorový roztok ve vláknu. Třetí fází tvoří vodný roztok s analytem. Tento systém je vhodný pro následnou LC analýzu na reverzních fázích nebo pro CE systémy. [63, 67]



**Obrázek č. 6:** Mikroextrakce pomocí dutého vlákna HF-LPME ve dvou možných provedeních – dvojfázovém nebo trojfázovém systému. Převzato a upraveno z [65].



Úprava pH je velmi důležitá, protože přes SLM projde pouze neionizovaná forma analytu. Proto je potřeba upravovat pH jak vzorku, tak akceptorového média. Dále můžeme k usnadnění extrakce přidat pomocnou látku, která bude tvořit neutrální komplex nebo hydrofobní iontový pár s analytem, který lépe prostoupí přes membránu (v případě polárnějších analytů). [66, 67]

Mezi parametry ovlivňující extrakci patří složení organického rozpouštědla nemísitelného s vodou použitého na membránu SLM, složení donorového a akceptorového roztoku a jejich pH, rychlost třepání roztoku či délka extrakčního času. [63, 66, 67]

SLM membrána je tvořena rozpouštědlem, které je v ideálním případě organické a nemísitelné s vodou, je hydrofobní, dále je pevně vázáno v pórech SLM, je málo těkavé a má nízkou viskozitu. Nejčastěji se používá toluen, 1-oktanol, dodecylacetát (DDA), isopentylbenzen či dihexylether (DHE). [66, 67]

Vlákno je většinou tvořeno polypropylenem, protože je hydrofobní a je kompatibilní s organickými rozpouštědly. [66, 67]

Jako hlavní výhoda této metody je velké přečištění vzorku, možnost zakoncentrování a malá spotřeba rozpouštědel. Mezi nevýhody patří dlouhý extrakční čas, nízká možnost automatizace a špatná komerční dostupnost. [67]

Protože je stálým trendem, aby byly metody více robustní, modifikací HF-LPME byly představeny následující metody – v roce 2013 metoda PALME v miniaturizovaném 96-jamkovém provedení. [65]

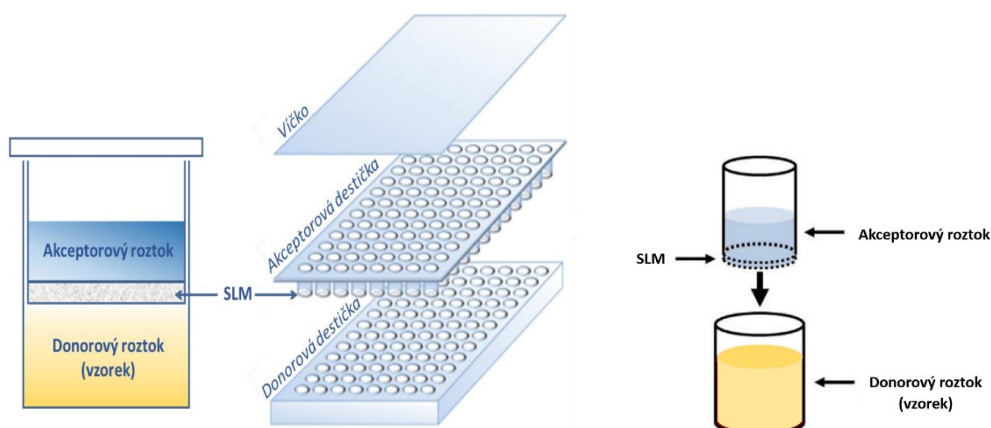
### *Paralelní extrakce pomocí syntetické kapalně membrány (PALME)*

Tato metoda tedy vznikla modifikací HF-LPME a byla představena v roce 2013. Extrakce probíhá pomocí donorové a akceptorové destičky, které jsou v 96-jamkovém formátu. Jednotlivé destičky obsahují donorový a akceptorový roztok, který dělí plochá membrána, která je na akceptorové destičce a tvoří ji porózní polyvinylidenfluoridový (PVDF) filtr, který je třeba aktivovat. Impregnací malým

množstvím organického rozpouštědla o objemu 3-5  $\mu\text{l}$  se filtr aktivuje na tekutou membránu SLM – tzv. supported liquid membrane (obrázek č. 7). [62, 66, 67, 68, 69]

Vzorek v donorové destičce smícháme s donorovým roztokem (úprava pH extrahovaných látek) a analyty projdou přes SLM do akceptorového roztoku pomocí pH gradientu pasivní difuzí. Po extrakci stačí odebrat akceptorový vzorek a dále jej analyzovat. Aby se akceptorový roztok neodpařoval, je akceptorová destička přikryta víkem z hliníkové fólie. Po celou dobu extrakce jsou destičky připevněny k třepačce. [68, 69]

Aby extrakce správně proběhla, je nutné dodržet stanovené objemy, aby došlo ke kontaktu analytu se SLM a analyt tak mohl přejít z donorového do akceptorového roztoku. Objem v donorové jamce by měl být okolo 200-250  $\mu\text{l}$  a v akceptorové jamce 50-100  $\mu\text{l}$ . SLM by měla být impregnována 3-5  $\mu\text{l}$  organického rozpouštědla. [68, 69]



**Obrázek č. 7:** Uspořádání extrakce PALME. Převzato a upraveno z [68, 70].

U této extrakce je také velmi důležité, aby byl analyt v neionizované formě a aby pH akceptorového roztoku bylo nastaveno tak, aby v něm byl analyt ionizován a přešel tak z donorového roztoku přes SLM do akceptorového roztoku. Pokud by analyt v akceptorovém roztoku nebyl ionizován, hrozilo by, že by se analyt zpátky extrahoval do donorového roztoku. [68, 69]

Pokud extrahujeme analyt z biologické matrice, je k donorovému roztoku přidáván pufr, který zajistí neutrální prostředí a analyt tak zůstane v neionizované

formě. Pro úpravu pH akceptorového roztoku je v případě chtěného kyselého prostředí přidávána kyselina chlorovodíková nebo kyselina mravenčí, v případě bazického prostředí roztok hydroxidu sodného. [68, 69]

U kyselých analytů se jako organické rozpouštědlo pro SLM používá dihexylether, isopentylbenzen nebo 2,2-dimethyl-1-propylbenzen. U bazických analytů se používají jako organické rozpouštědlo dodecylacetát, isopentylbenzen, n-hexadekan nebo dihexylether. [68, 69]

Pokud potřebujeme i zde zvýšit extrakční účinnost polárnějších látek, můžeme zde také přidat pomocnou látku jak do donorového roztoku, tak do organického rozpouštědla (které impregnuje SLM), která díky vytvoření vhodného prostředí pomůže analytu přestoupit přes SLM membránu u polárnějších analytů. Proto se někdy k rozpouštědlu pro SLM přidává di(ethylhexyl)fosfát (DEHP). [68, 69]

Mezi parametry ovlivňující extrakci patří složení organického rozpouštědla nemísitelného s vodou použitého na membránu SLM, složení donorového a akceptorového roztoku, jejich pH, rychlost třepání roztoku či délka extrakčního času. [68, 69]

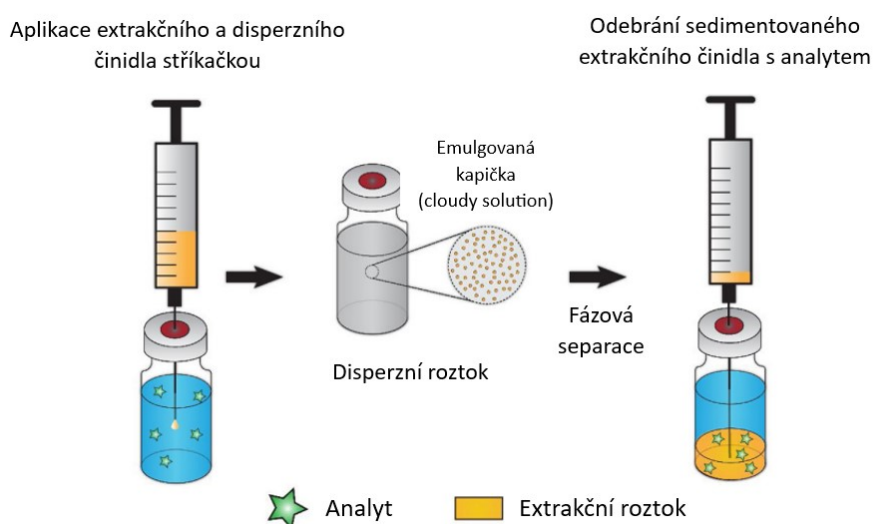
Mezi výhody patří úprava velkého množství vzorků, snadná manipulace, komerční dostupnost, přečištění vzorku a odstranění velkých molekul (proteinů či fosfolipidů). Mezi nevýhody ale pořád patří dlouhý extrakční čas. [68, 69]

### *Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME)*

Tato metoda byla poprvé popsána v roce 2006 a tvoří ji směs extrakčního činidla (organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou, např. chloroform, dichlormethan, tetrachlormethan) a disperzního činidla (rozpuštědlo mísitelné s vodným vzorkem i s extrakčním činidlem, např. methanol, aceton či acetonitril) ve stříkačce se zkoumaným vzorkem, kdy vznikne disperzní roztok (obrázek č. 8). Objem disperzního činidla by měl být vždy vyšší než objem extrakčního činidla, aby bylo extrakční činidlo dostatečně dispergované ve vodném roztoku. V roztoku se vytvoří emulgovaná kapička (tzv. cloudy solution), která má velký mezifázový

povrch. Následně směs vložíme do centrifugy, a poté odebereme roztok s extrahovaným analytem v podobě sedimentovaného extrakčního činidla obsahující organickou fází. Vzorek pak můžeme rovnou analyzovat pomocí GC instrumentace nebo LC systému na normálních fázích, anebo ještě dále upravit odpařením či rekonstitucí v rozpouštědle, ve kterém je následně vzorek analyzován. Jako extrakční činidlo se většinou používá dichlormethan, chloroform nebo brombenzen. [14, 62, 64, 65, 66]

Mezi hlavní nevýhodu této metody patří to, že musíme pečlivě vybrat extrakční rozpouštědlo, které je mísitelné s disperzním činidlem, není mísitelné s vodou a má schopnost extrahovat analyt. Další nevýhodou je fakt, že i když jde o miniaturizovanou extrakční metodu, je zde poměrně velká spotřeba rozpouštědel. [64, 65]



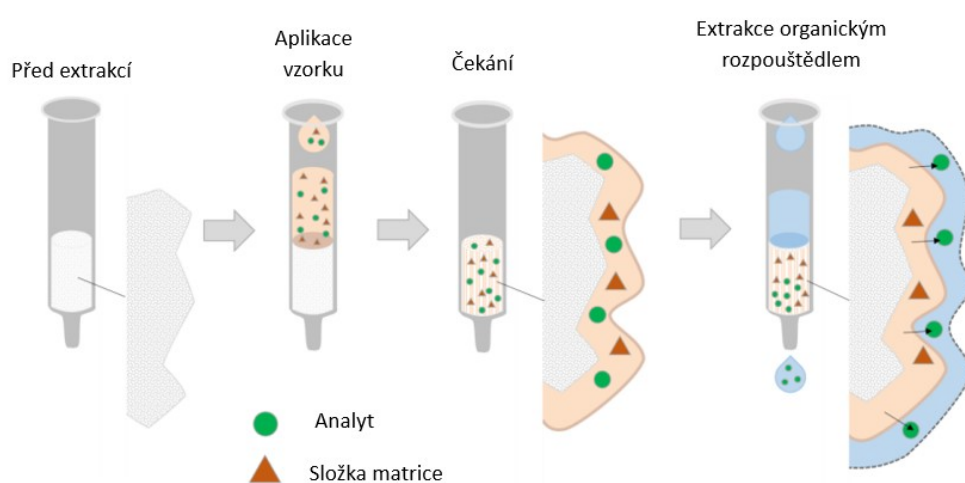
**Obrázek č. 8:** Princip disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny. Převzato a upraveno z [65].

### *Extrakce z kapaliny do kapaliny s využitím sorbentu (SLE)*

Tato metoda je modifikovaná LLE, kdy je extrakce podpořena pevnou fází, kterou tvoří sorbent. Sorbent je zpravidla inertní, má velkou plochu a je nejčastěji tvořen křemelinou. Nejdříve aplikujeme analyt do kolonky se sorbentem, kde obě složky necháme spolu interagovat. Poté přidáme do kolonky extrakční činidlo

charakteru organického rozpouštědla nemísitelného s vodou, které oddělí a uvolní navázaný analyt od sorbentu. Analyt je poté eluován z kolonky (obrázek č. 9). Pro analýzu v GC a LC na normálních fázích je možné vzorek přímo analyzovat. Pro analýzu v LC systému na reverzních fázích je potřeba extrakt před analýzou ještě odpařit a poté rekonstituovat v dále potřebném rozpouštědle. [71, 72]

Mezi výhody patří menší spotřeba rozpouštědel, malé množství vzorku, dobré přečištění vzorku od fosfolipidů, nehrozí zde tvorba emulzí, je zde vysoká účinnost, je relativně rychlá a také možná automatizace pomocí 96-jamkového formátu. [71, 72]



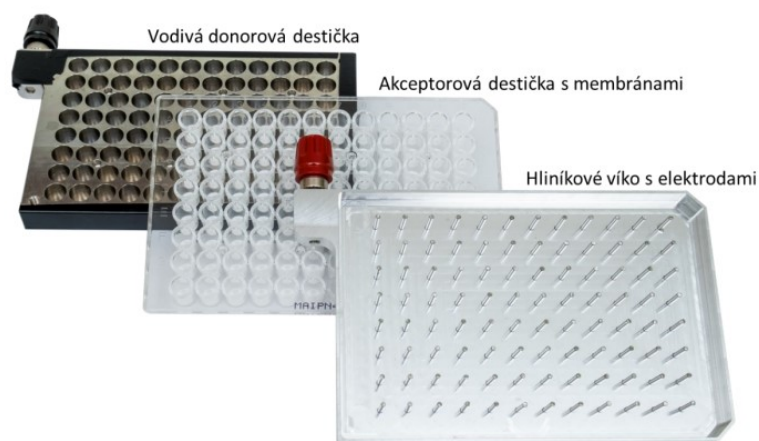
**Obrázek č. 9:** Princip extrakce z kapaliny do kapaliny s využitím sorbentu (extrakce podpořena tuhou fází). Převzato a upraveno z [72].

## 2.5. Elektromembránová extrakce

Tato metoda byla představena Pedersen-Bjergaardem a Rasmussenem v roce 2006 a vznikla modifikací HF-LPME, kdy duté vlákno je ponořeno do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou, které je ukotveno na kapalně membráně a do systému je vložena elektrokinetická složka. Elektrokinetickou složku tvoří vkládané napětí, které v systému generuje proud a ten způsobí elektrokinetickou migraci analytu. Analyt se pomocí správně zvoleného pH ionizuje a projde přes kapalnou membránu (SLM) z donorového do akceptorového roztoku. Jde tedy o trojfázový systém, který je tvořen donorovým roztokem obsahující vzorek,

organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou ukotveným na membráně a vodným akceptorovým roztokem. Jde o hybridní techniku, která spojuje extrakci z kapaliny do kapaliny a elektroforézu. [75]

V našem případě byla použita elektromembránová extrakce v 96-jamkovém provedení (obrázek č. 10). Toto uspořádání bylo představeno v roce 2016 a tato instrumentace umožňuje extrahovat analyty z většího počtu vzorků najednou. [75]



**Obrázek č. 10:** Elektromembránová extrakce v 96-jamkovém uspořádání. Převzato z [86].

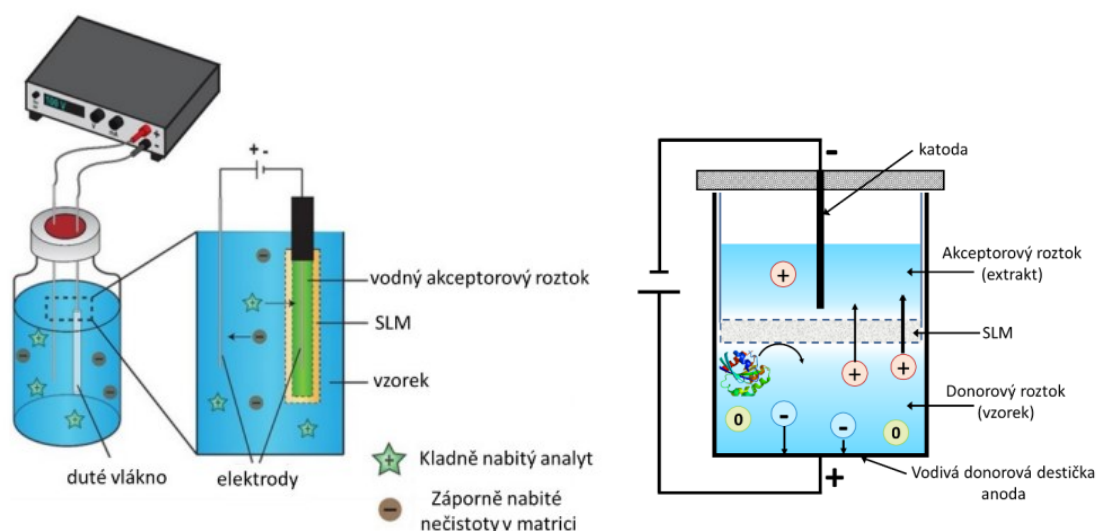
### 2.5.1. Princip metody

Změna oproti výše zmíněným metodám je ta, že aby analyt prošel přes SLM, musí být v ionizované formě. Migrace ionizovaného analytu přes kapalnou membránu SLM je tedy hlavním principem této metody. Do systému se vloží napětí pomocí elektrod, které v systému generují proud a ten způsobí migraci ionizovaného analytu z donorového do akceptorového roztoku (obrázek č. 11). [67, 73, 77]

Do systému jsou zapojeny dvě elektrody, kdy jedna je připojena k donorové destičce a druhá k akceptorové destičce. Elektrody se zapojí v tom pořadí, zda se jedná o kyselý či bazický analyt. Kyselé analyty jsou extrahovány jako anionty a bazické analyty extrahovány jako kationty. Důležité je tedy nastavit pH tak, aby byl analyt ionizován. V případě kyselého analytu je záporně nabitá katoda připojena k donorové

destičce a kladně nabitá anoda připojena k akceptorové destičce. V případě bazických látek je to naopak a kladně nabitá anoda je připojena k donorové destičce a záporně nabitá katoda je připojena k akceptorové destičce. [73, 74, 78]

V našem případě jsme amfetaminy a katinony extrahovali ve formě kationtů, proto jsme museli optimalizovat pH donorového i akceptorového roztoku. [74, 76, 80]



**Obrázek č. 11:** Zobrazení principu elektromembránové extrakce. Převzato a upraveno z [65].

## 2.5.2. Extrakční parametry

Mezi parametry ovlivňující extrakci patří složení organického rozpouštědla nemísitelného s vodou použitého na kapalnou membránu, složení donorového a akceptorového roztoku, rychlost třepání, délka extrakčního času, a hlavně velikost vkládaného napětí. [75, 76]

### *Složení donorového a akceptorového roztoku*

U této metody je důležité, aby byl analyt plně ionizován a poté v této formě extrahován. Toho docílíme správně zvoleným pH donorového a akceptorového roztoku. [73, 74, 76]

Dále musíme myslet na množství daných roztoků, které jsou limitované velikostí jamky. Donorová jamka by měla obsahovat 200–250  $\mu\text{l}$  roztoku (vzorek+donorový roztok) a akceptorový roztok by měl mít objem okolo 100  $\mu\text{l}$ . [73, 76]

### *SLM*

Membrána je tvořena hydrofobní materiálem, nejčastěji polypropylenem nebo polyvinylidenfluoridem s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ , a je potřeba ji impregnovat 3-5  $\mu\text{l}$  organickým rozpouštědlem. Toto organické rozpouštědlo tvoří kapalnou membránu, tzv. SLM (supported liquid membrane). Volba organického rozpouštědla je velmi důležitá a musí splňovat tyto požadavky – aby bylo nemísitelné s vodou, mělo vysoký bod varu, nebylo těkavé, mělo nízkou viskozitu, bylo hydrofobní, aby bylo ukotveno na porózní filtr SLM a také aby usnadňovalo přestup ionizovaného analytu z donoru do akceptoru. [73, 74, 76, 79, 85]

Pro kyselé látky se jako organická rozpouštědla používají alifatické alkoholy, např. 1-oktanol, 1-nonanol. Pro bazické látky je nejpoužívanější 2-nitrofenyloktylether (NPOE), pro polárnější bazické látky 2-nitrofenylpentylether (NPPE), který má nižší vnitřní hydrofobicitu. [73, 74]

Pokud potřebujeme zvýšit extrakční účinnost u polárnějších látek, je vhodné použít rozpouštědla vhodnější pro polárnější látky nebo je lze přidat k používanému rozpouštědлу. [76, 79]

Pro polárnější kyselé látky se přidává rozpouštědlo cetyltrimethylammonium bromid. Pro polárnější bazické látky se dává přírůdek bis(2-ethylhexyl)fosfitu (DEHPi), di(ethylhexyl)fosfátu (DEHP), tris(2-ethylhexyl)fosfátu (TEHP) nebo tributylfosfátu (TBP). Tyto rozpouštědla pomáhají tvořit s analytem komplex pomocí iontových vazeb – tvořením vodíkových vazeb nebo vazby dipól–dipól. Analyt pak lépe projde přes SLM a usadí se tak extrakce polárnějších látek. [76, 85]



## *Množství vkládaného napětí*

Vložením stejnosměrného napětí do systému pomocí elektrod se v systému generuje proud. Při zvýšení napětí se zvýší i pohyb ionizovaného analytu přes membránu. Proto se napětí optimalizuje vždy až na konkrétním organickém rozpouštědle, které je ukotveno na kapalně membráně. Při použití vysokého napětí za účelem zvýšení extrakční účinnosti však může vzniknout vysoký proud, který způsobí elektrolýzu. V roztoku se začnou tvořit bubliny, kdy dojde k přerušení kontaktu donorového roztoku (vzorek) s membránou. To způsobí přerušení extrakce analytu z donorového roztoku do akceptorového roztoku, sníží se tak účinnost a bude snížena i opakovatelnost. Dále se také může změnit pH u daných roztoků, protože dojde k nahromadění iontů, kdy u katody bude zvýšené pH a u anody snížené pH díky nahromaděným  $H^+$  iontům. [73, 76]

U elektromembránové extrakce v 96-jamkovém provedení by měl být optimálně generovaný proud okolo 20-30  $\mu A$  na jamku. Proud nad 50  $\mu A$  na jamku zvyšuje riziko elektrolýzy. Díky vkládanému napětí dochází ke značnému zkrácení extrakčního času. [78, 81]

## 2.6. Validace bioanalytických chromatografických metod

Když se nám podaří optimalizovat extrakční podmínky, potřebujeme danou metodu otestovat, zda je metoda vhodná pro extrakci amfetaminů a vybraných kationů ze smolky a zda poskytuje spolehlivé výsledky s definovanou jistotou. To se provádí pomocí procesu, který se nazývá validace. Při validaci bioanalytických metod se řídíme danými směrnici, které byly vydány autoritami FDA nebo EMA, které prokážou, že je daná metoda použitelná pro kvantitativní hodnocení zkoumaného analytu v dané biologické matrici. [87, 88]

Obě agentury vydaly návody, kterými se při validaci můžeme řídit a mají charakter doporučení, které nemají právní závaznost. EMA vydala Guideline on bioanalytical method validation a FDA Guidance for industry – Bioanalytical method validation. Oba tyto návody jsou podobné, avšak jednotlivá kritéria validačních parametrů se mohou lišit nebo je na ně kladen jiný důraz. [87, 88]

Pro tuto extrakční metodu byla použita validační směrnice vydána autoritou FDA. Guidance for industry – Bioanalytical method validation je tedy souhrn doporučení, která obsahují jednotlivé validační parametry, jejich význam a různá kritéria, kterými se stanovují, ale mohou být i lehce modifikovány dle specifického typu bioanalytické metody. [87, 88]

Z pohledu FDA může být validace celková (zahrnuje celý proces validace), částečná (změna již zavedené metody, kdy se nemusí opakovat celý proces validace) nebo cross-validace (srovnání výsledků dvou a více bioanalytických metod vycházejících ze stejného návodu). [87] Validační směrnice FDA zahrnuje tyto validační parametry:

### *Citlivost*

Citlivost nám vyjadřuje limit kvantifikace – LLOQ. LLOQ tedy tvoří nejnižší bod kalibrační křivky, který popisuje nejnižší koncentrační bod, který lze metodou spolehlivě kvantifikovat s přijatelnou mírou přesnosti a preciznosti. LLOQ stanovíme tak, aby byl alespoň 5× vyšší než signál v nulovém vzorku, což je vzorek prázdné matrice s přidavkem vnitřního standardu. [88]

### *Selektivita*

Selektivitu můžeme charakterizovat jako odpověď detektoru v daných retenčních časech analytu a vnitřního standardu. Je to schopnost metody, jak správně umí rozlišit a přesně kvantifikovat náš analyt v přítomnosti dalších látek také extrahovaných ze složité matrice. Prokazuje se analýzou 6 vzorků prázdné biologické matrice (blanku) z různých zdrojů. Detekovaný signál v těchto vzorcích nesmí být vyšší než 20 % LLOQ u analytů a 5 % u vnitřních standardů. [88]

## *Linearita*

Linearitu můžeme popsat jako jakési ověření odezvy v předem definovaném koncentračním rozsahu danou kalibrační přímkou. Kalibrační přímka by měla obsahovat nejméně 6 kalibračních bodů, které jsou připraveny přidavkem standardu analytu do blankové matrice. Poté provádíme zpětné přepočítávání koncentrace z kalibrační přímky na základě zvoleného modelu, kde minimálně 75 % kalibračních standardů a alespoň 6 bodů musí odpovídat  $\pm 15 \%$  nominální koncentraci, u LLOQ  $\pm 20 \%$  nominální koncentraci. Daná linearita by měla být opakovatelná a provádí se obvykle pomocí lineární regrese. Lineární závislost by měla být kontinuální a reprodukovatelná. [88]

## *Přesnost a preciznost*

Přesnost, někdy uváděna jako správnost, je procentuální odchylka naměřené hodnoty od hodnoty referenční nominální koncentrace. Je hodnocena jako průměr hodnot na vybrané koncentrační hladině. Preciznost můžeme charakterizovat jako blízkost stanovení jednotlivých vzorků o stejné koncentraci vyjádřenou jako variační koeficient, který odpovídá relativní směrodatné odchylce. Měříme alespoň 5 vzorků na minimálně 4 koncentračních hladinách, které pokrývají celou kalibrační přímkou (LLOQ, nízká, střední a vysoká koncentrace z kalibrační křivky). [88]

Jak u přesnosti, tak u preciznosti je limit  $\pm 15 \%$  a u LLOQ  $\pm 20 \%$ . Pro správné ověření musí proběhnout alespoň 3 analýzy ve dvou různých dnech. Přesnost a preciznost se dá měřit jako inter-day, kdy jsou oba tyto parametry měřeny během jednoho dne anebo intra-day, kdy jsou parametry měřeny ve více dnech. Dále můžeme přesnost a preciznost měřit během jednoho analytického cyklu, tomu říkáme within-run (krátkodobá) nebo between-run (dlouhodobá), kdy je přesnost a preciznost měřena během více analytických cyklů. Celkově jsou však nutné alespoň 3 analytické cykly ve 2 různých dnech. [88]

## *Výtěžnost*

U výtěžnosti jde o porovnání analytické odpovědi (plochy píku) vzorku matrice se známým množstvím přídavku vnitřního standardu před samotnou extrakcí ku odpovědi vzorku připraveného přidáním stejného množství standardu do analytu prázdné matrice (blanku) po extrakci, která se udává v procentech. Výtěžnost se provádí na 3 koncentračních hladinách kalibračního rozsahu – na hladině nízké, střední a vysoké. Pro každou hladinu alespoň  $n=6$ . Výtěžnost nemusí být 100 %, ale musí být konzistentní, efektivní a opakovatelná. [88]

## *Matricové efekty*

Dalším velmi důležitým parametrem v případě LC-MS analýzy jsou matricové efekty, které jsou nežádoucí a jsou časté při ionizaci elektrosprejem. Dochází k nim při současné eluci interferujících látek z biologické matrice, kdy jde nejčastěji o fosfolipidy, soli či peptidy a mohou tím ovlivňovat ionizaci daného analytu. Matricové efekty tak mohou buď snižovat nebo zvyšovat intenzitu signálu analytu. [87]

Matricové efekty jsme hodnotili pomocí směrnice EMA, která udává, že bychom je měli zjišťovat pomocí analýzy 6 vzorků biologické matrice z různých zdrojů na 2 koncentračních hladinách – nízké a vysoké. Při hodnocení je porovnáván poměr plochy píku blankové matrice spikované po extrakci ku ploše píku standardního roztoku analytu. Matricové efekty se vyhodnocují pro každou sloučeninu zvlášť pomocí normalizace na vnitřní standard. Limitem je variační koeficient, který by měl být v rozmezí  $\pm 15$  %. [87]

## *Přenos*

Přenos neboli carry-over byl stejně jako matricové efekty hodnocen dle směrnice EMA, která na rozdíl od FDA směrnice udává, jak přenos hodnotit včetně požadovaných limitů. Dle této směrnice je to hodnoceno tak, že po vzorku

s nejvyšší koncentrací analytu necháme nastříknout vzorek prázdné matrice. Detekovaný signál by neměl být vyšší než 20 % u LLOQ a 5 % u vnitřních standardů. Tento parametr je důležitý hlavně proto, aby přenos neměl vliv na přesnost a preciznost metody. [87]

### 3. Cíle práce

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací extrakčních podmínek elektromembránové extrakce v miniaturizovaném 96-jamkovém uspořádání pro separaci vybraných amfetaminů a syntetických katinonů z novorozenecké smolky.

Mezi hlavní cíle patří:

- Vývoj a optimalizace podmínek elektromembránové extrakce
- Validace
- Analýza reálného vzorku smolky

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité chemikálie

Kyselina mravenčí, acetonitril a methanol (měli požadovanou LC-MS čistotu), 2-nitrofenyl(oktyl)ether (NPOE), 2-nitrofenyl(pentyl)ether (NPPE), bis(2-ethylhexyl)fosfit (DEHPi), 1-ethyl-2-nitrobenzen (ENB), 1-undekanol, eutektické směsi tvořené z levometholu, kafru, kumarinu a thymolu byly objednány od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Dále byly použity zásobní methanolvé roztoky amfetaminů o koncentraci 1 mg/ml (konkrétně AMF, MAMF, MDMA) a jejich deuterované vnitřní standardy ( $d_5$ -AMF,  $d_{11}$ -MAMF,  $d_5$ -MDMA) také od firmy Merck.

Zásobní methanolvé roztoky kationů o koncentraci 0,5 mg/ml (flefedron, methylon, ethylon, bufedron, butylon, mefedron, 4-MEC, pentedron, pentylon,  $\alpha$ -PVP, MDPV,  $\alpha$ -PHP, 3-CMC) a deuterované vnitřní standardy ( $d_7$ -mefedron,  $d_8$ -MDPV) nám byly poskytnuty z Laboratoře forenzní analýzy biologicky aktivních látek z VŠCHT v Praze.

Použitá voda na ředění roztoků byla vyrobena z kohoutkové vody ultrafiltrací pomocí ultrafiltračního systému Millipore (Merck-Millipore, Darmstadt, Německo).

### 4.2. Příprava roztoků a pufřů

Pracovní roztoky analytů byly připraveny naředěním výše uvedených dodaných zásobních methanolvých roztoků jednotlivých analytů amfetaminů, syntetických kationů a jejich vnitřních standardů na požadovanou koncentraci. Takto připravené roztoky jsme uchovávali při - 20 °C.

Pro mobilní fázi byla připravena 0,1% kyselina mravenčí, kterou jsme připravili naředěním kyseliny mravenčí ultračistou vodou. Donorové a akceptorové roztoky byly připraveny naředěním kyseliny mravenčí ultračistou vodou na tyto požadované

koncentrace: 20 mM kyselina mravenčí, 1% kyselina mravenčí, 1% kyselina mravenčí s přídavkem 10 % methanolu (pouze do donorové fáze) a 5% kyselina mravenčí.

Jako organická rozpouštědla na kapalnou membránu byly připraveny směsi organických látek NPOE:DEHPi=1:1 (m/m), NPPE:DEHPi=1:1 (m/m) a ENB:1-udekanol=1:1 (V/V). Dále byly připraveny také eutektické směsi kafr:menthol=1:1 (m/m), kumarin:thymol=2:1 (m/m), kumarin:thymol=1:2 (m/m) a kumarin:thymol=1:1 (m/m). Eutektické směsi (DES) jsme připravovali tak, že jsme si nejprve navázili potřebné množství látky na analytických váhách v požadovaném poměru, poté jsme směs zahřáli na 80 °C ve vodní lázni a nechali na dané teplotě 15 minut. Poté jsme směs 10 sekund vortexovali. [85]

### 4.3. Smolka

Všechny blankové vzorky novorozenecké smolky byly získány v rozmezí 24-72 hodin po narození novorozence. Tyto vzorky byly od odebrání uchovávány ve zmrazeném stavu. V této práci jsme také analyzovali jeden reálný vzorek z Nemocnice Příbram. Ve všech případech se jednalo o klinické vzorky, které již byly analyzovány a byly určeny k likvidaci.

### 4.4. UHPLC-MS/MS

Analýzu jsme prováděli metodou UHPLC-MS/MS na přístroji Agilent 1290 Infinity II LC s trojitým kvadrupólem LC/MS 6400 sérií s využitím elektrospeje Jet Stream v pozitivním módu a softwaru MassHunter (Agilent). Hmotnostní spektrometr měl automatické ladění. Jako analytická kolona byla používána C18 Luna Omega Polar (100 × 2,11 mm, 1,6 μm), (Phenomenex, USA) při nastavené teplotě 30 °C.



## 4.5. EME

U této extrakční techniky jsme použili elektromembránovou extrakci v 96-jamkovém provedení, které se skládalo z nerezové vodivé donorové destičky s elektrodou, plastové akceptorové destičky s membránami (polyvinylidenfluorid, velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ ) a hliníkového víka s elektrodami (Millipore Ltd, Carrigtowhill, Irsko).

Napětí bylo do systému vloženo pomocí dvou elektrod (ES 0300-0,45, Delta Elektronika BV, Zierikzee, Nizozemí). To v destičce generovalo proud, který jsme kontrolovali pomocí připojeného ampérometru (Multimetr Fluke 287, Fluke, Everett, WA, USA).

Po celou dobu extrakce byla destička třepána rychlostí 1050 otáček za minutu pomocí zařízení Vibramax 100 (Heidolph, Kellheim, Německo).

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. UHPLC-MS/MS

Pro analýzu byla použita již optimalizovaná metoda, která byla původně vyvinuta pro analýzu amfetaminů a vybraných kationů v mateřském mléce. [81] Mobilní fáze byla 0,1% kyselina mravenčí s acetonitrilem v gradientovém módu s průtokovou rychlostí 0,3 ml/min. Pro kvantifikaci jsme použili izotopicky značené standardy d<sub>5</sub>-AMF, d<sub>11</sub>-MAMF, d<sub>5</sub>-MDMA, d<sub>7</sub>-mefedron a d<sub>8</sub>-MDPV (tabulka č. 1).

**Tabulka č. 1:** SRM přechody jednotlivých analytů a vnitřních standardů.

Analyt	Prekurzorový ion [Da]	Produktový ion [Da]	Kolizní energie [eV]	Vnitřní standard
AMF	136,1	119,1	8	AMF-d <sub>5</sub>
		91,1	20	
MAMF	150,1	119,1	8	MAMF-d <sub>11</sub>
		91	24	
MDMA	194,1	163	12	MDMA-d <sub>5</sub>
		105	28	
Flefedron	182	164,1	12	AMF-d <sub>5</sub>
		149	24	
Methylon	208	160	20	AMF-d <sub>5</sub>
		132,1	32	
Ethylon	222,1	174,1	20	AMF-d <sub>5</sub>
		91,1	48	
Bufedron	178	131,1	24	AMF-d <sub>5</sub>
		91	32	
Butylon	222	146,1	32	MDMA-d <sub>5</sub>
		131,1	44	
Mefedron	178,1	145,1	24	MDMA-d <sub>5</sub>
		91	40	
4-MEC	192,1	174,1	12	MDMA-d <sub>5</sub>
		144,1	36	
Pentedron	192	132,1	20	MDMA-d <sub>5</sub>
		91	28	
Pentylon	236	188,1	20	MDMA-d <sub>5</sub>
		175,1	24	
α-PVP	232,1	105	32	MDPV-d <sub>8</sub>
		91	28	
MDPV	276,1	175,1	24	MDPV-d <sub>8</sub>
		126,1	32	
α-PHP	246,2	140,1	28	MDPV-d <sub>8</sub>
		91,1	28	
AMF-d <sub>5</sub>	141,1	124,1	8	
		96,1	16	
MAMF-d <sub>11</sub>	161,2	127,1	12	
		97,1	24	
MDMA-d <sub>5</sub>	199,1	165,1	12	
		107	28	
Mefedron-d <sub>7</sub>	285	152	30	
		149	30	
MDPV-d <sub>8</sub>	284,1	183	28	
		213,1	28	
		134	28	

## 5.2. Optimalizace metody EME

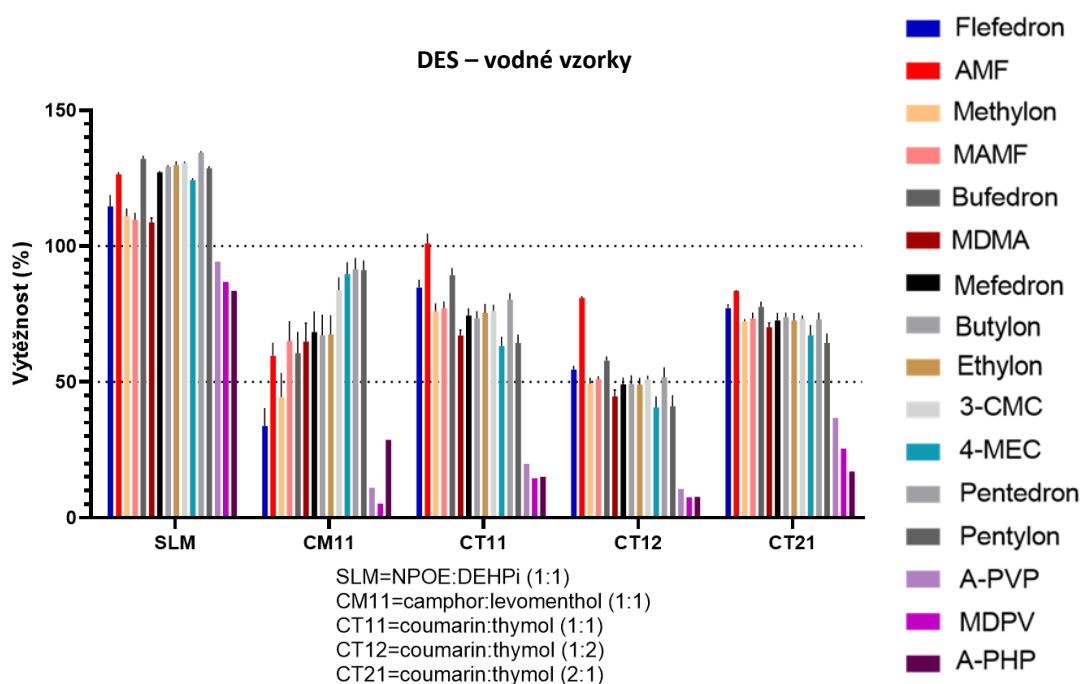
Při optimalizaci extrakčních podmínek pro stanovení amfetaminů a syntetických kationů ze smolky jsme vycházeli z publikace, která byla vyvinuta na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové a VŠCHT v Praze, která se zabývala elektromembránovou extrakcí amfetaminů a kationů z mateřského mléka. [81] Jejich finální extrakční podmínky, které byly následně zvalidovány byly následující: jako SLM byly použity 3  $\mu\text{l}$  organického rozpouštědla NPOE:DEHPi v poměru 1:1 (m/m), pro donorový a akceptorový roztok byla vybrána 20mM kyselina mravenčí (kdy v donorovém roztoku bylo 110  $\mu\text{l}$  20mM HCOOH s 125  $\mu\text{l}$  vzorku mateřského mléka se sledovanými analyty a v akceptorovém roztoku bylo 100  $\mu\text{l}$  20mM HCOOH), intenzita třepání 1050 ot/min, vkládané napětí 30V, délka extrakce 20 minut.

### 5.2.1. Optimalizace složení SLM

Při optimalizaci je velmi důležité vybrat organické rozpouštědlo, které objemem 3  $\mu\text{l}$  impregnujeme membránový filtr, ze kterého vznikne kapalná membrána. Nejprve jsme zkusili použít NPOE v kombinaci s DEHPi hmotnostně v poměru 1:1, jež bylo optimalizované pro extrakci stejných analytů z mateřského mléka. [81] Výťažnost ze smolky nebyla tak vysoká, jakou jsme si představovali, a tak jsme zkusili zvolit jiná organická rozpouštědla, která by byla vhodnější.

Zkusili jsme rozpouštědla, která by byla vhodná kvůli své ekologičnosti a zkusili jsme nejprve použít eutektické směsi. Nejprve jsme vyzkoušeli kombinaci kumarin s thymolem v poměru 2:1 (n/n) a levomenthol s kafrem v poměru 1:1 (n/n). Směs levomentholu s kafrem nám bohužel krystalizovala jak v pipetovacích plastových špičkách, tak i na membráně. Později nám začala krystalizovat i druhá eutektická směs obsahující kumarin s thymolem. Dle publikace, kde také používali eutektické směsi jako SLM, byl použit kumarin s thymolem, avšak v jiných poměrech, proto jsme vyzkoušeli kumarin s thymolem ještě v poměru 1:2 a 1:1 (vždy n/n). [85] Jako nejlepší se jevil poměr kumarin s thymolem 1:1 (n/n), avšak výťažnost byla oproti použití NPOE s DEHPi 1:1 (m/m) nižší (obrázek č.12). Z tohoto důvodu

jsme eutektické směsi zkoušeli pouze na vodných vzorcích analytů (bez smolkové matrice).

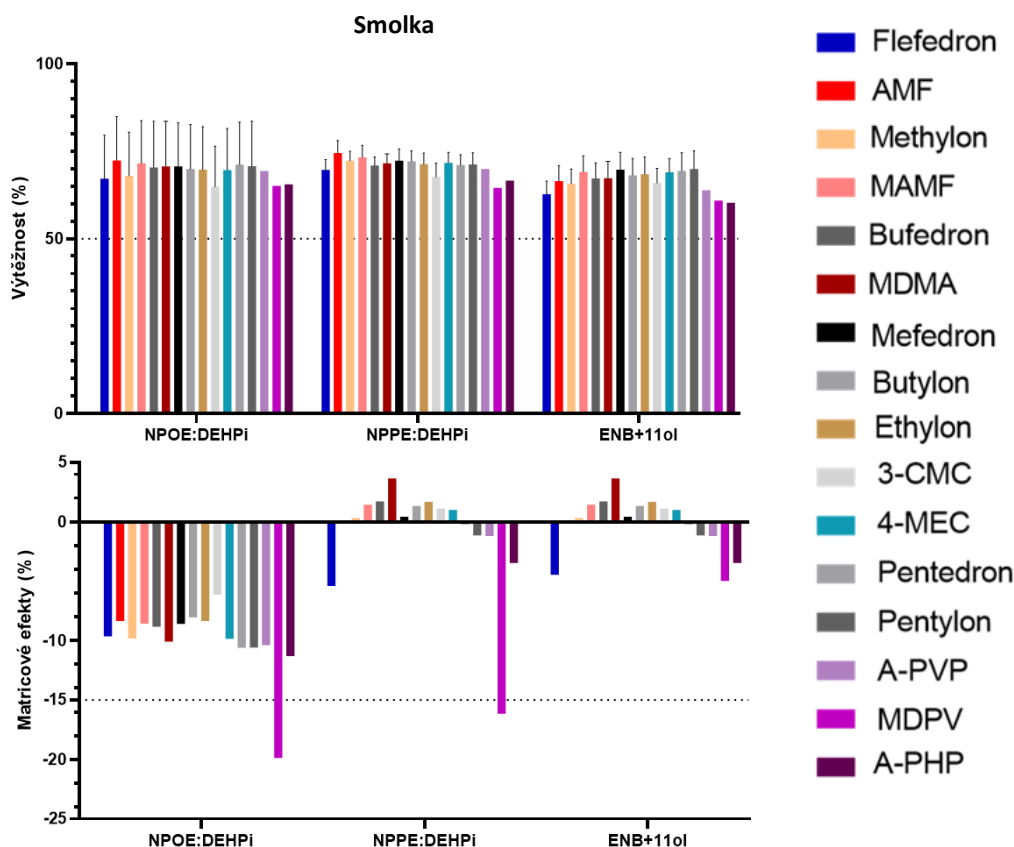


**Obrázek č. 12:** Srovnání výtěžnosti analytů ve vodných vzorcích při použití SLM směs NPOE:DEHPi (1:1, m/m), kafr:levomenthol (1:1, n/n), kumarin:thymol (1:1, n/n), kumarin:thymol (1:2, n/n), kumarin:thymol (2:1, n/n).

Protože jsme s výtěžností nebyli spokojeni, vyzkoušeli jsme další směs organických rozpouštědel, které byly použity v publikaci [79]. Zkoušeli jsme srovnat NPOE:DEHPi (1:1, m/m), NPPE:DEHPi (1:1, m/m) a ENB:1-undekanol (1:1, V/V). NPPE oproti NPOE vykazuje nižší vnitřní hydrofobicitu a tak by měl být vhodnější pro polárnější analyty. ENB je také méně hydrofobní než směs NPOE:DEHPi, proto by mohl být výhodnější pro použití pro více polární látky. [79] Po vyzkoušení těchto směsí organických rozpouštědel na SLM se ukázalo, že NPPE není vhodný, protože extrakce nebyly opakovatelné a pozorovali jsme velké relativní směrodatné odchylky.

Nejlepší výtěžnost a nejnižší matricové efekty jak ve vodných vzorcích, tak ve smolkových vzorcích byly získány při použití kombinace ENB

s 1-undekanolem v objemovém poměru 1:1 (obrázek č. 13). Výhodné pro tuto směs rozpouštědel je to, že ENB jako aromatická část je ve směsi s 1-undekanolem, který tvoří nearomatickou část. Toto spojení je výhodné v tom, že aromatická část reaguje s ionizovaným analytem pomocí  $\pi$  - interakcí a nearomatická část pomocí tvorby vodíkových vazeb. [79]



**Obrázek č. 13:** Srovnání výtěžnosti a maticových efektů při použití těchto rozpouštědel na SLM: NPOE:DEHPi (1:1, m/m), NPPE:DEHPi (1:1, m/m) a ENB:1-undekanol (1:1, V/V).

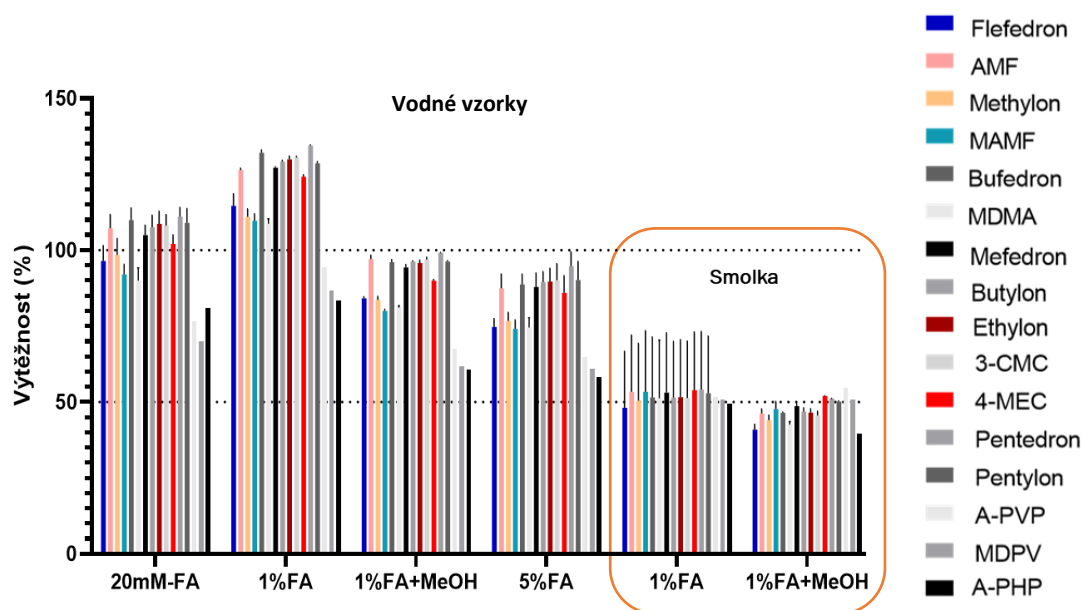
### 5.2.2. Optimalizace složení donorové a akceptorové fáze

Během optimalizace vhodného rozpouštědla pro SLM jsme zároveň zkoušeli optimalizovat i složení donorové a akceptorové fáze. Nejprve jsme vycházeli z publikace u extrakce z mateřského mléka a použili jsme 20 mM kyselinu mravenčí, která odpovídala pH 2,74. [81] Jelikož jsou amfetaminy a katinony bazické látky,

zkusili jsme použít prostředí s nižším pH. Zkoušeli jsme 1% kyselinu mravenčí (pH 2,17) a 5% kyselinu mravenčí (pH 2,52). Největších výtěžností jsme dosahovali při nejnižším zvoleném pH (2,17), které odpovídalo 1% kyselině mravenčí, kterou jsme přidali jak do donorového, tak do akceptorového roztoku.

Protože jsme chtěli dosáhnout ještě vyšší výtěžnosti, zkoušeli jsme do donorového roztoku k 1% kyselině mravenčí přidat 10 % methanolu. Přídavek methanolu by měl snížit případnou vazbu bazického analytu buď se smolkovou maticí, anebo pokud by byl analyt zadržován na membráně. Ukázalo se však, že přídavek 10 % methanolu do donorové fáze nám nevedl ke zlepšení výtěžnosti a také nám v systému generoval vysoký proud, u kterého hrozí vznik elektrolýzy, která by také vedla k nižším výtěžnostem. [68]

Nejlepší výtěžnosti tedy byly u 1% kyseliny mravenčí v roztocích jak donoru, tak akceptoru (obrázek č. 14).

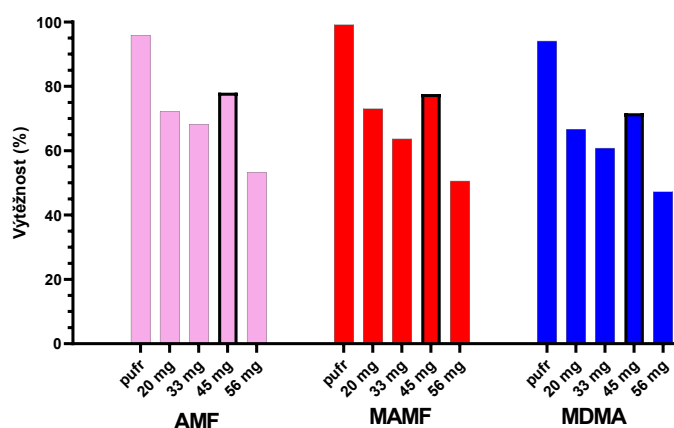


**Obrázek č. 14:** Srovnání výtěžností při použití do donorového a akceptorového roztoku: 20 mM kyseliny mravenčí, 1% kyseliny mravenčí, 1% kyseliny mravenčí (s přídavkem 10 % methanolu pouze do donorové fáze), 5% kyseliny mravenčí ve vodných vzorcích. Dále ve smolkových vzorcích použití 1% kyseliny mravenčí a 1% kyseliny mravenčí s přídavkem 10 % methanolu (pouze do donorové fáze).

Množství donorového a akceptorového roztoku je dáno velikostí jamky, kdy objem donorové jamky je okolo 200-250  $\mu\text{l}$  a objem akceptorové jamky 50-100  $\mu\text{l}$ . [75] Do donorové fáze tedy patřil vzorek smolky se 180  $\mu\text{l}$  1% kyseliny mravenčí a v akceptorové fázi bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  1% kyseliny mravenčí.

### 5.2.3. Množství smolky

Dále jsme také srovnávali závislost množství vzorku smolky na výtěžnosti. Zkoušeli jsme velikost vzorku 20 mg, 30 mg, 45 mg a 55 mg, kde nám jako ideální množství s nejvyšší výtěžností vyšla hmotnost 45-50 mg smolky na jednu jamku (obrázek č. 15). Jde o velmi malé množství vzorku, což patří mezi další výhody této extrakční techniky. [75]



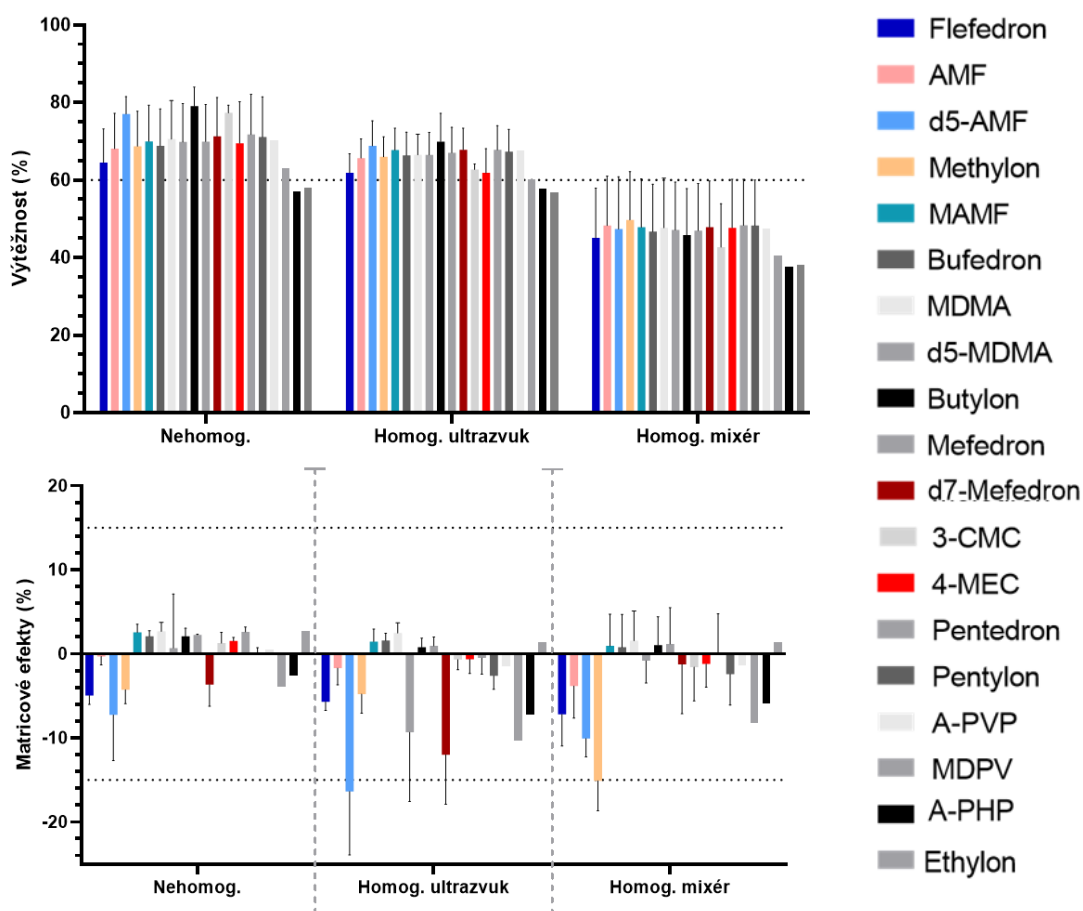
**Obrázek č. 15:** Srovnání výtěžností při použití různého množství smolky na jednu jamku.

### 5.2.4. Homogenizace smolky

Dle některých publikací byla potřeba pro extrakci analytů ze smolky homogenizace. V publikaci [83, 84] byla použita homogenizace smolky pomocí mixéru a v publikaci [82] homogenizace smolky pomocí ultrazvuku. Vyzkoušeli jsme tedy extrahovat z homogenizovaného i nehomogenizovaného vzorku smolky. Nejprve jsme smolku spikovali a až po dvou hodinách vzorky zpracovávali.

Oba tyto typy homogenizace nám však nezvýšily výtěžnost, a naopak se zhoršily matricové efekty (obrázek č. 16).

Pro extrakci amfetaminů a vybraných kationů ze smolky pomocí EME tedy nepotřebujeme smolku homogenizovat, a kromě uspokojivých a opakovatelných výtěžností je vzorek dobře přečištěn a matricové efekty jsou skoro u všech analytů menší než  $\pm 10\%$ .



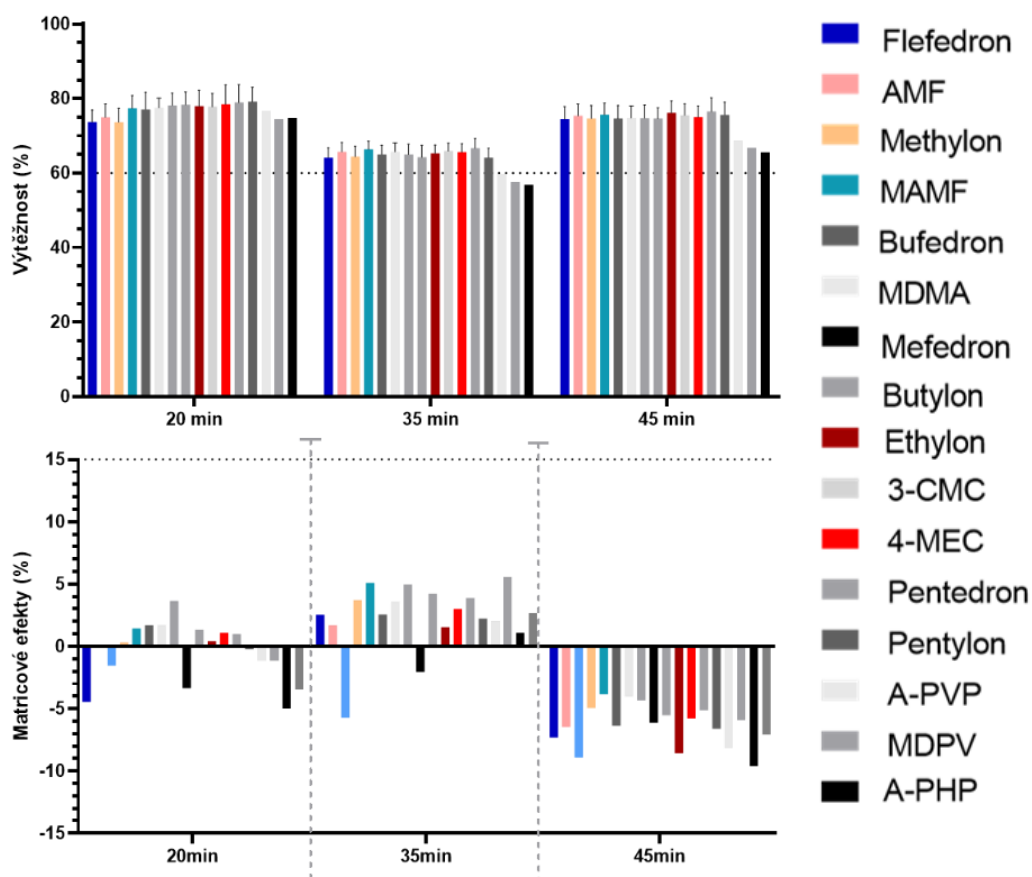
**Obrázek č. 16:** Srovnání výtěžnosti a matricových efektů u vzorku smolky, který nebyl homogenizován, byl homogenizován pomocí ultrazvuku a pomocí mixéru.

### 5.2.5. Délka extrakčního času

Také nás zajímalo, jaký vybrat extrakční čas. Sice je moderním trendem extrakční techniky miniaturizovat a zkracovat, aby byly co nejrychlejší bez nutnosti použití velkých objemů rozpouštědel, ale i tak jsme zkusili prodloužit extrakční čas,



zda bychom nedosáhli vyšší výtěžnosti. Ukázalo se však, že volba délky 20 minutové extrakce je nejvýhodnější, protože s prodloužením extrakčního času na 35 a 45 minut výtěžnost nevedla k lepším výsledkům, a naopak se rapidně zhoršily matricové efekty (obrázek č. 17).



**Obrázek č. 17:** Srovnání výtěžnosti a matricových efektů při době extrakce 20, 35 a 45 minut.

### 5.2.6. Optimalizace napětí

Optimalizace napětí probíhala vždy na vybranou směs organických rozpouštědel použitých na SLM. Optimalizace vkládaného napětí je velmi důležitá, protože čím je do systému vložené větší napětí, tím vyšší to generuje proud a ionizované analyty tak mohou více přecházet membránou z donorového do akceptorového roztoku a může být vyšší výtěžnost. Ale při zvolení příliš vysokého napětí se nám v systému může generovat vysoký proud, který vede k rizikovému

vzniku elektrolýzy, kdy by v donorovém roztoku docházelo k tvorbě bublin, které by způsobily horší kontakt analytu s membránou a tím nižší výtěžnosti a nižší opakovatelnost extrakce. [78]

Je tedy nutné zvolit napětí tak, aby se při extrakci generoval proud nejlépe okolo 20-30  $\mu\text{A}$  na jamku. Toho jsme docílili vložением napětí 15 V, které jsme po 1 minutě zvýšili na 30 V.

### 5.2.7. Intenzita třepání

Intenzitu třepání jsme nijak neoptimalizovali a použili jsme podmínky, které byly použity pro extrakci amfetaminů a vybraných kationů z mateřského mléka, kde byla intenzita třepání nastavena na 1050 otáček za minutu. [81]

### 5.2.8. Výsledné podmínky optimalizované metody

U metody EME amfetaminů a vybraných kationů ze smolky byly pro SLM použity 3  $\mu\text{l}$  ENB:1-undekanol (1:1, V/V). Extrakce probíhala z 45-50 mg smolky, jež byla smíchána se 180  $\mu\text{l}$  donorového roztoku (1% kyseliny mravenčí). Akceptorovou fázi tvořilo 100  $\mu\text{l}$  1% kyseliny mravenčí. Při extrakci bylo vloženo stejnosměrné napětí o velikosti 15 V, které se po 1 minutě zvyšovalo na 30 V. Celková doba extrakce byla 20 minut a po celou dobu extrakce byla destička třepána rychlostí 1050 ot/min.

## 5.3. Validace

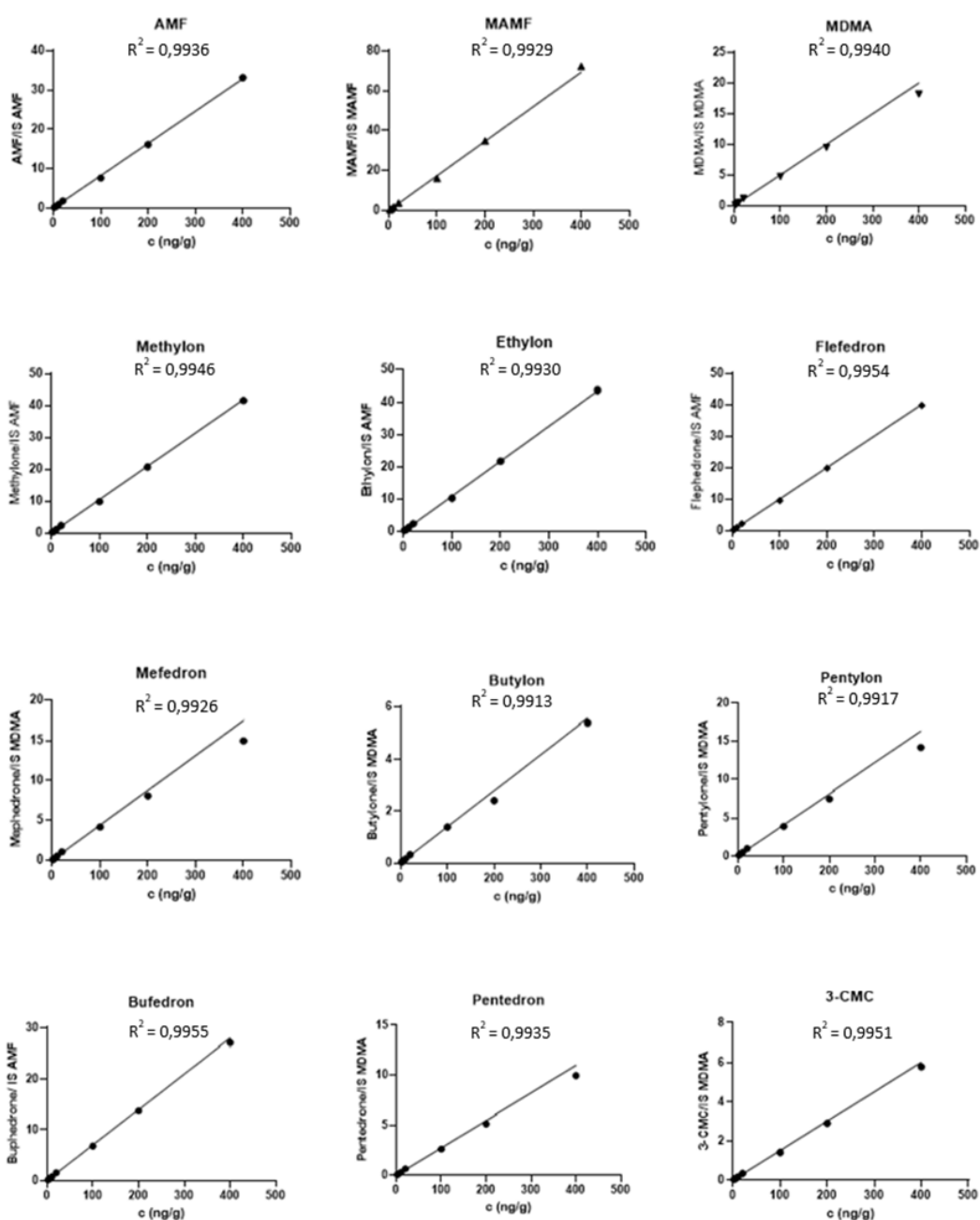
### *Citlivost a selektivita*

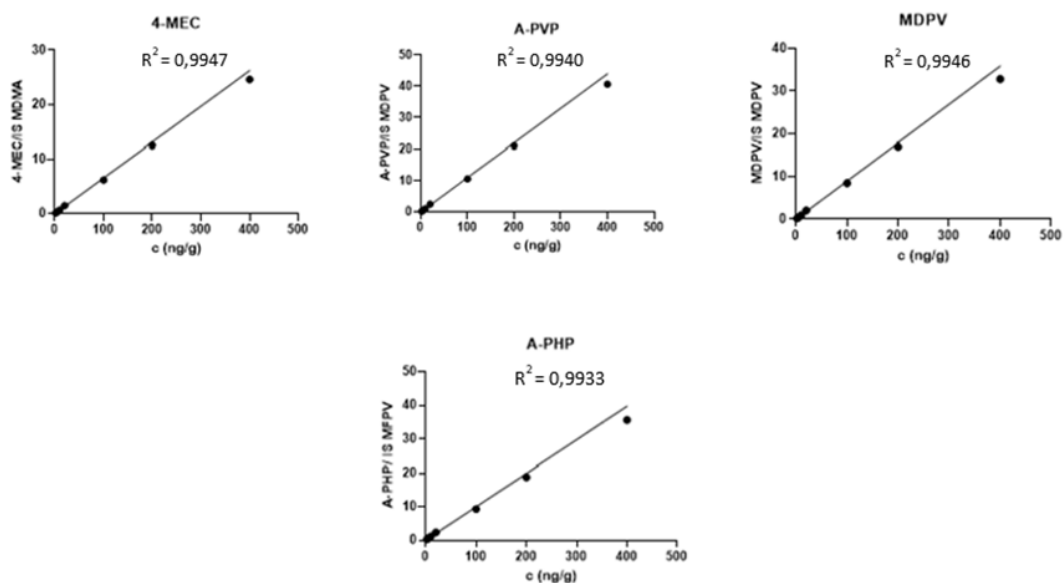
Nejnižší bod kalibrační přímky 2 ng/g představuje zároveň i nejnižší koncentrační bod, který lze spolehlivě kvantifikovat (LLOQ). Selektivita byla

potvrzena, protože detekované plochy v retenčních časech jak analytů, tak vnitřních standardů v blankovém vzorku smolky splňovaly uvedené limity. [87]

### Linearita

Pro všechny testované analyty byla linearita v koncentračním rozsahu 2-400 ng/g smolky. Kalibrační přímka je proložena váženou regresivní křivkou ( $1/x^2$ ) a korelační koeficienty  $R^2$  se pohybují v rozmezí od 0,9913 do 0,9955 (obrázek č.18).





**Obrázek č. 18:** Linearita jednotlivých sledovaných látek s příslušným korelačním koeficientem.

### *Přesnost a preciznost*

Naměřené hodnoty krátkodobé (intra-day) i dlouhodobé (inter-day) přesnosti a preciznosti odpovídaly rozmezí  $\pm 15\%$  dle směrnice FDA (tabulka č. 2). [87]

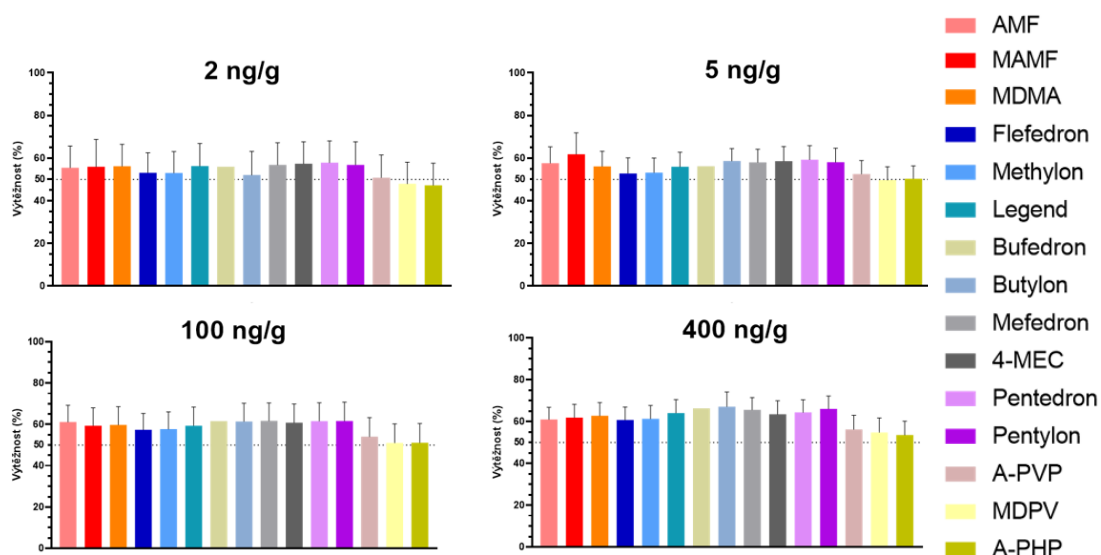
**Tabulka č. 2:** Hodnoty krátkodobé a dlouhodobé přesnosti a preciznosti jednotlivých analytů.

Analyt	QC hladina (ng/g)	Krátkodobá		Dlouhodobá	
		Přesnost (%)	Preciznost (RSD %)	Přesnost (%)	Preciznost (RSD %)
AMF	2	99,9	10,4	99,9	10,4
	5	102,7	7,9	102,7	7,9
	100	93,5	7,6	93,5	7,6
	400	100,6	7,2	100,6	7,2
MAMF	2	104,4	6,2	104,4	6,2
	5	97,6	8,1	97,6	8,1
	100	93,0	6,9	93,0	6,9
	400	109,2	3,2	109,2	3,2
MDMA	2	97,9	8,6	97,9	8,6
	5	103,8	7,4	103,8	7,4
	100	96,9	7,5	96,9	7,5
	400	92,2	6,1	92,2	6,1

Analyt	QC hladina (ng/g)	Krátkodobá		Dlouhodobá	
		Přesnost (%)	Preciznost (RSD %)	Přesnost (%)	Preciznost (RSD %)
Flefedron	2	99,1	7,2	99,1	7,2
	5	100,1	6,6	100,1	6,6
	100	96,6	6,4	96,6	6,4
	400	104,7	4,4	104,7	4,4
Methylon	2	100,2	7,4	100,2	7,4
	5	98,7	6,4	98,7	6,4
	100	94,8	7,4	94,8	7,4
	400	104,1	3,6	104,1	3,6
Ethylon	2	99,4	7,1	99,4	7,1
	5	97,7	7,1	97,7	7,1
	100	94,4	7,4	94,4	7,4
	400	106,2	8,0	106,2	8,0
Bufedron	2	99,0	6,3	99,0	6,3
	5	100,2	7,2	100,2	7,2
	100	96,7	6,9	96,7	6,9
	400	101,4	6,6	101,4	6,6
Butylon	2	93,3	9,8	93,3	9,8
	5	104,8	6,4	104,8	6,4
	100	99,1	11,8	99,1	11,8
	400	81,1	10,5	81,1	10,5
Mefedron	2	94,8	7,2	94,8	7,2
	5	104,8	8,2	104,8	8,2
	100	96,4	8,8	96,4	8,8
	400	89,2	4,2	89,2	4,2
4-MEC	2	97,2	6,0	97,2	6,0
	5	102,3	8,0	102,3	8,0
	100	95,3	7,8	95,3	7,8
	400	93,6	5,2	93,6	5,2
Pentedron	2	92,8	6,8	92,8	6,8
	5	102,9	8,7	102,9	8,7
	100	95,9	8,6	95,9	8,6
	400	91,4	6,0	91,4	6,0
Pentylon	2	91,4	7,1	91,4	7,1
	5	104,3	10,3	104,3	10,3
	100	96,1	9,1	96,1	9,1
	400	90,2	4,8	90,2	4,8
α-PVP	2	99,8	9,1	99,8	9,1
	5	105,2	6,1	105,2	6,1
	100	98,3	7,1	98,3	7,1
	400	93,0	6,1	93,0	6,1
MDPV	2	96,5	6,5	96,5	6,5
	5	103,0	7,0	103,0	7,0
	100	97,5	7,5	97,5	7,5
	400	93,0	6,3	93,0	6,3
α-PHP	2	91,4	7,9	91,4	7,9
	5	103,2	9,5	103,2	9,5
	100	95,7	7,9	95,7	7,9
	400	91,7	6,6	91,7	6,6

## Výtěžnost

Extrakční výtěžnost se pohybovala okolo 50–60 %, byla opakovatelná a shodná u všech analyzovaných látek na všech 4 koncentračních hladinách, tedy jak na nízkých, tak i vysokých koncentracích. Grafické znázornění můžeme vidět na obrázku č. 19.



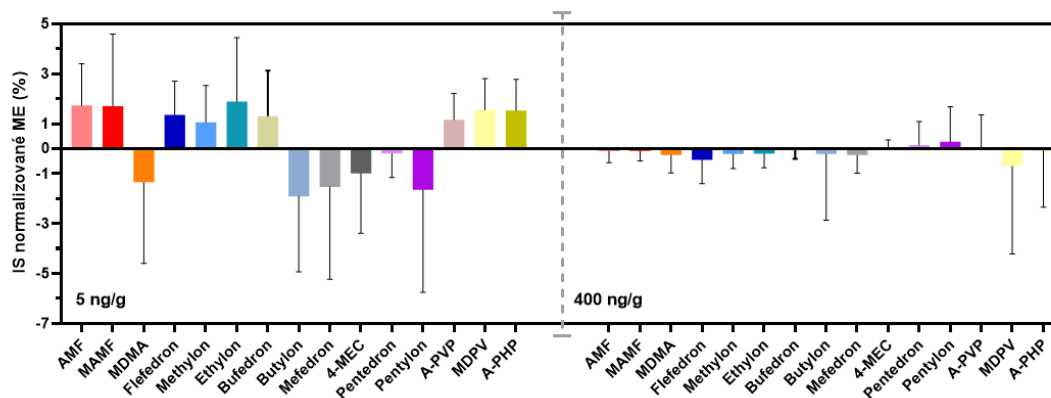
**Obrázek č. 19:** Výtěžnost sledovaných analytů na 4 koncentračních hladinách: na hladině LLOQ (2 ng/g), nízké hladině (5 ng/g), střední hladině (100 ng/g) a vysoké hladině (400 ng/g).

## Přenos

Po vzorku s vysokou koncentrací (nejvyšší kalibrační bod) sledovaných analytů byl nastříknut vzorek prázdné matrice (blank). Sledovali jsme signál v retenčních časech našich analytů a nejvyšší signál (intenzita 10 % LLOQ) jsme viděli u MAMF, u ostatních analytů byl signál menší než 6,5 % LLOQ. Pro vnitřní standardy jsme sledovali signál menší než 0,3 % LLOQ. To splňuje doporučení dle validační směrnice EMA. [88]

## Matricové efekty

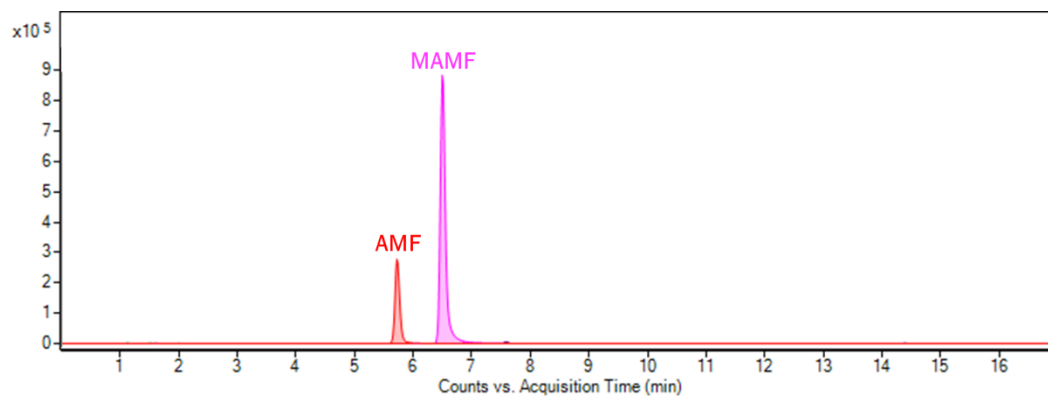
Matricové efekty u všech analytů splňovaly limit dle směrnice EMA  $\pm 15\%$  (obrázek č. 20). [88]



**Obrázek č. 20:** Matricové efekty normalizované vnitřním standardem na koncentrační hladině nízké (5 ng/g) a vysoké (400 ng/g).

## 5.4. Reálný vzorek s neznámým analytem a neznámou koncentrací

Naši metodu jsme aplikovali i na reálný vzorek, který byl potvrzen jako pozitivní. Pomocí elektromembránové extrakce a následné analýze pomocí UHPLC-MS/MS jsme detekovali 175 ng/g amfetaminu a 365 ng/g metamfetaminu. Z těchto naměřených koncentrací vyplývá, že dotyčná osoba v průběhu těhotenství vystavila plod expozici drogám, nejpravděpodobněji pervitinu, protože metamfetamin se v těle částečně metabolizuje na amfetamin (obrázek č. 21). [39]



**Obrázek č. 21:** Chromatogram analýzy reálného vzorku smolky.



## 6. Závěr

V rámci této práce byla mikroextrakční technika EME poprvé použita pro extrakci analytů ze smolky. Metodu jsme optimalizovali pro extrakci amfetaminů a vybraných kationů ze smolky. Optimalizovali jsme složení SLM, které tvořila směs ENB:1-undekanol (1:1, V/V), dále složení donorové i akceptorové fáze, které tvořila 1 % kyselina mravenčí. Dále se optimalizovalo množství smolky, které mělo nejvyšší výtěžnost při zvolené hmotnosti 45-50 mg na jamku. Také se optimalizovala vhodná délka extrakce, která měla nejlepší výtěžnosti a matricové efekty při 20 minutách a také vhodná velikost vloženého napětí, které je 15 V, po jedné minutě navýšené na 30 V. Po celou dobu extrakce je vzorek třepán s intenzitou 1050 otáček za minutu.

Vzorky jsme analyzovali pomocí LC-MS/MS a celou metodu jsme také validovali. Při validaci jsme hodnotili parametry citlivost, selektivita, linearita, výtěžnost, přesnost a preciznost pomocí směrnice FDA a parametry matricové efekty a přenos dle směrnice EMA. Pro všechny testované analyty byla potvrzena linearita v celém koncentračním rozsahu 2-400 ng/g. Korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí 0,9913 až 0,9955. Hodnoty krátkodobé i dlouhodobé přesnosti a preciznosti nepřesáhly rozmezí  $\pm 12$  %. Extrakční výtěžnost se pohybovala v rozmezí 50-60 %, byla opakovatelná a shodná v celém koncentračním rozsahu. Matricové efekty byly normalizovány vnitřním standardem a pohybovaly se v rozmezí do  $\pm 6$  %. Přenos signálu nepřesáhl intenzitu 10 % LLOQ a intenzitu 0,3 % u IS.

Optimalizovali a validovali jsme tedy miniaturizovanou extrakční metodu pro spolehlivou, rychlou a účinnou extrakci amfetaminů a vybraných syntetických kationů ze smolky. Po validaci metody jsme analyzovali reálný vzorek, který byl potvrzen jako pozitivní a detekovali jsme hladiny amfetaminu a metamfetaminu.

## 7. Seznam použité literatury

1. CHOMYNOVÁ, P., GROHMANNOVÁ, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., ČERNÍKOVÁ, T., ORLÍKOVÁ, B., ROUS, Z., JAROŠÍKOVÁ, H., FRANKOVÁ, E., DÉKÁNY, L., FIDESOVÁ, H., VOPRAVIL, J. 2022. Zpráva o nelegálních drogách v České republice 2022 [Report on Illicit Drugs in the Czech Republic 2022] CHOMYNOVÁ, P. (Ed.). Praha: Úřad vlády České republiky. ISBN 978-80-7440-306-4 (online, PDF)
2. CHOMYNOVÁ, P., GROHMANNOVÁ, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., ORLÍKOVÁ, B., ROUS, Z., ČERNÍKOVÁ, T. 2023. Souhrnná zpráva o závislostech v České republice 2022 [Summary Report on Addictions in the Czech Republic in 2022] CHOMYNOVÁ, P. (Ed.). Praha: Úřad vlády České republiky. ISBN 978-80-7440-311-8 (online, PDF)
3. ELLIOTT, J Martin a Thomas JR BEVERIDGE. Psychostimulants and monoamine transporters: upsetting the balance. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005, 5(1), 94-100. ISSN 14714892. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2004.09.005
4. RUDNICK, Gary a Janet CLARK. From synapse to vesicle: The reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1993, 1144(3), 249-263. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2728(93)90109-S
5. PLESSINGER, Mark A. PRENATAL EXPOSURE TO AMPHETAMINES. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 1998, 25(1), 119-138. ISSN 08898545. Dostupné z: doi:10.1016/S0889-8545(05)70361-2
6. HUYBRECHTS, Krista F., Gabriella BRÖMS, Lotte Brix CHRISTENSEN, et al. Association Between Methylphenidate and Amphetamine Use in Pregnancy and Risk of Congenital Malformations. *JAMA Psychiatry*. 2018, 2018-02-01, 75(2). ISSN 2168-622X. Dostupné z: doi:10.1001/jamapsychiatry.2017.3644
7. WEINTRAUB, ZALMAN, YORAM BENTAL, ANITA OLIVAN, et al. Neonatal withdrawal syndrome and behavioral effects produced by maternal drug use. *Addiction Biology*. 1998, 3(2), 159-170. ISSN 13556215. Dostupné z: doi:10.1080/13556219872227
8. CARLIER, Jeremy, Nunzia LA MAIDA, Annagiulia DI TRANA, et al. Testing Unconventional Matrices to Monitor for Prenatal Exposure to Heroin, Cocaine, Amphetamines, Synthetic Cathinones, and Synthetic Opioids. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2020, 42(2), 205-221. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0000000000000719
9. CONCHEIRO, Marta, Elena LENDOIRO, Ana DE CASTRO, et al. Bioanalysis for cocaine, opiates, methadone, and amphetamines exposure detection during pregnancy. *Drug Testing and Analysis*. 2017, 9(6), 898-904. ISSN 19427603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.2087
10. GARERI, Joey, Julia KLEIN a Gideon KOREN. Drugs of abuse testing in meconium. *Clinica Chimica Acta*. 2006, 366(1-2), 101-111. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2005.10.028
11. MOORE, Christine, Adam NEGRUSZ a Douglas LEWIS. Determination of drugs of abuse in meconium. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, 713(1), 137-146. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(97)00479-9

12. KOCHERLAKOTA, Prabhakar. Neonatal Abstinence Syndrome. *Pediatrics*. 2014, 2014-08-01, 134(2), e547-e561. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2013-3524
13. MCMILLIN, Gwendolyn A., Kelly E. WOOD, Frederick G. STRATHMANN a Matthew D. KRASOWSKI. Patterns of Drugs and Drug Metabolites Observed in Meconium. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2015, 37(5), 568-580. ISSN 0163-4356. Dostupné z: doi:10.1097/FTD.0000000000000181
14. INGLE, Rahul G., Su ZENG, Huidi JIANG a Wei-Jie FANG. Current developments of bioanalytical sample preparation techniques in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022, 12(4), 517-529. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2022.03.001
15. DE CAMPOS, Eduardo Geraldo, Bruno Ruiz Brandão DA COSTA, Fabiana Spinetti DOS SANTOS, Fernanda MONEDEIRO, Marcela Nogueira Rabelo ALVES, Wilson José Ramos SANTOS JUNIOR a Bruno Spinosa DE MARTINIS. Alternative matrices in forensic toxicology: a critical review. *Forensic Toxicology*. 2022, 40(1), 1-18. ISSN 1860-8965. Dostupné z: doi:10.1007/s11419-021-00596-5
16. PEDERSEN-BJERGAARD, Stig, Bruno Ruiz Brandão DA COSTA, Fabiana Spinetti DOS SANTOS, Fernanda MONEDEIRO, Marcela Nogueira Rabelo ALVES, Wilson José Ramos SANTOS JUNIOR a Bruno Spinosa DE MARTINIS. Electromembrane extraction—looking into the future: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2019, 411(9), 1687-1693. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1512-x
17. LAPPIN, Julia M. a Grant E. SARA. Psychostimulant use and the brain. *Addiction*. 2019, 2019-07-02, 114(11), 2065-2077. ISSN 0965-2140. Dostupné z: doi:10.1111/add.14708
18. ROTHMAN, Richard B. a Michael H. BAUMANN. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *European Journal of Pharmacology*. 2003, 479(1-3), 23-40. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.054
19. FAVROD-COUNE, Thierry a Barbara BROERS. The Health Effect of Psychostimulants: A Literature Review. *Pharmaceuticals*. 2010, 3(7), 2333-2361. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph3072333
20. RASMUSSEN, Nicolas. Amphetamine-Type Stimulants. *The Neuropsychiatric Complications of Stimulant Abuse*. Elsevier, 2015, 9-25. *International Review of Neurobiology*. ISBN 9780128029787. Dostupné z: doi:10.1016/bs.irn.2015.02.001
21. HEAL, David J, Sharon L SMITH, Jane GOSDEN a David J NUTT. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective: A Literature Review. *Journal of Psychopharmacology*. 2013, 27(6), 479-496. ISSN 0269-8811. Dostupné z: doi:10.1177/0269881113482532
22. MORELLI, Micaela a Eugenia TOGNOTTI. Brief history of the medical and non-medical use of amphetamine-like psychostimulants. *Experimental Neurology*. 2021, 342. ISSN 00144886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2021.113754
23. PRESLEY, Brandon, Bob BIANCHI, John COLEMAN, Fran DIAMOND a Gerry MCNALLY. Efficiency of extraction and conversion of pseudoephedrine to methamphetamine from tamper-resistant and non-tamper-resistant formulations. *Journal of Pharmaceutical and*

- Biomedical Analysis. 2018, 156, 16-22. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.04.016
24. BRZECZKO, Albert W., Ronald LEECH, Jeffrey G. STARK, Fran DIAMOND a Gerry MCNALLY. The advent of a new pseudoephedrine product to combat methamphetamine abuse. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*. 2013, 2013-08-22, 39(5), 284-290. ISSN 0095-2990. Dostupné z: doi:10.3109/00952990.2013.821476
  25. Souhrn údajů o přípravku MODAFEN 200MG/30MG, Potahovaná tableta, Perorální podání, IBUPROFEN, PSEUDOEFEDRIN-HYDROCHLORID [online]. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2010 [cit. 1. 8. 2023]. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/detail-reg/0263235](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0263235).
  26. Souhrn údajů o přípravku NUROFEN STOPGRIP 200MG/30MG, Potahovaná tableta, Perorální podání, IBUPROFEN, PSEUDOEFEDRIN-HYDROCHLORID [online]. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2010 [cit. 1. 8. 2023]. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/detail-reg/0237388](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0237388).
  27. Souhrn údajů o přípravku PARALEL PLUS 325MG/30MG/15MG, Potahovaná tableta, Perorální podání, PARACETAMOL, PSEUDOEFEDRIN-HYDROCHLORID, DEXTROMETHORFAN-HYDROBROMID [online]. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2010 [cit. 1. 8. 2023]. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/detail-reg/0254430](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0254430).
  28. DOS SANTOS, Vagner Bezerra, Daniela DANIEL, Melina SINGH, Claudimir Lucio DO LAGO, Marcela Nogueira Rabelo ALVES, Wilson José Ramos SANTOS JUNIOR a Bruno Spinosa DE MARTINIS. Amphetamine and derivatives in natural weight loss pills and dietary supplements by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry: a critical review. *Journal of Chromatography B*. 2016, 1038(9), 19-25. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.10.019
  29. MARASCO, Silvana F a H Kiat LIM. Ecstasy-Associated Pneumomediastinum: 2011–2020. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*. 2007, 89(4), 389-393. ISSN 0035-8843. Dostupné z: doi:10.1308/003588407X183373
  30. SALOUROS, Helen. Synthetic origin of illicit methylamphetamine in Australia: 2011–2020. *Drug Testing and Analysis*. 2022, 14(3), 427-438. ISSN 1942-7603. Dostupné z: doi:10.1002/dta.3117
  31. GOSSOP, MICHAEL, PAUL GRIFFITHS, BEVERLY POWIS a JOHN STRANG. Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines: 2011–2020. *Addiction*. 1992, 87(11), 1527-1536. ISSN 0965-2140. Dostupné z: doi:10.1111/j.1360-0443.1992.tb02660.x
  32. LI, Michael J., Steven J. SHOPTAW, Jane GOSDEN a David J NUTT. Clinical management of psychostimulant withdrawal: review of the evidence. *Addiction*. 2023, 118(4), 750-762. ISSN 0965-2140. Dostupné z: doi:10.1111/add.16093
  33. DE GREGORIO, Danilo, Argel AGUILAR-VALLES, Katrin H. PRELLER, Boris Dov HEIFETS, Meghan HIBICKE, Jennifer MITCHELL a Gabriella GOBBI. Hallucinogens in

- Mental Health: Preclinical and Clinical Studies on LSD, Psilocybin, MDMA, and Ketamine. *The Journal of Neuroscience*. 2021, 2021-02-03, 41(5), 891-900. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1659-20.2020
34. MCCREARY, Andrew C., Christian P. MÜLLER a Małgorzata FILIP. Psychostimulants. The Neuropsychiatric Complications of Stimulant Abuse. Elsevier, 2015, 41-83. *International Review of Neurobiology*. ISBN 9780128029787. Dostupné z: doi:10.1016/bs.irm.2015.02.008
  35. HARRO, Jaanus, Christian P. MÜLLER a Małgorzata FILIP. Neuropsychiatric Adverse Effects of Amphetamine and Methamphetamine. The Neuropsychiatric Complications of Stimulant Abuse. Elsevier, 2015, 179-204. *International Review of Neurobiology*. ISBN 9780128029787. Dostupné z: doi:10.1016/bs.irm.2015.02.004
  36. ROGNLI, Eline Borger, Sigrid Elisabet MEDHUS a Jørgen G. BRAMNESS. Amfetaminutløst psykose eller schizofreni? *Tidsskrift for Den norske legeforening*. Elsevier, 2015, 135(3), 249-251. *International Review of Neurobiology*. ISBN 9780128029787. ISSN 0029-2001. Dostupné z: doi:10.4045/tidsskr.14.1365
  37. ABBRUSCATO, Thomas J. a Paul C. TRIPPIER. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Methamphetamine. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018, 2018-10-17, 9(10), 2373-2378. ISSN 1948-7193. Dostupné z: doi:10.1021/acchemneuro.8b00123
  38. CARVALHO, Márcia, Helena CARMO, Vera Marisa COSTA, João Paulo CAPELA, Helena PONTES, Fernando REMIÃO, Félix CARVALHO a Maria de Lourdes BASTOS. Toxicity of amphetamines: an update. *Archives of Toxicology*. 2012, 86(8), 1167-1231. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-012-0815-5
  39. HESS, Cornelius, Moritz LOSACKER, Alexandra MAAS, Vigdis VINDENES, Asbjørg S. CHRISTOPHERSEN, Marilyn A. HUESTIS, Elisabeth L. ØIESTAD a Maria de Lourdes BASTOS. Chromatographic separation of R(-)/S-( )-enantiomers of amphetamine and methamphetamine: differentiation between single methamphetamine consumption and co-consumption with amphetamine using enantioselective quantitative LC-MS/MS analysis. *International Journal of Legal Medicine*. 2019, 133(2), 467-473. ISSN 0937-9827. Dostupné z: doi:10.1007/s00414-018-1979-1
  40. VALENTE, Maria João, Paula GUEDES DE PINHO, Maria DE LOURDES BASTOS, Félix CARVALHO a Márcia CARVALHO. Khat and synthetic cathinones: a review. *Archives of Toxicology*. 2014, 88(1), 15-45. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-013-1163-9
  41. PIEPRZYCA, Ewelina, Rafał SKOWRONEK, Ľuboš NIŽNANSKÝ a Piotr CZEKAJ. Synthetic cathinones – From natural plant stimulant to new drug of abuse. *European Journal of Pharmacology*. 2020, 875. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2020.173012
  42. GERMAN, Christopher L., Annette E. FLECKENSTEIN a Glen R. HANSON. Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. *Life Sciences*. 2014, 97(1), 2-8. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2013.07.023

43. DASGUPTA, Amitava. Designer drugs including bath salts and spices. *Alcohol, Drugs, Genes and the Clinical Laboratory*. Elsevier, 2017, 53-73. ISBN 9780128054550. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805455-0.00003-8
44. ASHRAFIOUN, Lisham, Francis A. BONADIO, Kyoung Deok BAIK, et al. Patterns of Use, Acute Subjective Experiences, and Motivations for Using Synthetic Cathinones (“Bath Salts”) in Recreational Users. *Journal of Psychoactive Drugs*. 2016, 2016-09-28, 48(5), 336-343. ISSN 0279-1072. Dostupné z: doi:10.1080/02791072.2016.1229875
45. BANKS, Matthew L., Travis J. WORST, Daniel E. RUSYNIAK a Jon E. SPRAGUE. Synthetic Cathinones (“Bath Salts”). *The Journal of Emergency Medicine*. 2014, 46(5), 632-642. ISSN 07364679. Dostupné z: doi:10.1016/j.jemermed.2013.11.104
46. PROSSER, Jane M. a Lewis S. NELSON. The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *Journal of Medical Toxicology*. 2012, 8(1), 33-42. ISSN 1556-9039. Dostupné z: doi:10.1007/s13181-011-0193-z
47. SIMMONS, Steven J., Jonna M. LEYRER-JACKSON, Chicora F. OLIVER, Callum HICKS, John W. MUSCHAMP, Scott M. RAWLS a M. Foster OLIVE. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cathinone-Derived Psychostimulants. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018, 2018-10-17, 9(10), 2379-2394. ISSN 1948-7193. Dostupné z: doi:10.1021/acchemneuro.8b00147
48. DASGUPTA, A. Challenges in Laboratory Detection of Unusual Substance Abuse. Elsevier, 2017, 163-186. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780128119198. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acc.2016.07.004
49. BONSON, Katherine R., Tyler DALTON a Dominic CHIAPPERINO. Scheduling synthetic cathinone substances under the Controlled Substances Act. *Psychopharmacology*. 2019, 236(3), 845-860. ISSN 0033-3158. Dostupné z: doi:10.1007/s00213-018-5129-8
50. SOARES, Jorge, Vera Marisa COSTA, Maria de Lourdes BASTOS, Félix CARVALHO a João Paulo CAPELA. An updated review on synthetic cathinones. *Archives of Toxicology*. 2021, 95(9), 2895-2940. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-021-03083-3
51. POYATOS, Lourdes, Adrián TORRES, Esther PAPASEIT, et al. Abuse Potential of Cathinones in Humans: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2022, 11(4). ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm11041004
52. COPPOLA, M. a R. MONDOLA. Synthetic cathinones: Chemistry, pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “bath salts” or “plant food.” *Toxicology Letters*. 2012, 211(2), 144-149. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.009
53. CORAZZA, O., A.C. PARROTT a Z. DEMETROVICS. Novel psychoactive substances: Shedding new lights on the ever-changing drug scenario and the associated health risks. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 2017, 32(3). ISSN 08856222. Dostupné z: doi:10.1002/hup.2616

54. CONCHEIRO, Marta a Marilyn A HUESTIS. Drug exposure during pregnancy: analytical methods and toxicological findings. *Bioanalysis*. 2018, 2018-04-01, 10(8), 587-606. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2017-0260
55. JABLONSKI, Sarah A., Michael T. WILLIAMS a Charles V. VORHEES. Mechanisms involved in the neurotoxic and cognitive effects of developmental methamphetamine exposure: analytical methods and toxicological findings. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2016, 108(2), 131-141. ISSN 1542975X. Dostupné z: doi:10.1002/bdrc.21130
56. EZE, Nwando, Lynne M. SMITH, Linda L. LAGASSE, et al. School-Aged Outcomes following Prenatal Methamphetamine Exposure: 7.5-Year Follow-Up from the Infant Development, Environment, and Lifestyle Study. *The Journal of Pediatrics*. 2016, 170, 34-38.e1. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2015.11.070
57. ROCA, Antonia, Pilar JARQUE, Isabel GOMILA, Emilia MARCHEI, Roberta TITTARELLI, Miguel Ángel ELORZA, Pilar SANCHÍS a Bernardino BARCELÓ. Clinical features and risk factors associated with prenatal exposure to drugs of abuse. *Anales de Pediatría (English Edition)*. 2021, 95(5), 307-320. ISSN 23412879. Dostupné z: doi:10.1016/j.anpede.2020.08.013
58. BARROSO, M., E. GALLARDO, D. N. VIEIRA, J. A. QUEIROZ a M. LÓPEZ-RIVADULLA. Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, 400(6), 1665-1690. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-4888-4
59. GALLARDO, E. a J. A. QUEIROZ. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomedical Chromatography*. 2008, 22(8), 795-821. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1009
60. NOVÁKOVÁ, Lucie. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A*. 2013, 1292, 25-37. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.08.087
61. NOVÁKOVÁ, Lucie a Hana VLČKOVÁ. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 656(1-2), 8-35. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.10.004
62. POOLE, Colin, Zoltan MESTER, Manuel MIRÓ, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Janusz PAWLISZYN. Extraction for analytical scale sample preparation (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2016, 2016-7-1, 88(7), 649-687. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1515/pac-2015-0705
63. KATAOKA, Hiroyuki, Zoltan MESTER, Manuel MIRÓ, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Janusz PAWLISZYN. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 396(1), 339-364. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-3076-2
64. HE, Yi a Marta CONCHEIRO-GUISAN. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomedical Chromatography*. 2019, 33(1). ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.4444

65. HANSEN, Frederik, Elisabeth Leere ØIESTAD a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020, 189(1). ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113446
66. KHAN, Wajid Ali, Muhammad Balal ARAIN, Yadollah YAMINI, Nasrullah SHAH, Tasneem Gul KAZI, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Mohammad TAJIK. Hollow fiber-based liquid phase microextraction followed by analytical instrumental techniques for quantitative analysis of heavy metal ions and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020, 10(2), 109-122. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2019.12.003
67. GHAMBARIAN, Mahnaz, Yadollah YAMINI a Ali ESRAFILI. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Microchimica Acta*. 2012, 177(3-4), 271-294. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-012-0773-x
68. VÅRDAL, Linda, Hilde-Merete ASKILDSEN, Astrid GJELSTAD, Elisabeth Leere ØIESTAD, Hilde Marie Erøy EDVARDESEN a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood. *Journal of Chromatography B*. 2017, 1048, 77-84. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.02.010
69. PILAŘOVÁ, Veronika, Mumtaz SULTANI, Kristine Skoglund ASK, Lucie NOVÁKOVÁ, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction. *Journal of Chromatography B*. 2017, 1043, 25-32. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.019
70. VÅRDAL, Linda, Gladys WONG, Åse Marit Leere ØIESTAD, Stig PEDERSEN-BJERGAARD, Astrid GJELSTAD a Elisabeth Leere ØIESTAD. Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, 410(20), 4967-4978. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1147-y
71. OCAÑA-GONZÁLEZ, Juan Antonio, Noemí ARANDA-MERINO, Juan Luis PÉREZ-BERNAL a María RAMOS-PAYÁN. Solid supports and supported liquid membranes for different liquid phase microextraction and electromembrane extraction configurations. A review. *Journal of Chromatography A*. 2023, 1691. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2023.463825
72. Majors, R.E., Supported liquid extraction: The best-kept secret in sample preparation. *LC GC Europe*, 2012. 25(8): p. 430-435.
73. HANSEN, Frederik André a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Electromembrane extraction – looking closer into the liquid membrane. *Advances in Sample Preparation*. 2022, 2. ISSN 27725820. Dostupné z: doi:10.1016/j.sampre.2022.100020
74. PEDERSEN-BJERGAARD, Stig, Chuixiu HUANG a Astrid GJELSTAD. Electromembrane extraction–Recent trends and where to go. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017, 7(3), 141-147. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2017.04.002



75. PEDERSEN-BJERGAARD, Stig, Chuixiu HUANG a Astrid GJELSTAD. Electromembrane extraction—looking into the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2019, 411(9), 1687-1693. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-1512-x
76. HUANG, Chuixiu, Astrid GJELSTAD a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Organic solvents in electromembrane extraction: recent insights. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2016, 2016-12-1, 35(4), 169-183. ISSN 2191-0189. Dostupné z: doi:10.1515/revac-2016-0008
77. PEDERSEN-BJERGAARD, Stig a Knut Einar RASMUSSEN. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1109(2), 183-190. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.01.025
78. BAVLOVIČ PISKÁČKOVÁ, Hana, Petra KOLLÁROVÁ-BRÁZDOVÁ, Radim KUČERA, Miloslav MACHÁČEK, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Petra ŠTĚRBOVÁ-KOVAŘÍKOVÁ. The electromembrane extraction of pharmaceutical compounds from animal tissues. *Analytica Chimica Acta*. 2021, 1177(9), 1687-1693. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2021.338742
79. HONG, Changbao, Ying DONG, Ruiqin ZHU, Yibo YAN, Xiantao SHEN, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Chuixiu HUANG. Effect of sample matrices on supported liquid membrane: Efficient electromembrane extraction of cathinones from biological samples. *Talanta*. 2022, 240. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.123175
80. SEIDI, Shahram, Yadollah YAMINI, Tahmineh BAHERI a Rouhollah FEIZBAKHSI. Electrokinetic extraction on artificial liquid membranes of amphetamine-type stimulants from urine samples followed by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218(26), 3958-3965. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.05.002
81. BAVLOVIČ PISKÁČKOVÁ, Hana, Alžběta NEMEŠKALOVÁ, Radim KUČERA, Stig PEDERSEN-BJERGAARD, Věra NAJMANOVÁ, Petra ŠTĚRBOVÁ-KOVAŘÍKOVÁ, Martin KUCHAR a David SÝKORA. Advanced microextraction techniques for the analysis of amphetamines in human breast milk and their comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022, 210(9), 1687-1693. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2021.114549
82. KELLY, Tamsin, Teresa R. GRAY a Marilyn A. HUESTIS. Development and validation of a liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of 10 amphetamine-, methamphetamine- and 3,4-methylenedioxymethamphetamine-related (MDMA) analytes in human meconium. *Journal of Chromatography B*. 2008, 867(2), 194-204. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2008.03.029
83. NEMEŠKALOVÁ, Alžběta, Miroslava BURSOVÁ, David SÝKORA, Martin KUCHAR, Radomír ČABALA a Tomáš HLOŽEK. Salting out assisted liquid-liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, 172, 42-49. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2019.04.036

84. GRAY, Teresa R., Diao M. SHAKLEYA a Marilyn A. HUESTIS. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393(8), 1977-1990. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2680-5
85. HANSEN, Frederik André, Elia SANTIGOSA-MURILLO, Maria RAMOS-PAYÁN, María MUÑOZ, Elisabeth LEERE ØIESTAD a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane. *Analytica Chimica Acta*. 2021, 1143, 109-116. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2020.11.044
86. Bavlovič Piskáčková Hana. Využití LC-MS v bioanalýze antracyklinů a potenciálních kardioprotektiv. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2021.
87. Process Validation: General Principles and Practices; Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U.S. Food and Drug Administration [online]. [cit. 17. 8. 2023]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
88. Bioanalytical method validation – Scientific guideline: Guideline on bioanalytical method validation. EUROPEAN MEDICINES AGENCY [online]. [cit. 17. 8. 2023]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
89. <https://upload.wikimedia.org/> [staženo 21. 3. 2023].