



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Chromatograficzne i spektroskopowe oznaczanie nowych substancji psychoaktywnych (tzw. dopalaczy) w materiale rzeczowym i biologicznym

Author: Milena Majchrzak

Citation style: Majchrzak, Milena. (2018). Chromatograficzne i spektroskopowe oznaczanie nowych substancji psychoaktywnych (tzw. dopalaczy) w materiale rzeczowym i biologicznym. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



Rozprawa doktorska

**Chromatograficzne i spektroskopowe oznaczanie nowych
substancji psychoaktywnych (tzw. dopalaczy) w materiale
rzeczowym i biologicznym**

Milena Majchrzak

Promotor:

Dr hab. Mieczysław Sajewicz
Zakład Chemii Ogólnej i Chromatografii
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Promotor pomocniczy:

Dr n med. Rafał Celiński

Uniwersytet Śląski
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii
Instytut Chemii

Katowice 2018

Pragnę serdecznie podziękować,

*mojemu Promotorowi, Panu **dr hab. Mieczysławowi Sajewiczowi** za chęć objęcia opieką naukową mojej pracy, wszelką udzieloną pomoc w trakcie realizacji badań oraz poświęcony czas.*

*Panu **dr n med. Rafałowi Celińskiemu** za wprowadzenie w świat toksykologii i chemii sądowej, pomoc merytoryczną i nieocenione wsparcie na każdym etapie prowadzonych badań oraz za możliwość realizacji pracy doktorskiej w Laboratorium Toksykologicznym ToxLab w Katowicach.*

*Pani **Profesor zw. dr hab. Teresie Kowalskiej** za pomoc i poświęcony czas przy sporządzaniu każdej z publikacji naukowych, a także za umożliwienie i zaproszenie do pierwszego współautorstwa w dwóch rozdziałach książki.*

***Narzeczonemu** za wiarę i ogromne wsparcie, **Bratu** za doping,*

A w szczególności

***Rodzicom**, bez których wyrzeczeń i poświęcenia nigdy nie doszłabym tak daleko.*

Spis treści

I. Wstęp.....	7
II. Część literaturowa	9
1. Nowe substancje psychoaktywne (NPS).....	9
2. Pochodne katynonu	11
2.1 Katynon.....	12
2.2 Mechanizm działania i metabolizm pochodnych katynonu.....	15
2.3 Struktura chemiczna pochodnych katynonu	17
2.4 Rozwój modyfikacji znanych struktur pochodnych katynonu.....	21
3. Techniki instrumentalne wykorzystywane do identyfikacji substancji psychoaktywnych.....	26
3.1 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	26
3.2 Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS).....	27
III. Cel pracy	29
IV. Glosariusz.....	30
V. Badania własne.....	31
1. Wykaz stosowanej aparatury i odczynników	31
2. Materiał do badań.....	32
3. Identyfikacja nowych pochodnych katynonu α -PHP i 4F-PV9	32
3.1 Materiał do badań	32
3.2 Przygotowanie prób do analizy.....	32
3.3 Metodyka badań.....	33
3.3.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS) i detektorem diodowym (HPLC-DAD).....	33
3.3.2 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	34
3.3.3 Tandemowa spektrometria mas MS ⁿ	34
3.3.4 Analiza termogravimetryczna (TGA) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)	34
3.4 Wyniki badań dla pochodnej 4F-PV9.....	35
3.4.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS).....	35
3.4.2 Tandemowa spektrometria mas MS ⁿ	36
3.4.3 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	38

3.4.4	Protonowy i węglowy jądrowy rezonans magnetyczny (NMR).....	39
3.4.5	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią UV-VIS (HPLC-DAD)	40
3.4.6	Analiza termograwimetryczna (TGA) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)	41
3.5	Wyniki badań dla pochodnej katynonu α -PHP	42
3.5.1	Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS).....	42
3.5.2	Tandemowa spektrometria mas MS ⁿ	43
3.5.3	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	45
3.5.4	Protonowy i węglowy jądrowy rezonans magnetyczny (NMR).....	46
3.5.5	Chromatografia cieczowa ze spektrometrią UV-VIS (HPLC-DAD)	47
3.5.6	Analiza termograwimetryczna (TGA) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)	48
4.	Opracowanie widm masowych techniką EI-MS oraz ESI-MS ⁿ na potrzeby utworzenia biblioteki danych analitycznych dla najnowszych pochodnych katynonu.....	49
4.1	Wstęp	49
4.2	Materiał do badań	49
4.3	Przygotowanie prób do analizy.....	49
4.4	Metodyka badań.....	50
4.4.1	Tandemowa spektrometria mas ESI-MS ⁿ	50
4.4.2	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS).....	50
4.5	Wyniki badań	50
4.5.1	Tandemowa spektrometria mas ESI-MS ⁿ	50
4.5.2	Chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas (GC-MS)	83
4.6	Biblioteka danych analitycznych dotycząca najnowszych pochodnych katynonu...97	
5.	Identyfikacja nowej substancji psychoaktywnej z grupy pochodnych katynonu – α -propyloaminopentiofenonu w materiale rzeczowym oraz analiza jakościowa i ilościowa w pośmiertnym materiale biologicznym	101
5.1	Wstęp	101
5.2	Materiał do badań	101
5.3	Przygotowanie prób materiałów rzeczowych do analizy.....	101
5.4	Przygotowanie prób materiałów biologicznych do analizy	102
5.5	Metodyka analizy technikami instrumentalnymi.....	102

5.5.1 Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)	102
5.5.2 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	103
5.5.3 Tandemowa spektrometria mas MS ⁿ	103
5.5.4 Analiza ilościowa.....	103
5.6 Wyniki analizy	105
5.6.1 Test immunoenzymatyczny ELISA	105
5.6.2 Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS).....	105
5.6.3 Tandemowa spektrometria mas (MS ⁿ).....	107
5.6.4 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS).....	108
5.6.5 Analiza ilościowa materiału biologicznego	109
VI. Podsumowanie	111
VIII. Bibliografia.....	112
IX. Dorobek naukowy	117

I. Wstęp

Nowe substancje psychoaktywne (NPS), nazywane również dopalaczami lub narkotykami projektowanymi, są niezakazanymi, syntetycznymi analogami nielegalnych prawnie narkotyków. Dopalamce pojawiły się na światowym nielegalnym rynku narkotykowym w połowie roku 2000 i stopniowo ze względu na oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy stały się alternatywą dla narkotyków takich jak amfetamina, kokaina, marihuana, heroina, LSD itp. Na obszarze Polski stale pojawiają się nowe produkty, zawierające w swym składzie znane dotąd substancje psychoaktywne, ich mieszaniny lub związki zupełnie nowe, dotychczas niescharakteryzowane. Jak podaje system wczesnego ostrzegania (European Early Warning System) w samej Europie, w roku 2005, zidentyfikowano 14 nowych substancji psychoaktywnych, w roku 2014 natomiast, liczba ta wzrosła, aż do ponad 100. Wśród zabezpieczanych na rynku narkotykowym substancji znajdują się pochodne piperazyny, fenyloetyloaminy, benzodiazepiny, opioidów oraz najczęściej identyfikowane grupy – pochodne katynonu i syntetyczne kannabinoidy. Syntetycznie otrzymywane nowe narkotyki projektowane zdominowały nielegalny przemysł dopalaczowy, a spektrum modyfikacji podstawowych ich struktur jest coraz szersze. W wielu krajach Europy, w tym w Polsce, coraz więcej pochodnych wymienionych wyżej grup związków, staje się ustawowo zakazanymi i uznawanymi w świetle prawa jako substancje psychotropowe tożsame z narkotykami twardymi, jak np. amfetamina. Możliwości syntezy zmienionych struktur dostępnych dotychczas substancji są tak duże, że wraz z momentem uznania je za zakazane, pojawiają na rynku nowe, odpowiednio zmodyfikowane. Wobec narastającego problemu, jakim są nowe substancje psychoaktywne, istotne jest opracowywanie i udoskonalanie analitycznych procedur ich oznaczania zarówno jakościowego, jak i ilościowego. Poszerzenie baz danych dotyczących danej grupy pochodnych o fizykochemiczne i farmakologiczne właściwości nowych związków chemicznych, pozwoli w przyszłości analitykom, chemikom oraz toksykologom na szybką identyfikację danej substancji w zabezpieczanych materiałach. Biorąc pod uwagę nieograniczony obecnie dostęp do dopalaczy, narastający w ostatnich latach problem ich nadużywania oraz coraz częstsze przypadki zatrucia, w tym śmiertelnych, bardzo ważne jest udoskonalenie obecnych dotąd metod analitycznych oraz opracowanie nowych, które mogłyby stanowić narzędzie pracy toksykologów do szybkiej identyfikacji

substancji aktywnych w materiale biologicznym. Ponadto, uzupełnianie biblioteki o nowe związki psychoaktywne wraz z ich charakterystyką fizykochemiczną, stanowi pomost pomiędzy trafną oceną zabezpieczanych materiałów przez toksykologów pracujących na zlecenie organów ścigania, a możliwością zwiększenia listy środków zakazanych przez Ustawodawców. Określanie struktur zmodyfikowanych związków, które pojawiają się rynku pseudonarkotykowym pozwala na próbę oceny ich aktywności biologicznej, farmakokinetyki, farmakodynamiki, metabolizmu i toksyczności w badaniach na poziomie komórkowym.

II. Część literaturowa

1. Nowe substancje psychoaktywne (NPS)

Nowe substancje psychoaktywne (NPS) pojawiły się na światowym rynku narkotykowym na początku roku 2000. Związki te oddziałują na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) człowieka w sposób podobny do znanych od lat narkotyków takich jak np. amfetamina, marihuana, heroina, LSD. Znane również pod nazwą „dopalaczy” lub „narkotyków projektowanych” substancje, są niezakazanymi w świetle prawa, co sprawia, że na czarnym runku całego świata, w tym Polski, pojawia się ich coraz więcej. W przeciągu ostatnich 18 lat dopalacze zaczęły być dostępne stopniowo najpierw w tzw. sklepach kolekcjonerskich i smartshopach, a obecnie w sprzedaży internetowej oraz punktach stacjonarnych nazywanych „Śmieszne Rzeczy”, „Zapachy i inne”, „Magic Blow”, „Punkt Ksero”, „Chemia z Niemiec” itp. Nowe substancje psychoaktywne sprzedawane są najczęściej w formie białych lub barwnych krystalicznych proszków, suszy roślinnych nasączonych ich roztworami, tzw. „blotterów” tj. kartoników nasączonych ich roztworami, liquidów do e-papierosów oraz rzadziej w postaci tabletek bądź kapsułek, umieszczonych w woreczkach zamykanych strunowo lub próbkach typu eppendorf. Produkty, w których substancją aktywną są dopalacze nazywane kiedyś były „odżywkami dla roślin”, „solami do kąpiele”, „research chemical”, „coccolino”, „cherry”. Coraz częściej, etykiety opisywane są jako „pogromca pijawek”, „amulet kierowcy”, „dodatek do piasku”, „odświeżacz do bidetu”, „imitacja sztucznego mchu pawiego”, „sztywny misza”, „kosiarz”, „mocarz”, „Władziu” itp. [1 – 5]. Wśród nowych substancji psychoaktywnych wyróżnić można takie grupy związków jak: pochodne fenyletyloaminy typu –NBOMe, pochodne piperazyny, syntetyczne kannabinoidy, pochodne katynonu, benzodiazepiny oraz analogi opioidów [6].

W składzie substancji oferowanych pod takimi samymi nazwami nie zawsze znajdują się te same substancje oddziałujące na ośrodkowy układ nerwowy. Co więcej, w skład wielu produktów coraz częściej wchodzi nie tylko pojedyncze składniki aktywne, ale również połączenie dwóch lub więcej pochodnych, a także domieszki kofeiny, lidokainy czy benzokainy. Występowanie kilku związków tej samej grupy, często strukturalnie bardzo podobnych - np. izomerów, w jednej próbce poddawanej analizie, wymaga zastosowania wysokoczułych technik instrumentalnych celem skutecznej identyfikacji wszystkich z nich.

Łatwy dostęp do niezakazanych prawnie dopalaczy sprzedawanych obecnie na dużą skalę w sieci internetowej oraz sklepach stacjonarnych, jest przyczyną coraz częstszego eksperymentowania z ich zażywaniem wśród zwolenników substancji psychoaktywnych, jako alternatywa do nielegalnych narkotyków. Nieznany najczęściej biorecy skład zakupionego produktu oraz mechanizm działania substancji aktywnych znajdujących się w nim prowadzi do bardzo dużej ilości zatruć dopalaczami, w tym śmiertelnych [3, 6].

Co roku, na rynku pseudonarkotykowym pojawia się do kilkudziesięciu nowych substancji psychoaktywnych, na temat których brak jest, bądź istnieje bardzo mało danych literaturowych dotyczących fizykochemii, farmakologii, czy toksyczności. Wszystko to sprawia, że ewentualne zatrucia tego typu związkami są bardzo trudne do zidentyfikowania, a tylko odpowiednio szybka diagnoza daje szansę na podjęcie właściwego leczenia. Dynamiczny rozwój rynku dopalaczowego wymaga od toksykologów, chemików, analityków stałej aktualizacji biblioteki danych dotyczących nowych substancji psychoaktywnych.

W Polsce, o nielegalności substancji psychotropowych i środków odurzających stanowi Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29 lipca 2005 r. (Dz. U. z 2012 r. poz. 124) znowelizowana dnia 24 kwietnia 2015 r. [7]. Akt ten zawiera załączniki, w których narkotyki podzielone zostały na dwie grupy – substancji psychotropowych oraz środków odurzających. Substancją psychotropową określa się: *„każdą substancję pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, działającą na ośrodkowy układ nerwowy, określoną w wykazie substancji psychotropowych stanowiącym załącznik nr 2 do ustawy”*, środkiem odurzającym zaś: *„każdą substancję pochodzenia naturalnego lub syntetycznego działającą na ośrodkowy układ nerwowy, określoną w wykazie środków odurzających stanowiącym załącznik nr 1 do ustawy”*. W rozumieniu Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii, dopalacz określany jest jako „środek zastępczy” tj.: *„produkt zawierający co najmniej jedną nową substancję psychoaktywną lub inną substancję o podobnym działaniu na ośrodkowy układ nerwowy, który może być użyty zamiast środka odurzającego lub substancji psychotropowej lub w takich samych celach jak środek odurzający lub substancja psychotropowa, których wytwarzanie i wprowadzanie do obrotu nie jest regulowane na podstawie przepisów odrębnych; do środków zastępczych nie stosuje się przepisów o ogólnym bezpieczeństwie produktów.”*. Dwa razy w roku, poszczególne dopalacze trafiają do wykazu nowych substancji psychoaktywnych Rozporządzenia Ministra Zdrowia w sprawie wykazu nowych

substancji psychoaktywnych na podstawie art. 44b ust. 2 ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz. U. z 2016 r. poz. 224 i 437) [8]. Dopóki Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii delegalizować będzie tylko konkretne substancje chemiczne, a nie wszelkie możliwe zmiany strukturalne danej cząsteczki, będącej podstawową, wyjściową dla danej grupy pochodnych, dopóty oczywistym jest, że producenci i dystrybutorzy narkotyków projektowanych będą zawsze o krok przed Ustawodawcami. I tak, na krótko przed ukazaniem się ostatniej nowelizacji Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 24 kwietnia 2015 r., a która weszła w życie w dniu 1 lipca 2015 r., i objęcia kontrolą kolejnych kilkudziesięciu substancji psychoaktywnych, na rynku dopalaczowym pojawiło się kilkanaście nowych, odpowiednio zmodyfikowanych pod względem budowy. Dla przykładu, jednymi z pierwszych pochodnych katynonu, które pojawiły się w Polsce byli następcy 3-metylometkatynonu (3-MMC) tj. chlorowa pochodna metkatynonu - 3-chlorometkatynon (3-CMC) oraz jego izomery strukturalne (4-CMC i 2-CMC), a następnie 4-chloroetkatynon (4-CEC) oraz jego izomery strukturalne (3-CEC i 2-CEC), jako pochodne zmodyfikowane zarówno w pierścieniu aromatycznym, jak i łańcuchu alifatycznym. Krótko po nich, nową substancją psychoaktywną zajmującą miejsce nielegalnej już wówczas substancji psychotropowej z grupy I-P - α -pirolidynoheksanofenonu (α -PHP) – okazał się być α -pirolidynooktanofenon (α -PHPP, PV8). Podobnie, wśród drugiej z kolei z punktu widzenia popularności grupy dopalaczy tj. syntetycznych kannabinoidów, na miejscu zakazanych w dniu 1 lipca 2015 roku tj. UR-144 czy XLR-11, pojawiły się MDMB-CHMICA, AB-CHMINACA, czy 5F-ADB.

Do dnia dzisiejszego, na dopalaczowym rynku Polski pojawiło się kilkadziesiąt nowych substancji psychoaktywnych, których posiadanie, wytwarzanie i dystrybuowanie nie jest regulowane przez Ustawę o przeciwdziałaniu narkomanii.

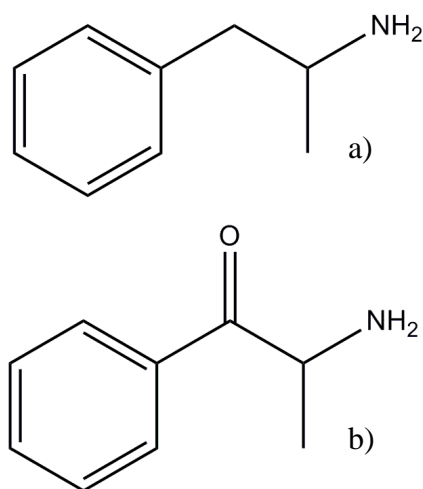
2. Pochodne katynonu

Pochodne katynonu są obok syntetycznych kannabinoidów obecnie jedną z najczęściej występujących i identyfikowanych grup nowych związków psychoaktywnych na całym świecie. Ze względu na ich największą dostępność i różnorodność na rynku pseudonarkotykowym, wśród doniesień literaturowych dotyczących zatruc śmiertelnych

dopalaczami, najczęściej pojawia się związanych z pochodnymi katynonu. W trakcie prowadzonych badań na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej największa uwaga zostaje poświęcona tej właśnie grupie substancji.

2.1 Katynon

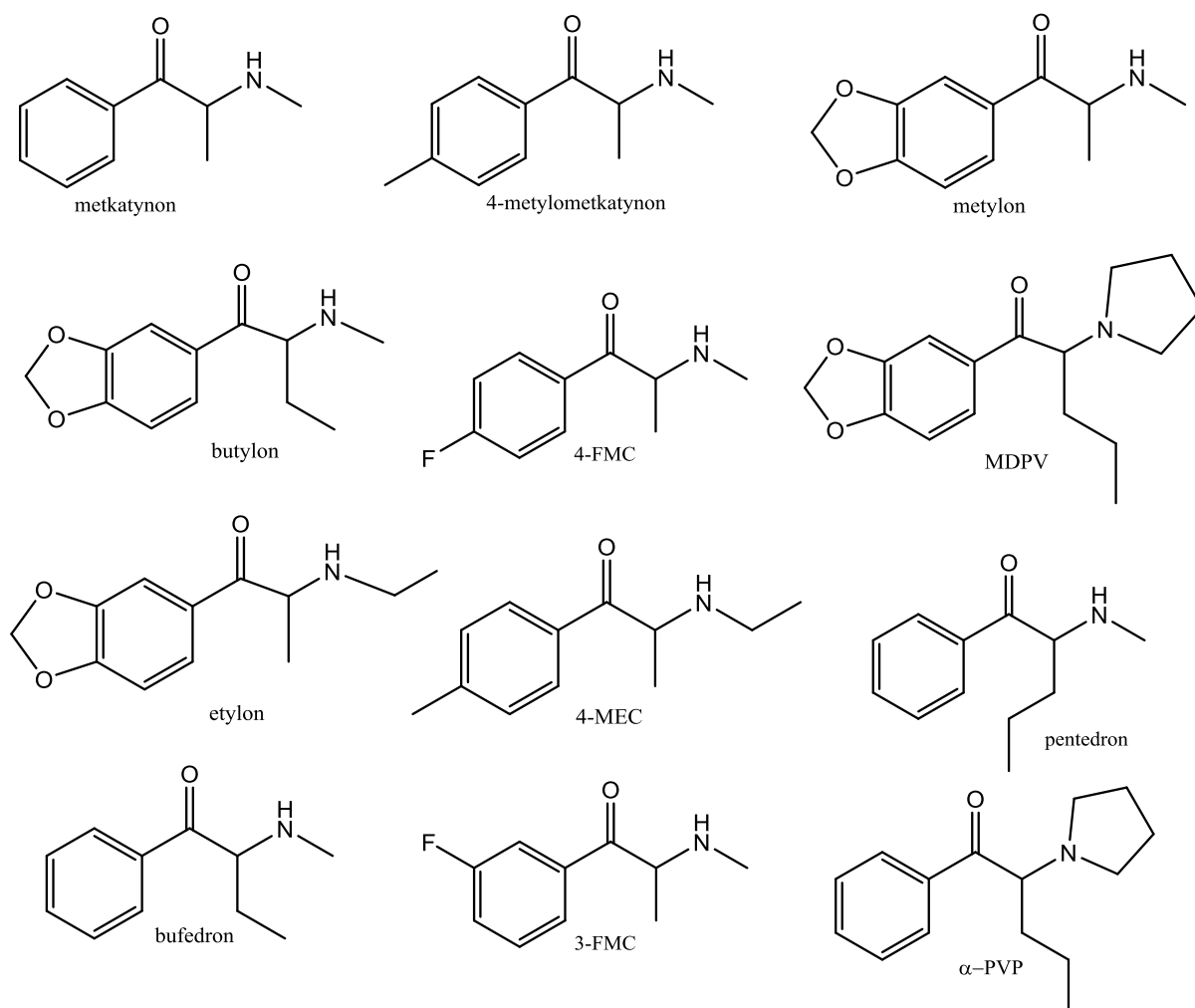
Katynon to jeden z aktywnych biologicznie alkaloidów Czuwaliczki jadalnej (*Catha edulis*). Roślina ta znana i wykorzystywana jest od wieków przez mieszkańców wschodniej Afryki oraz północno-wschodniej części Półwyspu Arabskiego ze względu na swoje właściwości psychoaktywne. Rzucie świeżo zerwanych liści khat, które uwalnia z nich oddziaływujący na ośrodkowy układ nerwowy katynon, w wielu regionach uznawane jest za rodzaj kultu i lokalnej tradycji [9 - 11]. Ze względu na swoje strukturalne podobieństwo do amfetaminy (Rys. 1.), katynon często określany jest mianem „naturalnej amfetaminy” – jedyną różnicą w budowie cząsteczki, jest obecność wiązania karbonylowego w pozycji $-\beta$ łańcucha bocznego. Podobnie jak amfetamina, katynon i jego analogi wykazują działanie stymulujące, euforyzujące i empatogenne.



Rys. 1. Strukturalne podobieństwo amfetaminy a) i katynonu b)

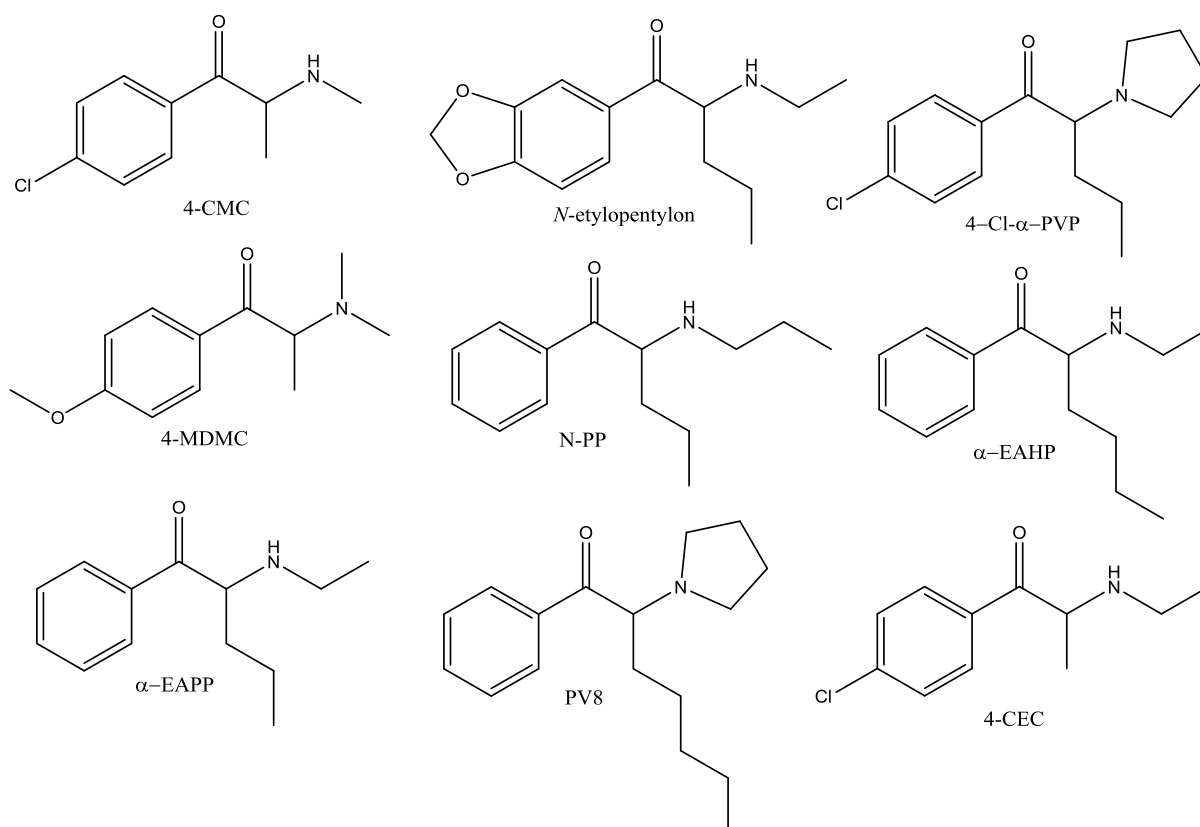
Syntetyczne katynony, zsyntezowane po raz pierwszy w latach 20' XX wieku jako potencjalne produkty lecznicze (parkinsonizm, otyłość, depresja), przeszły do rekreacyjnego użytku konsumenckiego, jako zastępstwo narkotyków na początku XXI wieku. Prekursorami tej grupy na nielegalnym rynku po roku 2000 były CAT (metkatynon) oraz 4-MMC

(4-metylometkatynon, mefedron), a następnie metylon (3, 4-metylenodioksy-*N*-metylokatynon) i MDPV (3, 4-metylenodioksy-pyrowaleron) [6, 10, 11]. Z czasem, gdy stopniowo związki te zostały dobrze scharakteryzowane, a następnie w wielu krajach uznane za zakazane, syntetycy modyfikowali ich struktury tworząc nowe analogi. Kolejnymi syntetycznymi katynonami wykorzystywanymi jako substytuty narkotyków były butylon, etylon, bufedron oraz jego analog – pentedron, który niebawem został zastąpiony izomerem konstytucyjnym tj. 4-MEC (4-metylo-*N*-etylokatynon). W tym samym czasie struktura mefedronu była modyfikowana o nowe podstawniki w pierścieniu aromatycznym i tak w roku 2009 scharakteryzowany został 4-FMC (4-fluorometkatynon, flefedron) oraz jego izomer pozycyjny 3-FMC (3-fluorometkatynon). Oprócz pentedronu, będącego syntetycznym katynonem trzeciej generacji, pojawił się w tej samej grupie α -PVP (α -pirolidynowalerofenon) [6].



Rys. 2. Struktury chemiczne wybranych, najpopularniejszych do roku 2015 pochodnych katynonu

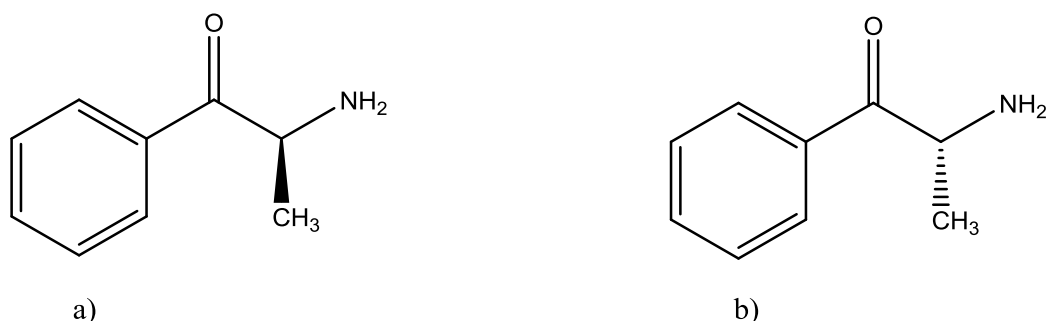
Ostatnia nowelizacja Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 24 kwietnia 2015 roku ujęła kolejne dopalacze z grupy pochodnych katynonu, jako substancje psychotropowe. Wśród nich znalazły się m.in. 3-MMC (3-metylometakatynon), α -PVP (α -pirolidynowalerofenon), α -PHP (α -pirolidynoheksanofenon), 4-Cl- α -PPP (4-chloro- α -pirolidynopropiofenon), pentedron. W zamian za popularne wcześniej na rynku pseudonarkotykowym, wymienione wyżej substancje, pojawiły się z dnia na dzień nowe, nie ujęte w wykazie substancji zakazanych Ustawą tj. między innymi: 4-CMC (4-chlorometkatynon), *N*-etylopentylon, 4-Cl- α -PVP (4-chloro- α -pirolidynowalerofenon), 4-MDMC (4-metylo-*N,N*-dimetylokatynon), *N*-PP (α -propyloaminopentiofenon), α -EAHP (α -etyloaminoheksanofenon), α -EAPP (α -etyloaminopentiofenon), α -PHPP (PV8, α -pirolidynooktanofenon) czy 4-CEC (4-chloroetkatynon).



Rys. 3. Struktury chemiczne wybranych nowych pochodnych katynonu, obecnych na rynku po nowelizacji Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii w 2015 roku

2.2 Mechanizm działania i metabolizm pochodnych katynonu

W badaniach *in vitro* wykazano, iż syntetyczne katynony posiadają wysoką przepuszczalność bariery krew – mózg [11]. Katynon oraz jego pochodne, jako β -ketoamfetaminy wykazują stymulujące i sympatomimetyczne działanie na ośrodkowy układ nerwowy, co związane jest ze zwiększeniem stężenia katecholamin w przestrzeniach międzysynapsalnych, jednakże działanie to jest znacznie silniejsze niż amfetaminy [8, 12-19]. Podobnie jak fenyloetyloaminy, katynony mogą występować w dwóch formach stereoizomerycznych, z których każda będzie charakteryzowała się różną siłą działania [2].



Rys. 4. Wzory strukturalne S(-)-katynonu a) i R(+)-katynonu b)

Mechanizm działania syntetycznych katynonów opiera się na inhibicji transporterów monoamin takich jak: transporter dopaminy (DAT), transporter noradrenaliny (NAT) oraz transporter serotoniny (SERT). W zależności jednak od rodzaju pochodnej, a ściślej od jej budowy strukturalnej, powinowactwo do tychże transporterów będzie inne. Selektywność w stosunku do poszczególnych monoamin rozróżnia syntetyczne katynony z punktu widzenia ich wpływu na przekazywanie nerwowe [12, 15, 19]. Simmler et al., na podstawie z jednej strony siły ich działania jako inhibitory wychwyty zwrotnego dopaminy, noradrenaliny i serotoniny, z drugiej - na podstawie ich zdolności do uwalniania neuroprzekaźników, zaklasyfikowali poszczególne pochodne do trzech grup [13]. Pierwszą z nich są związki o działaniu podobnym do kokainy i MDMA (3,4-metylenodioksymetamfetamina) określane jako „*cocaine - MDMA – mixed cathinones*”, gdzie mechanizm polega na względnie

nieselektywnej inhibicji wychwytu monoamin podobnie jak kokaina, wykazująca większą selektywność w stosunku to transportera dopaminy niż serotoniny oraz na indukcji uwalniania serotoniny, jak MDMA [13]. Substancjami znajdującymi się w tej grupie, jako kokainopodobne są mefedron, metylon, etylon, butylon oraz zbliżony natomiast do MDMA – nafyron. Zbiór drugi, to katynony metamfetamino - podobne „*metamphetamine - like cathinones*” działające na poziomie preferencyjnego wychwytu katecholamin oraz uwalniania dopaminy, gdzie jego przedstawicielami są metkatynon, fiefedron oraz klefedron [12, 13]. Trzeci rodzaj farmakologicznego wpływu na neuroprzeźnaczność prezentują syntetyczne katynony oparte na strukturze pirowaleronu „*pyrovalerone - cathinones*”, jak MDPV i MDPBP, które są bardzo silnymi i selektywnymi inhibitorami wychwytu amin katecholowych i nie wykazują działania uwalniającego neuroprzeźnaczności [12, 14].

Dla wymienionych mechanizmów działania syntetycznych katynonów na poziomie neuroprzeźnaczności, badanych i zdefiniowanych *in vitro*, charakterystyczne są objawy organizmu ludzkiego po przyjęciu tych związków [17]. Zakres i siła wpływu katynonów na ośrodkowy układ nerwowy są bardzo szerokie i zależą od wielu czynników, jak wiek, płeć, stopień uzależnienia, stan zdrowia, przyjmowane leki, inne środki odurzające bądź psychotropowe czy alkohol. Niemniej, subiektywne odczucia biorców są często podobne i określane jako silne pobudzenie, euforia, wzmożona empatia, zwiększona pewność i otwartość interpersonalna, wzrost libido [2, 6, 8, 9]. Jakkolwiek, zarówno chroniczne narażenie organizmu na działanie syntetycznych katynonów, jak i przyjęcie jednorazowe może być równie niebezpieczne dla zdrowia i życia. Konsumenci, jako niekorzystne dla nich efekty zażywania tych związków podają wymioty, pocenie się, zaburzenia pamięci krótkotrwałej, migreny i zawroty głowy, kołatanie serca, drżenie mięśni. Neurologicznie, nadużywanie może doprowadzić do zaburzeń i utraty pamięci, bezsenności, ataków paniki i agresji, halucynacji, depresji, a nawet psychoz z myślami samobójczymi [13]. Kardiologicznie, syntetyczne katynony powodują wzrost ciśnienia tętniczego krwi, zaburzenia rytmu serca, tachykardię, a w następstwie zatrzymanie akcji serca. Ponadto, jednymi z częstszych zaburzeń stanu zdrowia występujących przy narażeniu na działanie katynonów są hiponatremia, hipertermia, anemia i rabdomioliza [15].

Metabolizm syntetycznych katynonów jest względnie dobrze poznany dla związków, które były prekursorami w tej grupie narkotyków projektowanych. Metabolizm mefedronu

przedstawiony przez Meyer et al. [18] pokazuje *N*-demetylację do podstawowych amin, jako główną drogę rozkładu tego związku, która następnie polega na redukcji ugrupowania ketonowego do 4-metylonorefedryny oraz hydroksylacji grupy metylowej pierścienia aromatycznego, po których następuje oksydacja do odpowiedniego kwasu karboksylowego. Urales et al. [22] dokonali oznaczenia metabolitów 16 syntetycznych katynonów w ludzkim moczu po podzieleniu je na 3 grupy pochodnych. Pierwszą z nich były mefedron, bufedron, 4-metylobufedron, pentedron, 4-metylo-*N*-etylokatynon, *N*-etylobufedron, flefedron i etkatynon, które metabolizowały charakterystycznie dla swych prekursorów (metkatynonu i katynonu). W moczu osób przyjmujących te związki oznaczono substancje wynikające z procesu redukcji grupy β -ketonowej i *N*-dealkilacji, co przekładało się na występowanie dwóch diastereoizomerów norefedryny i efedryny, jako głównych metabolitów. Grupa druga to związki 3,4-metylenodioksydopodstawione (metylon, butylon, etylon), dla których proces β -keto redukcji był mniej intensywny niż w grupie poprzedniej, co może być efektem obecności grupy 3,4-metylenodioksydowej w pierścieniu aromatycznym. W analizowanym moczu zauważano obecność macierzystych substancji. W grupie trzeciej znalazły się pirolidynofenony, takie jak α -PVP i α -PBP (α -pirolidynobutiofenon), które nie metabolizowały na drodze redukcji grupy ketonowej, obecne były w moczu w formie niezmienionej, a jako ich metabolity zauważalne były produkty rozpadu pirolidyny do amin pierwszorzędowych [16, 20, 21]. Shima et al. [22] wykazali, że główne szlaki metaboliczne α -pirolidynofenonów zmieniają się znacząco w zależności od długości łańcucha alkilowego cząsteczki rodzicielskiej. Metabolizm PV9 różnił się znacząco od tych dla α -PVP i α -PBP. Ścieżki metaboliczne PV9 obejmowały redukcję grupy ketonowej do ich odpowiednich alkoholi, utlenianie pierścienia pirolidyny do odpowiedniego pirolidonu, alifatyczne utlenianie końcowego atomu węgla do odpowiadającej postaci karboksylanu i hydroksylację w przedostatnim atomie węgla do odpowiednich alkoholi, a następnie dalsze utlenianie do ketonów i kombinacje tych etapów.

2.3 Struktura chemiczna pochodnych katynonu

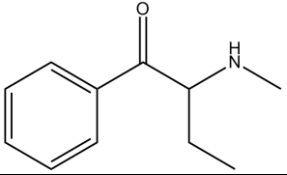
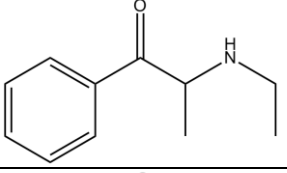
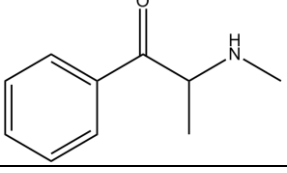
Struktury pierwszych syntetycznych katynonów są stale modyfikowane, przez co na nielegalnym rynku pojawia się co roku kilka nowych pochodnych. Z punktu widzenia

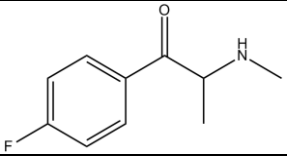
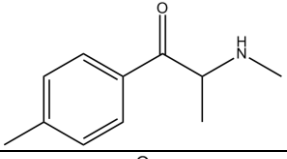
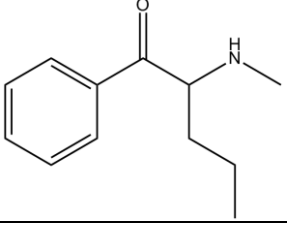
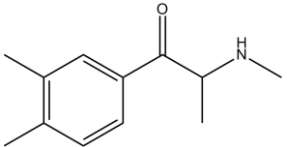
chemicznego i toksykologicznego wyzwaniem analitycznym staje się identyfikacja tychże substancji, a co za tym idzie rozwinięcie biblioteki o kolejne nowe struktury cząsteczek, ich właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne.

Wszystkie syntetyczne katynony opierają się na podstawowej budowie naturalnego katynonu i są pochodnymi fenyloalkiloamin, strukturalnie przypominającymi cząsteczkę amfetaminy z wiązaniem karbonylowym w pozycji α łańcucha amino-alkilowego podstawionego do pierścienia aromatycznego. Z punktu widzenia chemicznego, pochodne katynonu podzielone są na cztery grupy [13].

Pierwszą z nich stanowią związki *N*-alkilowe lub alkilowo i halogenowo podstawione w dowolnej pozycji pierścienia aromatycznego, których wybrane przykłady zostały zaprezentowane w Tabeli nr 1. W zbiorze tym znajdują się pierwsze z syntetycznych katynonów, tj. bufedron, etkatynon, efedron, flefedron, mefedron, pentedron oraz 3,4-dimetylometakatynon (3,4-DMMC).

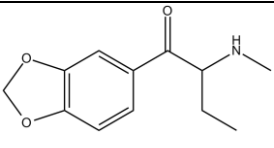
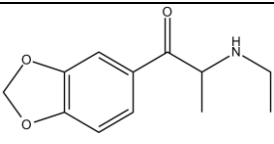
Tabela nr 1 Nazwy systematyczne, zwyczajowe i struktury cząsteczkowe wybranych pochodnych katynonu z grupy *N*-alkilowo i alkilowo i/lub halogenowo podstawionych w dowolnej pozycji pierścienia aromatycznego

Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Struktura chemiczna
[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-butan-1-onyl]-benzen	Bufedron, α -metyloaminobutyrofenon	
[2-(<i>N</i> -Etyloamino)-propan-1-onyl]-benzen	Etkatynon, ETCAT, <i>N</i> -etylokatynon	
[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-propan-1-onyl]-benzen	Efedron, metkatynon, CAT, α -metyloaminopropiofenon	

1-[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-propan-1-onyl]-4-fluorobenzen	Flefedron, 4-FMC, 4-fluorometkatynon	
1-[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-propan-1-onyl]-4-metylbenzen	Mefedron, 4-MMC, 4-metylometkatynon	
[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-pentan-1-onyl]-benzen	Pentedron, α -metyloaminowalerofenon	
1-[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-propan-1-onyl]-3,4-dimetylbenzen	3,4-DMMC, 3,4-dimetylometkatynon	

Grupa druga to metylenodioksy- podstawione związki w dowolnej pozycji pierścienia aromatycznego, do której należą m.in. pierwszy – butylon, metylon, pentylon, oraz jeden z najnowszych – *N*-etylopentylon. Swoją strukturą przypominają one bardziej 3,4-metylenodioksyamfetaminę i podobne również do niej wykazują działanie aktywne – Tabela nr 2. Kolejna grupa pochodnych katynonu to analogi z obecnym podstawnikiem *N*-pirolidynowym. Są to aktualnie jedne z najczęściej spotykanych na rynku narkotykowym środków zastępczych. Przykłady związków należących do tej grupy przedstawione zostały w Tabeli nr 3.

Tabela nr 2 Nazwy systematyczne, nazwy zwyczajowe i struktury cząsteczkowe wybranych pochodnych katynonu metylenodioksy- podstawionych w dowolnej pozycji pierścienia aromatycznego

Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Struktura chemiczna
1-[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-butan-1-onyl]-(3,4-metylenodioksy)-benzen	Butylon, bk-MBDB	
1-[2-(<i>N</i> -Etyloamino)-propan-1-onyl]-(3,4-metylenodioksy)-benzen	Etylon, bk-MDEA	

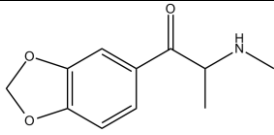
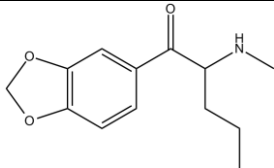
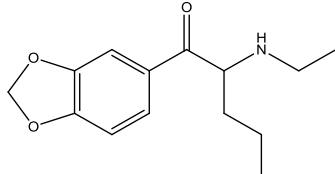
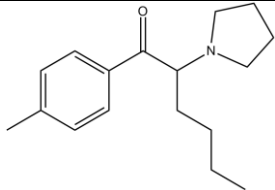
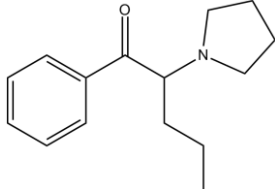
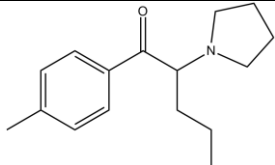
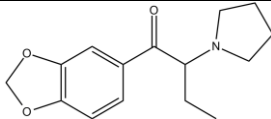
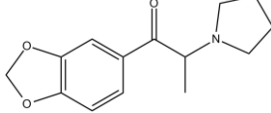
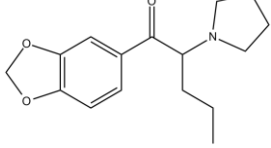
1-[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-propan-1-onyl]-(3,4-metylenodioksy)-benzen	Metylon, bk-MDMA	
1-[2-(<i>N</i> -Metyloamino)-pentan-1-onyl]-(3,4-metylenodioksy)-benzen	Pentylon, bk-MBDP	
1-[2-(<i>N</i> -Etyloamino)-pentan-1-onyl]-(3,4-metylenodioksy)-benzen	<i>N</i> -Etylopentylon	

Tabela nr 3 Nazwy systematyczne, nazwy zwyczajowe i struktury cząsteczkowe wybranych pochodnych katynonu z podstawnikiem *N*-pirolidynowym

Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Struktura chemiczna
1-[2-(Pirolidyn-1-yl)-heksan-1-onyl]-4-metylbenzen	MPHP, 4-metylo- α -pirolidynoheksanofenon	
1-[2-(Pirolidyn-1-yl)-pentan-1-onyl]-benzen	α -PVP, α -pirolidynowalerofenon	
1-[2-(Pirolidyn-1-yl)-pentan-1-onyl]-4-metylbenzen	Pirowaleron, 4-metylo- α -pirolidynowalerofenon	

Ostatnia grupa katynonów wyodrębniona na podstawie budowy chemicznej to ta, w której cząsteczki zawierają w swojej strukturze zarówno grupę metylenodioksyłową, jak i *N*-pirolidynową, jak np. 3-desoksy-3,4-metylenodioksy-pirowaleron (3-desoksy-3,4-MDPV) – Tabela nr 4.

Tabela nr 4 Nazwy systematyczne, nazwy zwyczajowe i struktury cząsteczkowe wybranych pochodnych katynonu z podstawnikiem *N*-pirolidynowym oraz grupą metylenodioksyłową w dowolnej pozycji pierścienia aromatycznego

Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa	Struktura chemiczna
1-[2-(Pirolidyn-1-yl)-butan-1-onyl]-3,4-metylenodioksybenzen	MDPBP, 3,4-metylenodioksy- α -pirolidynobutiofenon	
1-[2-(Pirolidyn-1-yl)-propan-1-onyl]-3,4-metylenodioksybenzen	MDPPP, 3,4-metylenodioksy- α -pirolidynopropiofenon	
1-[2-(Pirolidyn-1-yl)-pentan-1-onyl]-3,4-metylenodioksybenzen	MDPV, 3,4-metylenodioksypirowaleron	

2.4 Rozwój modyfikacji znanych struktur pochodnych katynonu

Ze względu na szerokie możliwości modyfikacji strukturalnych obecnych od dłuższego czasu na światowym rynku pseudonarkotykowym syntetycznych katynonów, stale pojawiają się związki nowe. Ich identyfikacja i charakterystyka fizykochemiczna stanowi wyzwanie analityczne dla chemików. Dzięki wymianie informacji o nowych pochodnych, zarówno dotyczących ich pełnych charakterystyk, metod identyfikacji w różnego rodzaju materiałach, jak i przypadków zatruc nimi, analiza toksykologiczna jest dziedziną dynamiczną i stale rozwijającą się. Począwszy od roku 2000, w którym pojawiły się pierwsze syntetyczne katynony [1, 8, 10], w literaturze światowej stale pojawiają się doniesienia o nowych pochodnych [4, 6, 9]. W ciągu ostatnich czterech lat opisano kilkanaście nowych związków z grupy pochodnych katynonu [4]. Do roku 2014, jedną z najpopularniejszych na rynku dopalaczowym było α -PVP. W Polsce, związek ten został uznany za substancję psychotropową i umieszczony na liście związków zakazanych Ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii 24 kwietnia 2015 roku [26]. Już na początku roku 2014 zidentyfikowano metoksy-pochodną znanego dotąd α -PVP, tj. 4-Metoksy- α -PVP. Związek ten został oznaczony w produkcie zawierającym dodatkowo 4-Metylobufedron. W literaturze światowej pojawiły się również dane fizykochemiczne i analityczne kolejnych 7 nowych pochodnych

katynonu, wśród których znalazły się pochodne α -PVP, jak MPHP (4-Metylo- α -pirolidynoheksylofenon), α -PHPP (α -Pirolidynoheptanofenon, PV8), α -POP (α -Pirolidynooktanofenon, PV9), 3,4-Dimetoksy- α -PVP (3,4-Dimetoksy- α -pirolidynopentiofenon), 4-Fluoro- α -PVP (4-Fluoro- α -pirolidynopentiofenon) oraz inne, jak α -EAPP (α -Etylaminopentiofenon) i *N*-Etylo-4-metylopentredon (4-Metylo- α -etylaminopentiofenon) [27]. Na podstawie przeglądu literaturowego można zauważyć trend podstawiania pierścienia aromatycznego znanych struktur pochodnych katynonu różnego rodzaju podstawnikami. I tak, kolejnymi scharakteryzowanymi w ostatnim czasie w literaturze związkami są 4-Metoksy- α -POP (4-Metoksy- α -pirolidynooktanofenon), 4-Metoksy- α -PHPP (4-Metoksy- α -pirolidynoheptanofenon) oraz 4-Fluoro- α -PHPP (4-Fluoro- α -pirolidynoheptanofenon) [28]. W pierwszej połowie roku 2015, w literaturze pojawiła się pierwsza charakterystyka nowoodkrytych tienylowych pochodnych katynonu, takich jak α -PBT (α -pirolidynobutiotiofenonu) oraz bromotienylowych pochodnych α -PBT i α -PVT (α -pirolidynopentiotiofenonu) [29]. W kolejnym roku, światowe dane dotyczące pochodnych katynonu uzupełnione zostały o 9 nowych związków takich jak *N*-etyloheksedron, 4-Cl-pentredon, 4-Cl-EAPP, Propylon, 6-MeO-bk-MDMA, α -PiHP, 4-Cl- α -PHP i 4-F- α -PHP [30]. W ubiegłym roku zaś, bibliotekę danych analitycznych uzupełniono o heksedron, 4-BEC, 4-Cl-PPP, 4-Br-PVP [29] i 4-MPD, F-PHP oraz bk-EPDP [32]. Ponadto, zauważyć można tendencję występowania mieszanin różnych związków w danych produktach. Zazwyczaj są to mieszaniny dwu- i trójskładnikowe, zawierające nie tylko związki z jednej grupy pochodnych, ale również kilku różnych np. syntetycznych katynonów z syntetycznymi kannabinoidami [28]. W związku z nieznanym mechanizmem działania oraz toksycznością każdej z nowych substancji psychoaktywnych, ich połączenie może wiązać się z wzajemnym synergistycznym działaniem, co sprawia, że produkty takie stają się wyjątkowo niebezpieczne dla zdrowia i życia potencjalnego biorcy.

W Tabeli nr 5 przedstawiono nazwy zwyczajowe, masy cząsteczkowe, jony prekursorowe oraz fragmentacyjne $[M+H^+]$ uzyskane w wyniku analizy techniką ESI-MS, a także jony podstawowe i pozostałe uzyskane w wyniku analizy techniką EI-MS najnowszych pochodnych katynonu tj. opisanych w literaturze w ciągu ostatnich 4 lat.

Tabela nr 5 Nazwy zwyczajowe, masy cząsteczkowe, jony prekursorowe i jony fragmentacyjne dla jonizacji typu ESI-MS oraz jony podstawowe i pozostałe dla jonizacji typu EI-MS najnowszych, opisanych w ciągu ostatnich 5 lat pochodnych katynonu

Nazwa zwyczajowa	Masa cząsteczkowa [Da]	Jon prekursorowy oraz jony fragmentacyjne [M+H ⁺] uzyskane techniką LC-ESI-MS ⁿ [m/z]	Jon podstawowy oraz pozostałe uzyskane techniką GC-EI-MS [m/z]
Heksedron, HEX	205.15	206 , 188, 132, 175, 100, 105, 119, 91	100 , 77, 69, 44, 58
4-Cl-Pentedron	225.10	226 , 144, 208, 125, 166, 164, 178, 173, 131, 138	86 , 44
4-Metylo-pentedron, 4-MPD	205.15	206 , 188, 158, 146, 145, 144, 131, 130	86
α-EAPP	205.30	206	100 , 77
N-Etyloheksedron	219.17	220 , 130, 202, 146, 91, 158, 175	114 , 105, 58
4-Cl-EAPP	239.12	240 , 158, 164, 125, 180, 138, 187, 145, 195, 192	100 , 58
4-Bromoetkatynon, 4-BEC	255.03	256/258 , 159, 144, 132	72 , 44, 185, 155
N-Etylo-4 metylpentedron	219.32	220	100 , 91
N-Etylnorpentylon	249.14	250 , 202, 189, 232, 175, 203, 149, 173	100 , 149, 91, 58
bk-EPDP	249.14	250 , 232, 202, 205, 189, 174, 172, 160, 149, 135	149 , 121
Propylon	235.13	236 , 188, 146, 218, 175, 160, 118	86 , 149, 135, 121, 44

6-MeO-bk-MDMA	237.11	238 , 190, 175, 58	58 , 204, 179
α -PHP	245.36	246 , 228, 175	140 , 141, 105, 96, 77
α -PiHP	245.19	246 , 140, 91, 119	140 , 188, 98, 84
α -PHPP, PV8	259.39	260	154 , 105, 77
α -POP, PV9	273.41	274	168 , 105, 77
4-F- α -PVP	249.32	250	126 , 95
4-F- α -PHP	263.18	264 , 140, 123, 109, 190, 137	140 , 123, 96, 84, 69
4-F- α -PHPP	277.38	278	154 , 123, 95
4-F- α -PV9, 4-F- α -POP	291.40	292 , 274, 221, 203, 189	168 , 169, 123, 110, 95, 84, 55
4-Cl- α -PPP	237.10	238 , 167, 185, 139, 98	98 , 56, 111, 69
4-Cl- α -PHP	279.15	280 , 125, 140, 138, 209	140 , 111, 84
4-Br-PVP	309.08	310/312 , 160, 126, 168, 131, 183	126 , 183, 155, 84
4-Metoksy- α -PVP	261.36	262	126 , 135, 107
4-Metoksy- α -PHPP	289.41	290	154 , 135
4-Metoksy- α -POP	303.44	304	168 , 135
3,4-Dimetoksy- α -PVP	291.39	292	126 , 137, 165
Tiotinon	169.24	170	58 , 83, 111
α -PBT	223.33	224	-
5-Br- α -PBT 4-Br- α -PBT 3-Br- α -PBT	302.23	302/304	112

5-Br- α -PVT	316.26	316/318	126, 189, 191
4-Br- α -PVT	316.26	316/318	126, 189, 191
3-Br- α -PVT	316.26	316/318	126, 189, 191
4,5-Br- α -PVT	395.15	393/395	126, 267, 269, 271

3. Techniki instrumentalne wykorzystywane do identyfikacji substancji psychoaktywnych

Stale poszerzający się o nowe związki rynek pseudonarkotykowy, staje się wyzwaniem analitycznym w kontekście ich charakterystyki fizykochemicznej oraz identyfikacji w materiale biologicznym. Oprócz pierwszego, kluczowego etapu, jakim jest przygotowanie próbek do analizy, istotne są techniki analityczne wykorzystywane do oceny ich składu. Rozwój i doskonalenie technik chromatograficznych i spektroskopowych oraz wprowadzanie aparatury zdolnej do identyfikacji setek związków w stężeniach nanomolowych, może przyczynić się do poszerzenia zakresu badań toksykologicznych w kierunku obecności nie tylko wszystkich znanych i stale zmieniających się cząsteczek, ale również ich metabolitów. Każda ze stosowanych technik ma swoje możliwości i zalety, jak również pewne ograniczenia. Połączenie ich jednak, daje skuteczne narzędzie do identyfikacji i analizy ilościowej tak materiału rzeczowego, jak i biologicznego. W przypadku syntetycznych katynonów, najczęściej stosowanymi technikami są chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia cieczowa (LC) sprzężone z różnymi technikami spektroskopowymi.

3.1 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) to obok chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem masowym najczęściej wykorzystywana technika w analizie toksykologicznej. Wiele związków psychoaktywnych, w tym katynonów, może być identyfikowana tą techniką ze względu na ich właściwości lotne [34 - 40]. Dodatkowo, sam czas trwania analizy jest stosunkowo krótki [36]. W przypadku techniki GC-MS spotyka się wykorzystanie jonizacji chemicznej (CI) [36], zdecydowaną większość jednak stanowią analizy oparte na jonizacji typu elektron - impakt (EI) [34 - 38]. W trybie dodatnim GC-MS widma masowe syntetycznych katynonów są bardzo proste i widoczne są na nich piki bazowe pochodzące od sygnałów jonów iminowych, co de facto sprawia, że identyfikacja różnych pochodnych staje się dość trudna. Rozszerzenie technik oznaczania o inne różnego rodzaju detekcje np. tandemową spektroskopię mas, która dostarcza więcej informacji o strukturze cząsteczki, pomaga w skutecznej identyfikacji. W roku 2012 opisana została procedura

postępowania analitycznego w przypadku oznaczania syntetycznych katynonów techniką GC-EI-MS [35]. Jeżeli, jak wspomniano wyżej, na spektrum masowym pojawi się pik molekularny odpowiadający jonowi iminowemu ($m/z = 16 + 14n$, gdzie $n = 1, 2, 3$ itd.) można przypuszczać, iż w analizowanej próbce znajduje się katynon o łańcuchu prostym. Jeżeli z kolei na widmie masowym obecny będzie pik odpowiadający jonowi pirolidynowemu ($m/z = 70 + 14n$, gdzie $n = 1, 2, 3$ itd.), substancją identyfikowaną będzie katynon z ugrupowaniem pirolidynowym. W związku z możliwością występowania wielu regioizomerów różnych pochodnych katynonu, istotne jest określenie długości łańcucha alkilowego oraz rodzaju podstawienia go, lub odpowiednio podstawienia w pierścieniu aromatycznym. Dla niepodstawionych pierścieni zaobserwowano występowanie jonów fragmentacyjnych $m/z = 70$ i $m/z = 105$ oraz $m/z = 91$ i $m/z = 119$ dla pierścienia metylofenylowego, a także $m/z = 121$ i $m/z = 149$ dla pierścieni podstawionych grupą metylenodioksyłową. Technika GC-EI-MS jest szybką do wykonania, niemniej, możliwość fragmentacji w identyczny sposób niektórych izomerów oraz niska intensywność jonów molekularnych w jonizacji typu EI stwarza konieczność posłużenia się innym rodzajem metody spektrometrii masowej [35].

Wysoce skuteczną techniką rozróżnienia pewnych regioizomerów pochodnych katynonu jest chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas GC-EI-MS/MS [43]. Zastosowanie takiego sprzężenia technik pozwala na opracowanie metody fragmentacji jonów iminowych, która umożliwi wyraźne rozróżnienie pochodnych katynonu z tym samym ugrupowaniem aminoalkilowym. Na przykład, analiza pentedronu, *N*-etylobufedronu, 4-metylo-*N*-dimetylobufedronu i *N*-etylometkatynonu wykazała, że wtórna i trzeciorzędowa fragmentacja jonu iminowego są potrzebne do różnicowania i identyfikacji struktur chemicznych.

3.2 Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS)

Chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją mas (LC-MS) jest równie często wykorzystywaną w laboratoriach toksykologicznych techniką analityczną jak GC-MS, ze względu na swoją wysoką czułość i selektywność. Większość analiz prowadzona jest w trybach monitorowania reakcji wielokrotnych tj. multiple reaction monitoring (MRM) oraz monitorowania wybranych reakcji tj. selected reaction monitoring (SRM), a najczęściej

spotykanym typem jonizacji jest electrospray (ESI). Dla syntetycznych katynonów przeprowadzono wiele analiz wykorzystujących spektrometrię mas w trybie ESI-MSⁿ, podczas których zauważono charakterystyczne dla nich sposoby fragmentacji jonów pseudomolekularnych – utratę cząsteczki wody z podstawowej struktury związku oraz charakterystyczne odejście pierścienia pirolidynowego [44, 45].

Innym przykładem techniki oznaczania związków występujących w dopalaczach, jest ultra-wysokosprawna chromatografia cieczowa (UHPLC) sprzężona ze spektrometrem masowym z analizatorem czasu przelotu (TOF – MS) lub również jej odmiana z jednym lub kilkoma kwadrupolami – UHPLC – QTOF – MS [44]. Stosując te techniki możliwa jest analiza związków (między innymi pochodnych katynonu) występujących w wielu próbkach w postaci tabletek, kapsulek, proszków i suszy roślinnych. Sprawdzają się one zarówno w analizie celowanej („*target analysis*”), jak i nie celowanej („*non-target analysis*”), gdzie każdy kolejny oznaczony związek traktowany jest jako substancja nieznana. Korzystne z punktu widzenia metod opartych na QTOF – MS jest to, że nie ma potrzeby posiadania referencyjnych standardów w początkowej fazie badań, co pozwala na wstępną identyfikację oznaczonych związków.

III. Cel pracy

Celami realizowanymi w trakcie niniejszej rozprawy doktorskiej są:

- Opracowanie efektywnych procedur izolacji nowych substancji psychoaktywnych z matryc proszkowych;
- Identyfikacja i charakterystyka fizykochemiczna nowych substancji psychoaktywnych (NPS) w materiałach rzeczowych w postaci proszków metodami chromatograficznymi i spektroskopowymi (HPLC-MS, GC-MS, MS/MS, ^1H NMR i ^{13}C NMR);
- Identyfikacja i oznaczenie ilościowe nowych substancji psychoaktywnych (NPS) w pośmiertnym materiale biologicznym pobranym w czasie sekcji zwłok osób, co do których zachodzi podejrzenie zatrucia dopalaczami;
- Utworzenie biblioteki danych analitycznych dotyczących ukazujących się na rynku pseudonarkotykowym najnowszych pochodnych katynonu przy założeniu możliwego występowania ciągłej modyfikacji ich podstawowych struktur, która może zostać wykorzystywana w laboratoriach sądowych i kryminalistycznych.

IV. Glosariusz

- DSC (*ang. Differential Scanning Calorimetry*) skaningowa kalorymetria różnicowa
- ELISA (*ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) test immunoenzymatyczny
- GC-MS (*ang. Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*) chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
- HPLC – (*ang. High Performance Liquid Chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa
- HPLC-DAD – (*ang. High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detector*) wysokosprawna chromatografia cieczowa z detektorem diodowym
- HPLC-MS – (*ang. High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*) wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem masowym
- HR-MS (*ang. High Resolution – Mass Spectrometry*) – wysokorozdzielcza spektrometria mas
- MS/MS – (*ang. Tandem Mass Spectrometry*) tandemowa spektrometria mas
- ¹HNMR – protonowy jądrowy rezonans magnetyczny
- ¹³CNMR – węglowy jądrowy rezonans magnetyczny
- NPS – nowe substancje psychoaktywne
- TGA (*ang. Thermogravimetric analysis*) analiza termogravimetryczna

V. Badania własne

1. Wykaz stosowanej aparatury i odczynników

Wykaz stosowanych odczynników:

- aceton – Sigma Aldrich, klasa czystości: do HPLC i MS,
- acetonitryl – Sigma Aldrich, klasa czystości: do HPLC i MS,
- amoniak, roztwór 25% – Sigma Aldrich, klasa czystości: cz. do HPLC,
- bufor TRIS - Sigma Aldrich
- chlorek metylenu – POCH, klasa czystości: cz.d.a.,
- chloroform – Sigma Aldrich, klasa czystości: cz.d.a.,
- heksan – POCH, klasa czystości: cz.d.a.,
- kwas mrówkowy, roztwór 0,1 M – Sigma Aldrich, klasa czystości: cz.d.a.,
- kwas octowy, roztwór 80% – POCH, klasa czystości: cz.d.a.,
- metanol – Sigma Aldrich, klasa czystości: do HPLC i MS,
- mrówczan amonu – Sigma Aldrich, klasa czystości: do HPLC i MS,
- octan etylu – POCH, klasa czystości: cz. do HPLC,
- woda dejonizowana (Chromasolv) – Sigma Aldrich,
- Testy immunoenzymatyczne ELISA – Neogen
- Roztwory wzorców α -PHP, 4F-PV9, α -propyloaminopentiofenone - CaymanChem

Wykaz stosowanej aparatury:

- Waga analityczna RadWag, czułość 0,0001 g,
- Ultrasprawy chromatograf cieczowy Dionex Ultimate 3000 (Dionex),
- Spektrometr masowy ze źródłem jonizacji typu elektrosprej Thermo LCDecaXP Plus (Thermo Scientific),
- Spektrometr masowy TSQ Endura (Thermo Scientific),
- Oprogramowanie do obsługi chromatografu i spektrometru: Xcalibur v 4.0 oraz LCQTune (Thermo Scientific)
- Chromatograf gazowy Trace 1310 (Thermo Scientific)
- Spektrometr masowy TSQ 3000 (Thermo Scientific)

- Magnetyczny rezonans jądrowy NMR – UltraShield 400 MHz (Bruker)
- TGA – analizator TGA/DSC₁ Mettler Toledo (Mettler Toledo)
- DSC – aparat TA-DSC 2010 (TA Instruments)
- Spektrometr UV-VIS – Perkin Elmer Spektrum One (Perkin Elmer)

2. Materiał do badań

Materiałem wykorzystywanym do badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej są dowody rzeczowe zabezpieczane przez Policję, Prokuraturę oraz Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne, jak również materiał biologiczny pobrany pośmiertnie od osób, które zażyły bądź przedawkowały nowe substancje psychoaktywne.

3. Identyfikacja nowych pochodnych katynonu α -PHP i 4F-PV9

3.1 Materiał do badań

Materiał poddawany analizie stanowiły dwa dowody rzeczowe w postaci proszków zabezpieczonych przez organy ścigania na terenie województwa śląskiego pod koniec 2014 roku i przekazane do analizy toksykologicznej. Jeden z nich stanowił jednolity, białoróżowy proszek – próbkę oznaczono nr 1, drugi - zbrylony beżowy proszek – oznaczono jako próbkę nr 2.

3.2 Przygotowanie prób do analizy

Celem opracowania efektywnej procedury ekstrakcji substancji psychoaktywnych z matrycy proszkowej próbki poddano próbie rozpuszczalnikowej. W tym celu odważono dla każdego z proszku 7 próbek po 10 mg każda i poddano próbie rozpuszczalności w 1 ml następujących rozpuszczalników: aceton, woda dejonizowana, metanol, chlorek metylenu, heksan, acetonitryl oraz mieszanina acetonitryl – metanol (50 : 50, v/v). Każdą z prób poddawano działaniu ultradźwięków przez okres 10 minut i odwirowywano. Następnie wszystkie próbki rozcieńczono pobierając 10 μ l każdej i dodawano 990 μ l poszczególnych

rozpuszczalników – wyjątek: próbki rozpuszczone początkowo w mieszaninie acetonitryl – metanol rozcieńczono mieszaniną acetonitryl – woda (20 : 80, v/v). Tak przygotowane ekstrakty przeniesiono w ilości po 150 µl do szklanych insertów i poddano analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS). Na podstawie otrzymanych chromatogramów i ich porównania ustalono, że najefektywniejszą metodą izolacji substancji jest roztworzenie w mieszaninie acetonitryl – metanol (50 : 50, v/v), a następnie rozcieńczenie w mieszaninie acetonitryl – woda (20 : 80, v/v). Otrzymane w ten sposób ekstrakty analizowano również techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem UV-VIS (HPLC-DAD) oraz techniką tandemowej spektrometrii mas w trybie bezpośredniego nastrzyku do detektora (ESI-MSⁿ).

W celu przeprowadzenia analizy techniką ¹HNMR oraz ¹³CNMR po 10 mg każdego z proszków roztwarzano w 0,6 ml deuterowanego chloroformu. Do analizy UV-VIS, 10 mg próby roztwarzano w 1 ml metanolu. Analiza TGA i DSC była przeprowadzana bez wcześniejszego przygotowania analizowanych materiałów w postaci proszków.

3.3 Metodyka badań

3.3.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS) i detektorem diodowym (HPLC-DAD)

Do analizy techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystano kolumnę Hypersil RP C18 (150 x 4,6 mm, Thermo Scientific). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina odczynnika A (0,02 M wodny roztwór kwasu mrówkowego i 0,05 M roztwór wodny mrówczanu amonu) oraz odczynnika B (10 % roztworu A i 90% acetonitrylu). Analiza była prowadzona w następującym przepływie gradientowym - 0–2 min, 95 % (A) + 5 % (B); 2–30 min, 30 % (A) + 70 % (B); 30–32 min, 30 % (A) + 70 % (B); 32–40 min, stosunek objętościowy wracał do wyjściowego tj. 95 % (A) + 5 % (B). Przepływ fazy ruchomej wynosił 100 µl/min. Źródłem jonizacji analitów był elektrosprej w trybie jonizacji dodatniej (ESI(+)-MS). Temperatura źródła jonizacji wynosiła 250 °C, gazem nośnym i do jonizacji były odpowiednio azot i hel.

3.3.2 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Analiza GC-MS prowadzona była z zastosowaniem kolumny Rxi[®]-5Sil MS (Restek, Bellefonte, PA, USA) w następujących warunkach: temperatura injektora, 260 °C; temperatura pieca, 100 °C przez 2 min, następnie wzrost o 20 °C/min do 260 °C; hel jako gaz nośny przy przepływie 1,2 ml/min; temperatura źródła spektrometru masowego, 250 °C; objętość nastrzyku, 1 µl.

Otrzymane widma masowe w jonizacji typu elektron impakt (EI) porównywane były z biblioteką widm masowych EI Cayman Chemical (2015) Cayman spectra library [44].

3.3.3 Tandemowa spektrometria mas MSⁿ

Źródłem jonizacji analitów był elektrosprej. Fragmentację ESI-MS² oraz ESI-MS³ jonów prowadzono w trybie dodatnim (ESI(+)-MS) w zakresie monitorowania wartości od m/z 50 – m/z 500. Temperatura źródła wynosiła 250 °C, energia kolizji w zakresie od 15 – 45%, gaz nośny stanowił azot, gaz jonizujący – hel, przepływ analitu 8 µl/min.

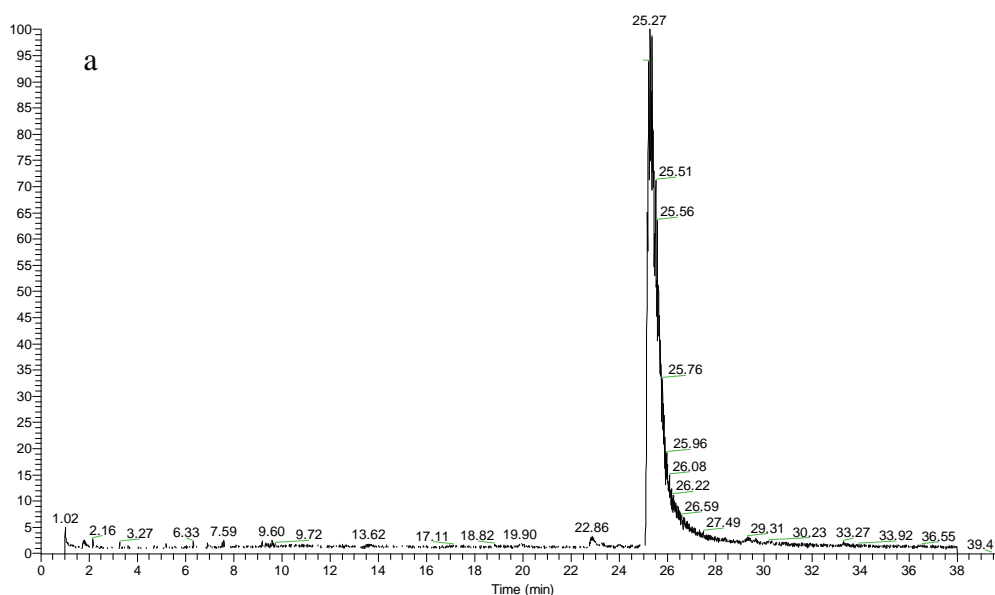
3.3.4 Analiza termograwimetryczna (TGA) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

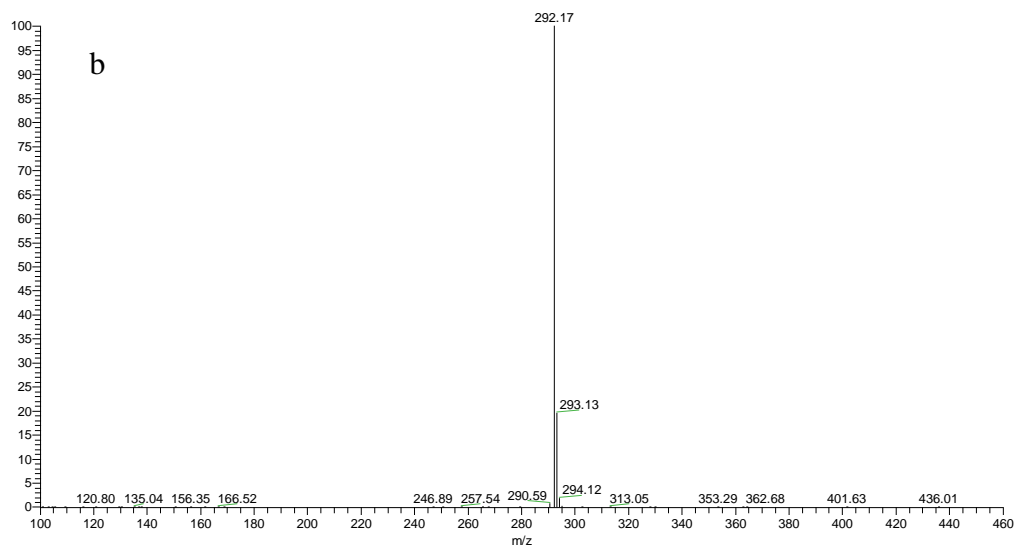
Analiza prowadzona była przy szybkości ogrzewania 10 °C/min w strumieniu azotu (60 cm³/min). Analiza DSC prowadzona była również w strumieniu azotu, z zastosowaniem aluminiowych próbek, w zakresie temperaturowym od –70 °C do temperatury całkowitego stopnienia.

3.4 Wyniki badań dla pochodnej 4F-PV9

3.4.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

W wyniku przeprowadzonej analizy ekstraktu nr 1 otrzymano chromatogram z widocznym pikiem przy czasie retencji równym 25,27 min. Na chromatogramie nie zaobserwowano innych pików, co wskazywało na dużą czystość analizowanego proszku. Rys.5. przedstawia chromatogram (a) sprzężony ze spektrum masowym (b), na którym omawianemu pikowi odpowiada jeden intensywny jon o wartości m/z równej 292,19. W związku z tym, że omawiany jon pseudomolekularny jest jodem protonowanym $[M+H^+]$, masa cząsteczkowa analizowanego związku równa jest 291,19 Da.

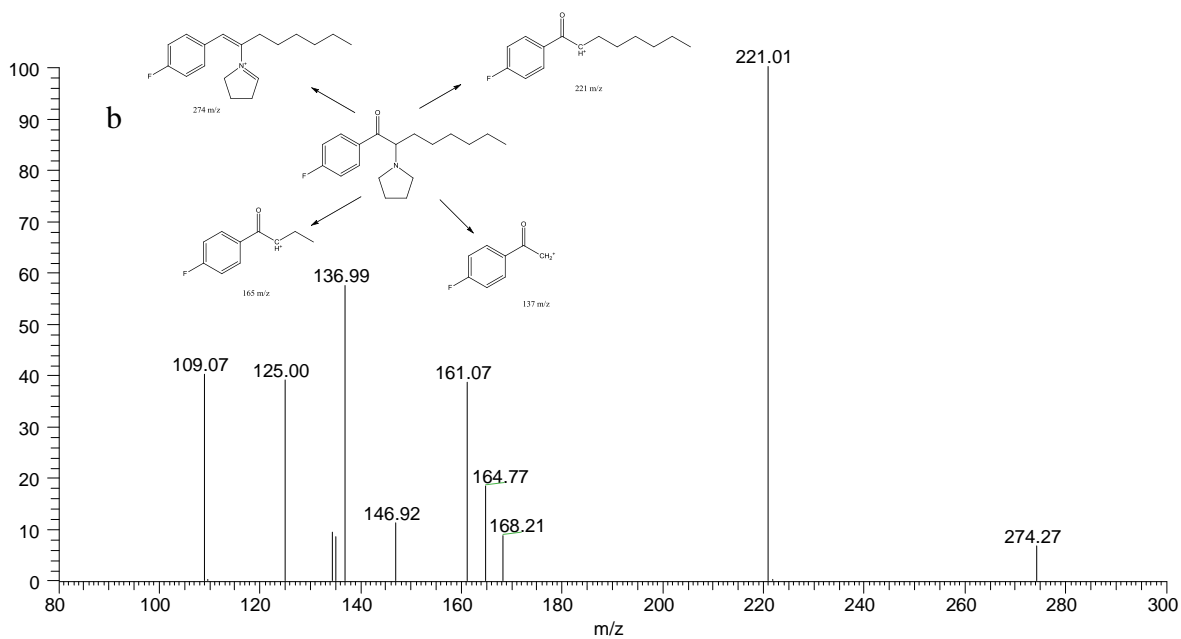
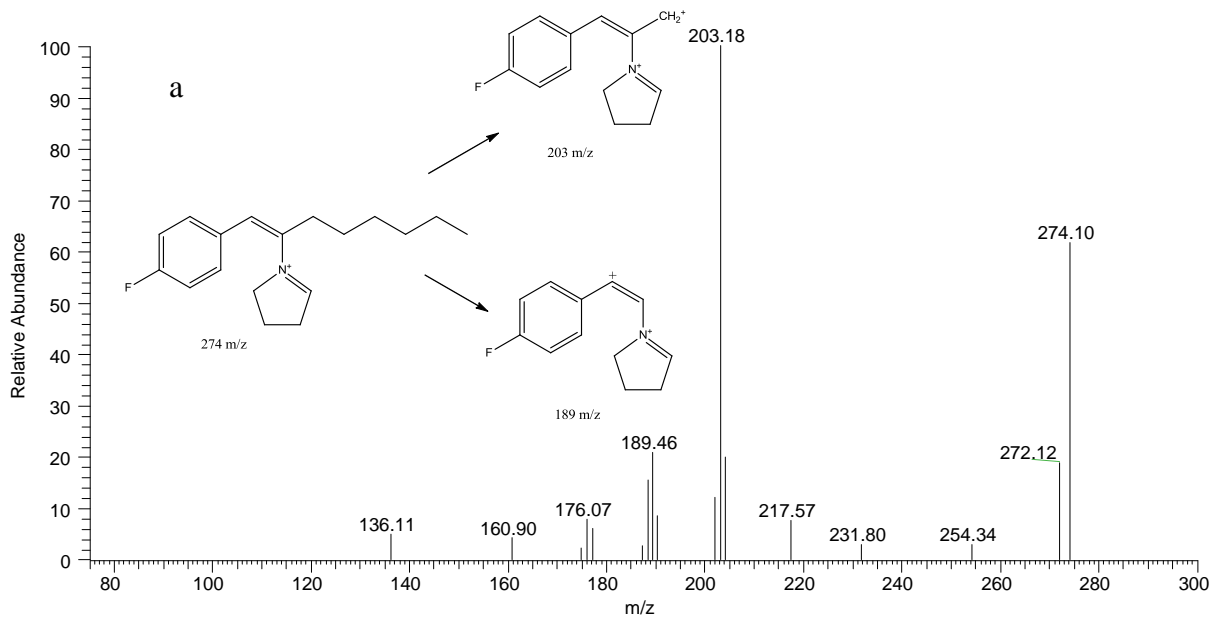




Rys. 5. Chromatogram (a) i widmo masowe (b) uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas próby nr 1

3.4.2 Tandemowa spektrometria mas MS^n

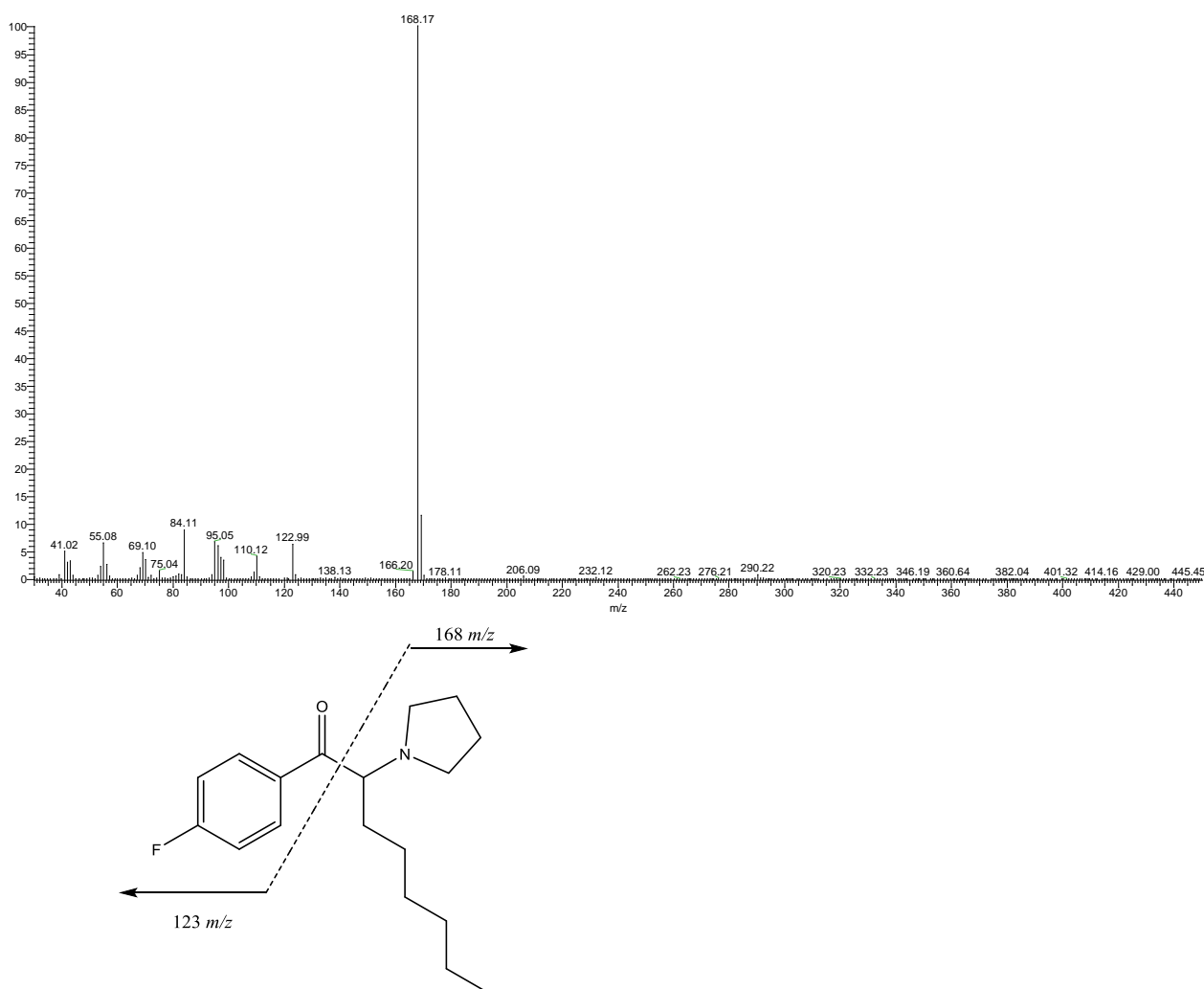
Jon molekularny o wartości $292\ m/z$ $[M^+H^+]$ został poddany fragmentacji MS/MS oraz $MS/MS/MS$ w trybie jonizacji dodatniej. Widmo masowe MS^2 jonu o wartości $292\ m/z$ (Rys. 6a.) przedstawia jon fragmentacyjny o wartości $274\ m/z$, który sugerował eliminację cząsteczki wody $[M^+H^+-H_2O]$. Przejście to jest poznanym wcześniej, charakterystycznym dla związków z grupy katynonu. Jony fragmentacyjne uzyskane w trybie MS^3 jonu o wartości $274\ m/z$, tj. $221\ m/z$, $168\ m/z$, $137\ m/z$ dla ESI- MS/MS oraz $203\ m/z$ i $189\ m/z$ dla ESI- $MS/MS/MS$ potwierdzały obecność w analizowanym związku ugrupowania pirolidynowego oraz fluorofenyłowego (Rys. 6b.). Dla pirolidyno-podstawionych pochodnych katynonu, obserwuje się również odłączenie jonu molekularnego o wartości $71\ m/z$ odpowiadającego cząsteczce pierścienia pirolidynowego. Piki powstałe w wyniku tego odłączenia są zazwyczaj najintensywniejsze, co zostało zauważone również podczas masowej analizy spektrometrycznej próby nr 1.



Rys. 6. Widmo masowe próby nr 1 w trybie ESI-MS² (a) oraz ESI-MS³ (b) wraz z proponowanymi fragmentacjami analizowanego związku

3.4.3 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Kolejną techniką instrumentalną, która została wykorzystana w celu potwierdzenia struktury analizowanego w proszku nr 1 związku, była chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas. Otrzymane masowe EI-MS porównano z biblioteką widm CaymanChem Library [44], co potwierdziło obecność nowej pochodnej katynonu - 4-Fluoro-PV9, która została dodana do niniejszej biblioteki niespełna miesiąc wcześniej. Na obu widmach zarówno pik o wartości m/z 168 występuje jako bazowy, jak i piki o wartościach m/z 169, 123, 110, 95, 84 i 55 jako fragmentacyjne (Rys. 7.).



Rys. 7. Widmo masowe GC-EI-MS związku 4F-PV9 wraz z proponowaną fragmentacją struktury cząsteczkowej.

Na tym etapie identyfikacji, potwierdzone było, że w analizowanym proszku nr 1 znajdowała się nowa pochodna katynonu tj. Fluoro – PV9, natomiast koniecznym do ustalenia było, w jakiej pozycji pierścienia aromatycznego występował podstawnik fluorowy, ponieważ wiadomym jest, że regioizomery dają takie same, bądź bardzo podobne widma masowe typu EI-MS.

3.4.4 Protonowy i węglowy jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)

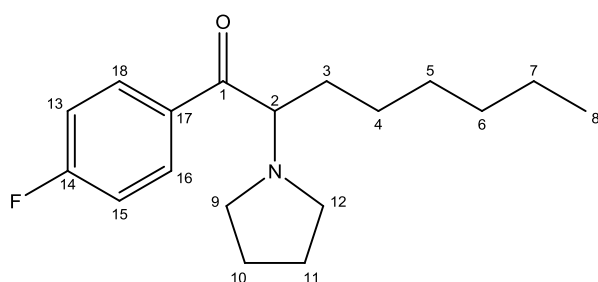
Celem ostatecznego ustalenia położenia atomu fluoru w pierścieniu aromatycznym cząsteczki Fluoro-PV9 wykonano analizę proszku nr 1 techniką protonowego oraz węglowego jądrowego rezonansu magnetycznego.

W rezultacie uzyskano dane potwierdzające przewidywaną strukturę związku oraz informację o obecności atomu fluoru w pozycji para pierścienia aromatycznego. W widmie NMR w zakresie aromatycznym widoczne są dwie grupy sygnałów świadczące o obecności atomu fluoru w pozycji 4 pierścienia fenyłowego. Ze względu na oddziaływania protonów z fluorem zamiast klasycznego układu sygnałów tj. dubletów od każdej grupy równocennych protonów zaobserwowano dwa multiplety. Sprzężenia z fluorem widoczne były również w widmie węglowym, gdzie sygnały węgla 14 oraz 13 i 15 rozszczepiane są na dublety. W Tabeli nr 6. przedstawiono dane uzyskane techniką protonowego i węglowego jądrowego rezonansu magnetycznego dla próbki nr 1. W związku z tym, że badana substancja występowała w postaci chlorowodoru, w widmie przy $\delta = 11,95$ ppm obecny jest sygnał pochodzący od protonu czwartorzędowej grupy pirolidynowej.

Tabela nr 6 Wartości przesunięć chemicznych uzyskanych w wyniku analizy próbki nr 1 technikami protonowego i jądrowego rezonansu magnetycznego.

Pozycja atomu w cząsteczce	Przesunięcia chemiczne (^{13}C) [ppm]	Przesunięcia chemiczne (^1H NMR) [ppm]
1	195,20	-
2	64,87	5,50 (dt, 1H)

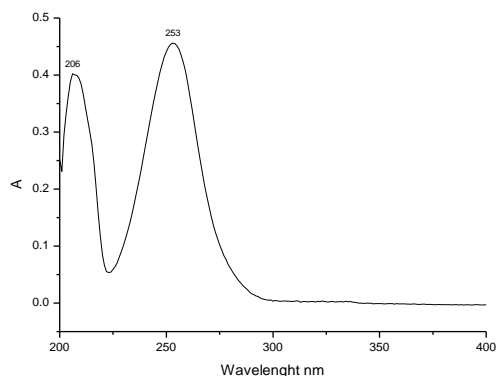
3	31,13	2,08 (m, 2H)
4, 5, 6, 7	30,82; 29,11; 25,52; 22,36	1,15-1,35 (m, 8H)
8	13,85	0,79 (t, 3H)
9	52,72	3,12 (m, 1H); 3,86 (m, 1H)
10, 11	23,85; 23,66	2,18 (m, 4H)
12	51,23	3,69 (m, 2H)
13, 15	116,51; 116,53	7,22 (m, 2H)
14	165,53; 168,10	-
16, 18	131,88; 131,93; 131,96	8,13 (m, 2H)
17	131,79	-



Rys. 8. Struktura 4-Fluoro-PV9 wraz z numeracją atomów węgla w cząsteczce

3.4.5 Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią UV-VIS (HPLC-DAD)

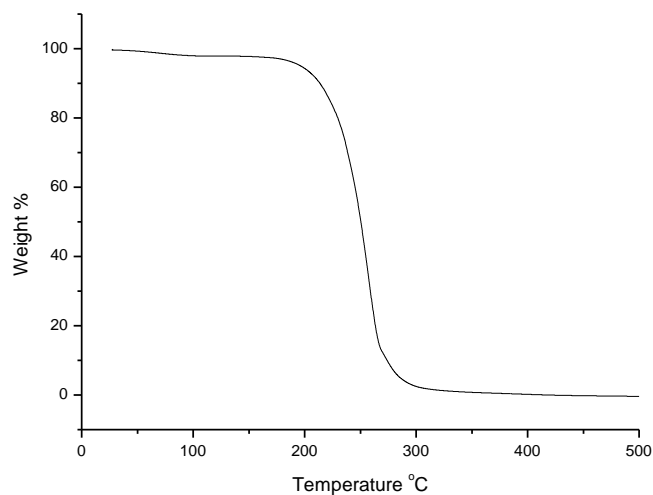
Dla uzupełnienia danych fizykochemicznych, charakterystyka zidentyfikowanego związku 4-Fluoro-PV9 została poszerzona między innymi o spektrometrię UV-VIS. Widma uzyskane w wyniku analizy techniką HPLC-DAD oraz UV-VIS wskazywały maksimum absorpcji przy długości fali 206 nm i 253 nm. Brak pików pochodzących od zanieczyszczeń, wskazywały podobnie jak chromatogram uzyskany techniką chromatografii cieczowej na wysoką czystość związku w analizowanym materiale (Rys. 9.).



Rys. 9. Widmo absorpcji UV-VIS dla próbki nr 1.

3.4.6 Analiza termograwimetryczna (TGA) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Widmo uzyskane w wyniku analizy termograwimetrycznej wskazało na dużą czystość analizowanej próbki. Na spektrum TGA widoczne jest tylko jedno główne przejście odpowiadające jego rozpadowi przy temperaturze 259 °C (Rys. 10.). Temperatura topnienia wyznaczona przy zastosowaniu techniki DSC wynosiła 144 °C.

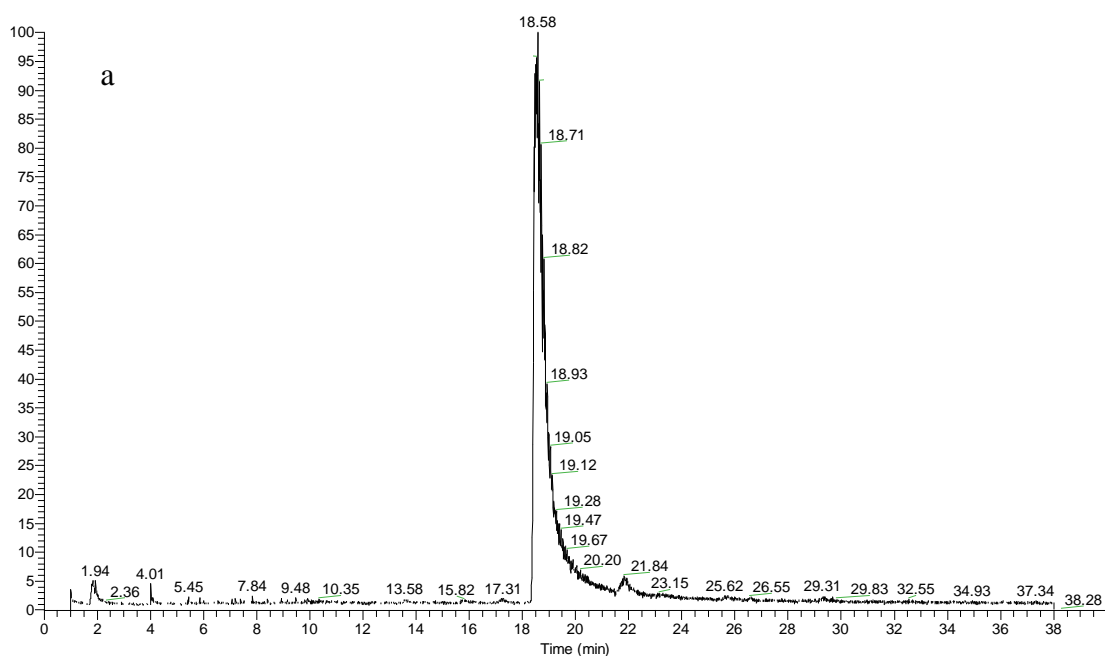


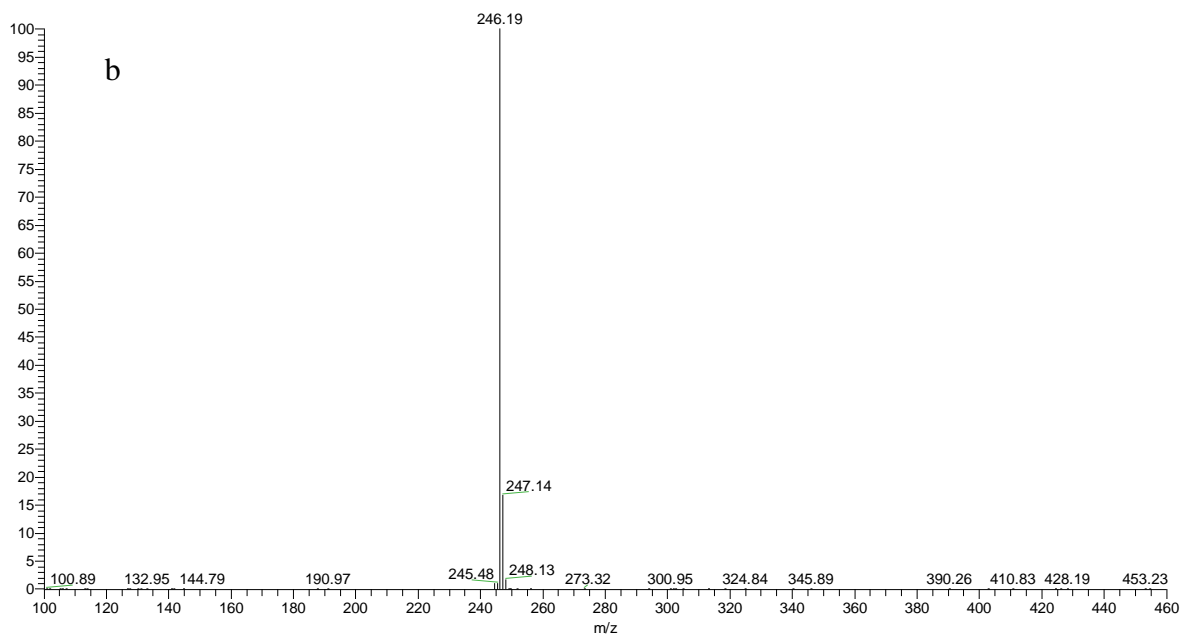
Rys. 10. Widmo TGA dla próbki nr 1

3.5 Wyniki badań dla pochodnej katynonu α -PHP

3.5.1 Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

W wyniku przeprowadzonej analizy ekstraktu nr 2 uzyskano chromatogram z widocznym pikiem przy czasie retencji 18,58 min. Dodatkowo, na chromatogramie nie zaobserwowano innych pików, co wskazywało na dużą czystość analizowanego proszku. Rys. 11. przedstawia chromatogram (a) sprzężony z widmem masowym (b), na którym omawianemu pikowi odpowiada jeden intensywny jon o wartości m/z równej 246,19. W związku z tym, że omawiany jon pseudomolekularny jest jodem protonowanym $[M+H^+]$, masa cząsteczkowa analizowanego związku równa jest 245,19 Da.

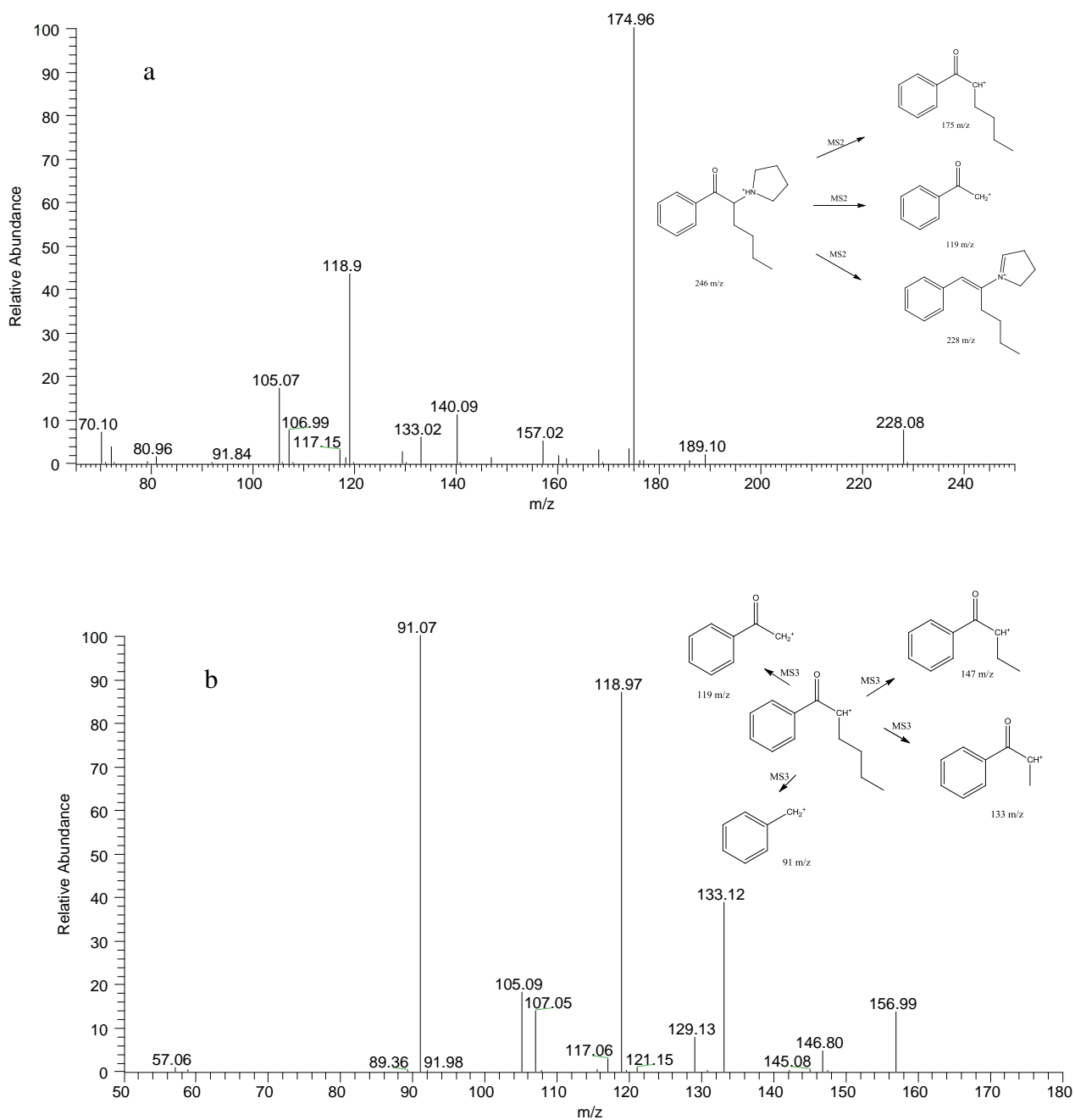




Rys. 11. Chromatogram (a) i widmo masowe (b) uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas próby nr 2

3.5.2 Tandemowa spektrometria mas MSⁿ

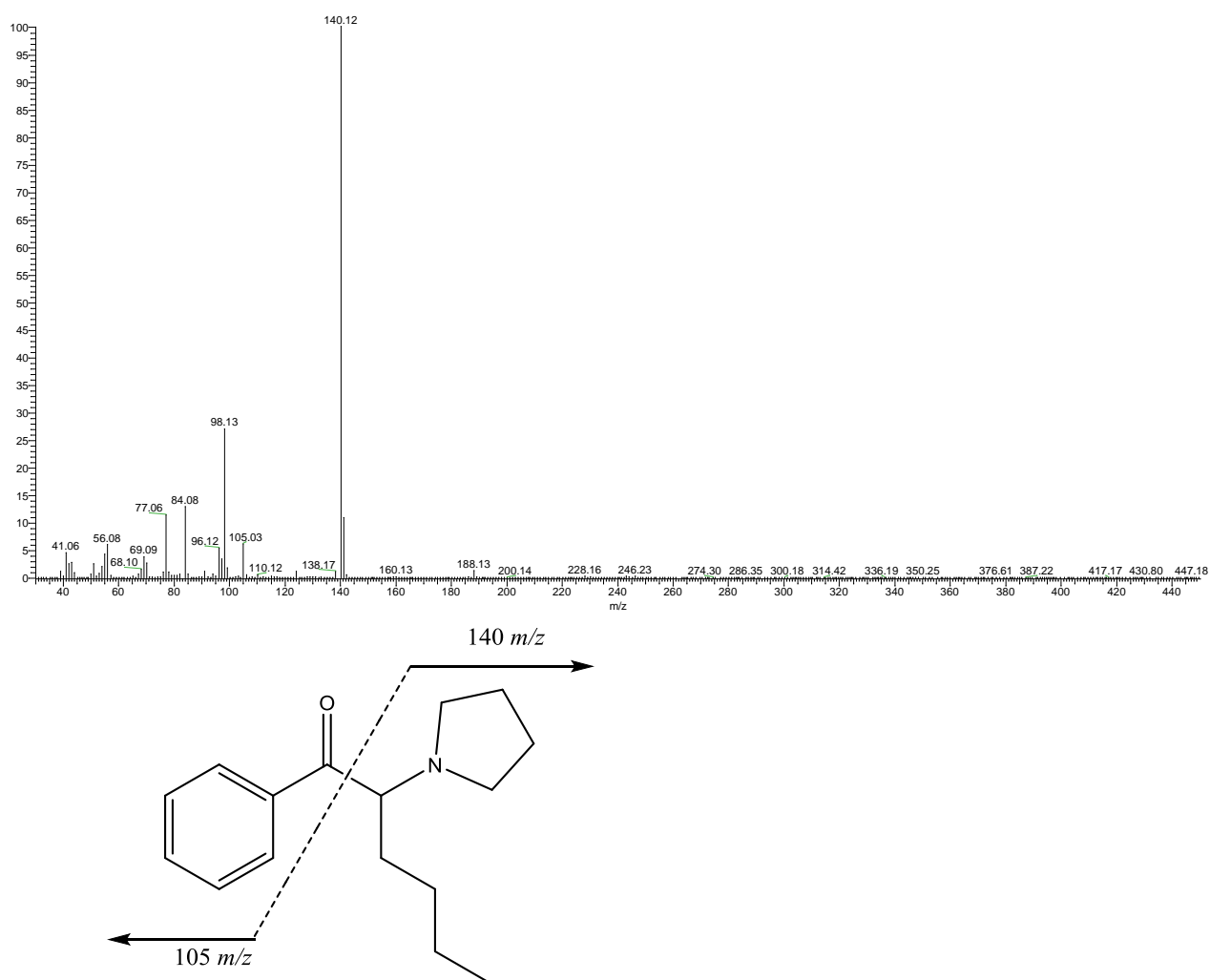
Jon molekularny o wartości 246 m/z [M^+H^+] został poddany fragmentacji MS/MS oraz MS/MS/MS w trybie jonizacji dodatniej. Widmo masowe MS² jonu o wartości 242 m/z (Rys. 12.) przedstawia jon fragmentacyjny o wartości 228 m/z , który sugerował eliminację cząsteczki wody [$M^+H^+-H_2O$]. Przejście to, jak omówiono wcześniej jest dobrze poznanym, charakterystycznym dla związku z grupy katynonu, co sugerowało obecność w analizowanej próbce nr 2 takiej substancji. Jon fragmentacyjny o wartości 175 m/z odpowiadał odejściu od pierwotnej struktury ugrupowania piroolidynowego. Wybranie jonu 175 m/z jako głównego w trybie MS³ dało jony fragmentacyjne o wartościach m/z 147, 133, 119 oraz 105, które to odpowiadały zaproponowanej potencjalnej strukturze analizowanego związku.



Rys. 12. Widmo masowe ESI-MS próby nr 2 w trybie MS² (a) oraz MS³ (b) wraz z proponowanymi fragmentacjami analizowanego związku

3.5.3 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Kolejną techniką analizy instrumentalnej, która została wykorzystana w celu potwierdzenia struktury analizowanego w próbce nr 2 związku, była chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas. Uzyskane w jej wyniku spectrum masowe EI-MS porównano z biblioteką widm CaymanChem Library, co potwierdziło obecność podejrzewanej pochodnej katynonu - α -PHP. Na obu widmach zarówno pik o wartości m/z 140 występuje jako bazowy, jak i piki o wartościach m/z 105, 96, 77 jako jony fragmentacyjne (Rys. 13.).



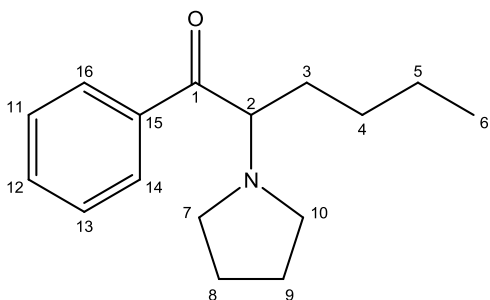
Rys. 13. Widmo masowe GC-EI-MS związku α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją struktury cząsteczkowej

3.5.4 Protonowy i węglowy jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)

Celem potwierdzenia obecności w analizowanej próbce nr 2 przypuszczanego związku przeprowadzono jego analizę techniką protonowego oraz węglowego jądrowego rezonansu magnetycznego, w rezultacie której uzyskano dane potwierdzające przewidywaną strukturę chemiczną. Tabela nr 7 przedstawia wyniki analizy ^1H NMR i ^{13}C NMR próbki nr 2. Podobnie, jak w przypadku próbki 1, badana substancja występowała w postaci chlorowodoru w związku z czym w widmie przy $\delta = 12,65$ ppm obecny jest sygnał pochodzący od protonu czwartorzędowej grupy pirolidynowej.

Tabela nr 7 Wartości przesunięć chemicznych uzyskanych w wyniku analizy próby nr 2 technikami protonowego i jądrowego rezonansu magnetycznego.

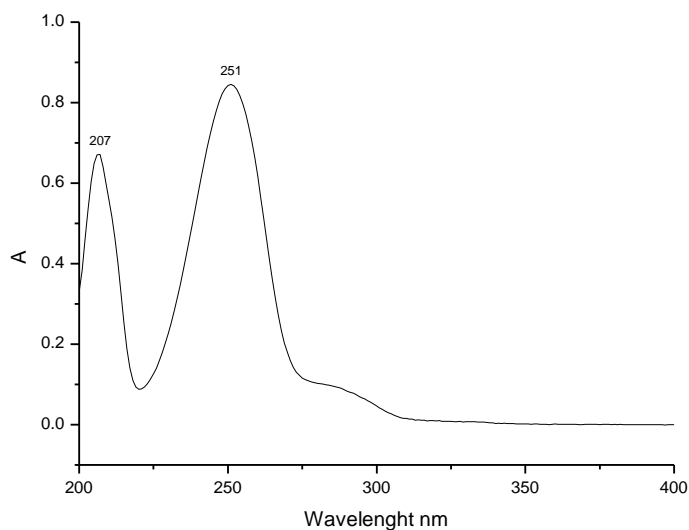
Pozycja atomu w cząsteczce	Przesunięcie chemiczne (^{13}C) [ppm]	Przesunięcie chemiczne (^1H) [ppm]
1	196,78	-
2	62,87	5,15 (dt, 1H)
3	30,62	2,03 (m, 2H)
4, 5	27,93; 22,50	1,33 (m, 4H)
6	13,48	0,84 (t, 3H)
7	52,90	2,83 (m, 1H); 3,68 (m, 1H)
8, 9	23,93; 23,71	2,21 (m, 4H)
10	49,51	3,84 (m, 2H)
11, 13	129,43	7,58 (t, 2H)
12	135,16	7,73 (t, 1H)
14,16	128,62	7,98 (d, 2H)
15	135,75	-



Rys. 14. Struktura α -PHP wraz z numeracją atomów węgla w cząsteczce

3.5.5 Chromatografia cieczowa ze spektrometrią UV-VIS (HPLC-DAD)

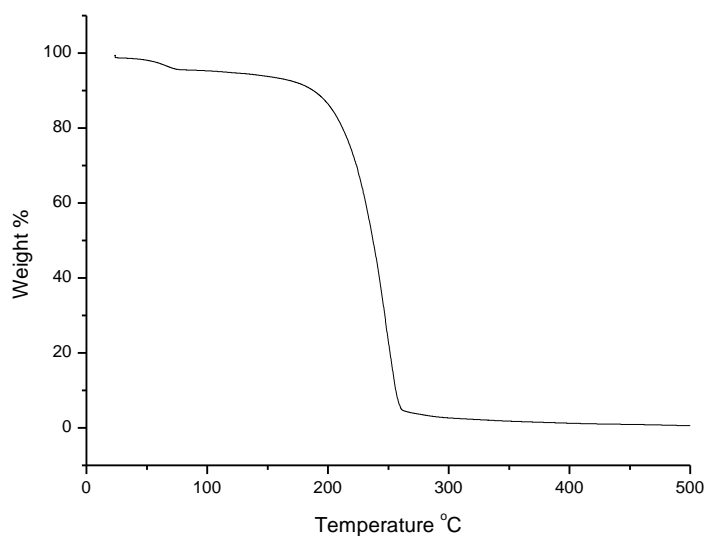
Dla uzupełnienia danych fizykochemicznych, charakterystyka zidentyfikowanego związku α -PHP została poszerzona o spektrometrię UV-VIS. Widma uzyskane w wyniku analizy techniką HPLC-DAD oraz UV-VIS wskazywały maksimum absorpcji przy długości fali 207 nm i 251 nm. Brak pików pochodzących od zanieczyszczeń, wskazywały podobnie jak chromatogram na wysoką czystość związku w analizowanym materiale (Rys. 15.).



Rys. 15. Spektrum absorpcji UV-VIS dla próbki nr 2

3.5.6 Analiza termograwimetryczna (TGA) oraz skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Widmo uzyskane w wyniku analizy termograwimetrycznej wskazało na dużą czystość analizowanej próby. Na spektrum TGA widoczne jest tylko jedno główne przejście odpowiadające jego rozpadowi przy temperaturze 250 °C (Rys. 16.). Temperatura topnienia wyznaczona przy zastosowaniu techniki DSC wynosiła 65 °C.



Rys. 17. Widmo TGA dla próbki nr 2

4. Opracowanie widm masowych techniką EI-MS oraz ESI-MSⁿ na potrzeby utworzenia biblioteki danych analitycznych dla najnowszych pochodnych katynonu

4.1 Wstęp

W celu realizacji jednego z celów niniejszej pracy tj. utworzenia biblioteki danych analitycznych dotyczących najnowszych pochodnych katynonu, która może być wykorzystywana następnie przez laboratoria sądowe i kryminalistyczne w toku analiz toksykologicznych, przeprowadziłam analizy technikami spektroskopii masowej typu ESI-MS oraz EI-MS 15 najnowszych dopalaczy tej grupy dostępnych na pseudonarkotykowym rynku Polski. Poniżej zaprezentowane zostaną widma masowe wraz z proponowanymi fragmentacjami struktur chemicznych wszystkich poddanych analizie substancji.

4.2 Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły zabezpieczone przez funkcjonariuszy Policji, Prokuratury oraz Stacje Sanitarne – Epidemiologiczne na terenie Polski w latach 2015 – 2018 proszki przekazywane do analizy toksykologicznej.

4.3 Przygotowanie prób do analizy

Wszystkie poddane analizie chromatograficznej i spektroskopowej próby, przygotowywane były do analizy według procedury ekstrakcji, opracowanej na potrzeby niniejszej pracy i opisanej w podrozdziale 2.1.

4.4 Metodyka badań

4.4.1 Tandemowa spektrometria mas ESI-MSⁿ

Źródłem jonizacji analitów był elektrosprej w trybie jonizacji dodatniej (ESI(+)-MS), stosowano bezpośredni nastrzyk do detektora. Temperatura źródła jonizacji wynosiła 250 °C, gazem nośnym i do jonizacji były odpowiednio azot i hel. Fragmentację ESI-MS² oraz ESI-MS³ jonów prowadzono w zakresie monitorowania wartości od m/z 50 – m/z 500, stosując energię kolizji w zakresie od 20 do 40%, przepływ 8 μ l/min.

4.4.2 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS)

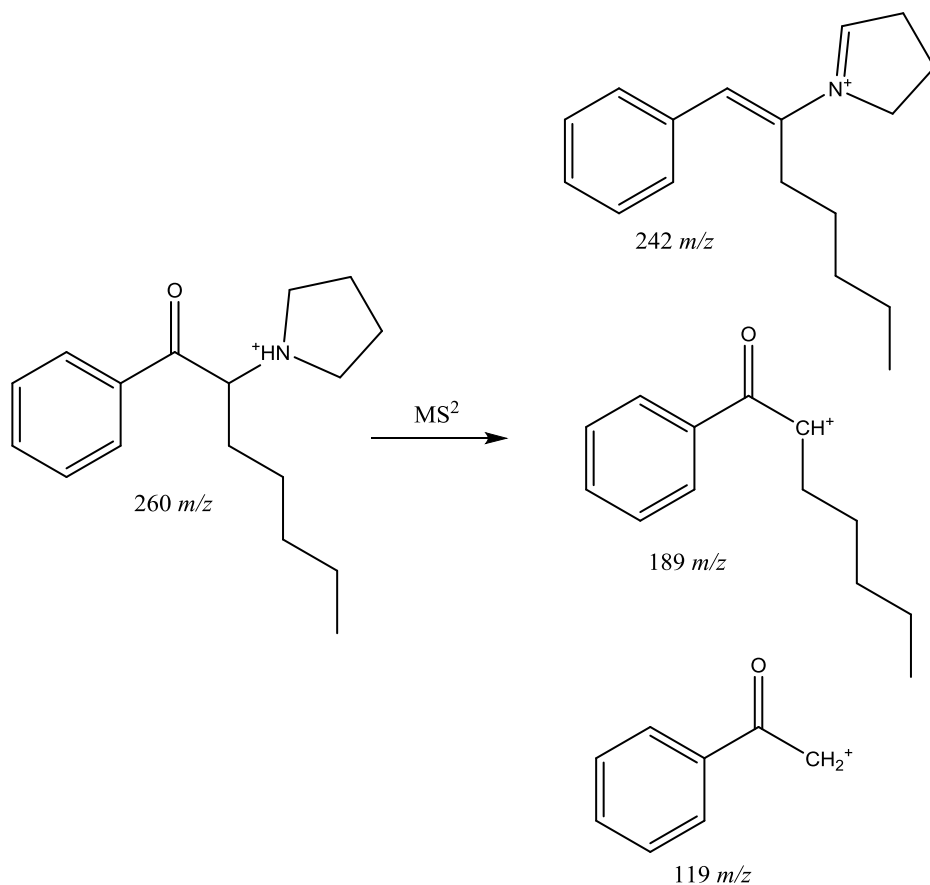
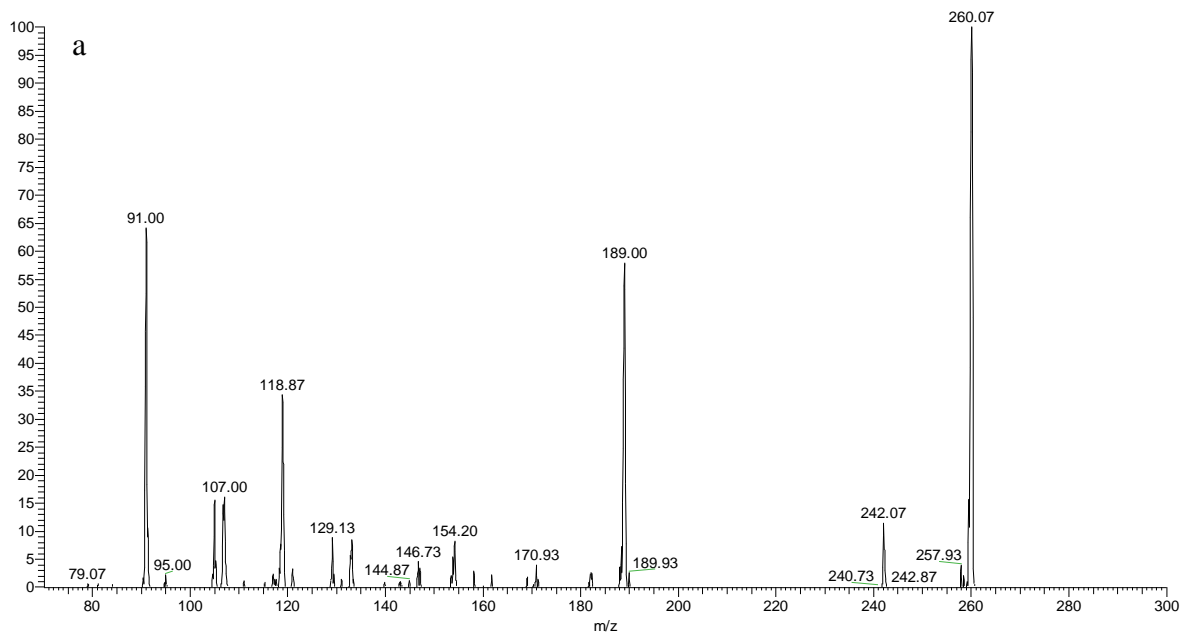
Analiza GC-EI/MS prowadzona była z zastosowaniem kolumny Rxi[®]-5Sil MS 15 m (Restek) w następujących warunkach: temperatura injektora, 260 °C; temperatura pieca, 100 °C przez 2 min, następnie wzrost o 20 °C/min do 260 °C; hel jako gaz nośny przy przepływie 1,5 ml/min; temperatura źródła spektrometru masowego, 250 °C; objętość nastrzyku, 1 μ l.

Otrzymane widma masowe w jonizacji typu elektron impakt (EI) porównywane były z biblioteką widm masowych EI Cayman Chemical (2015 - 2018) Cayman spectra library [44].

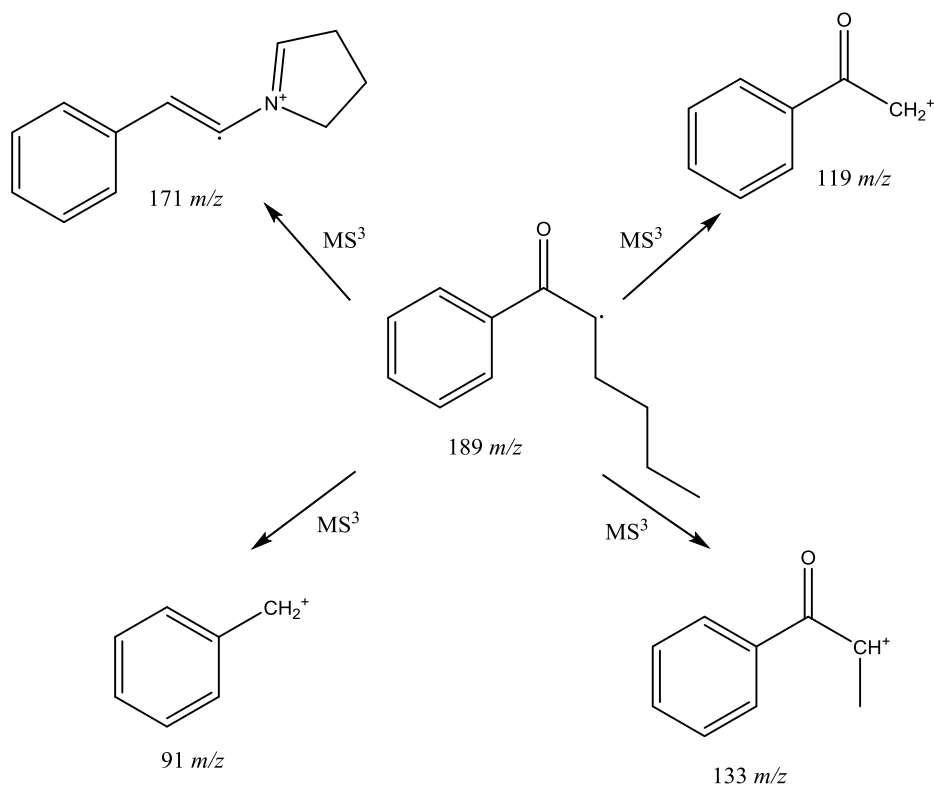
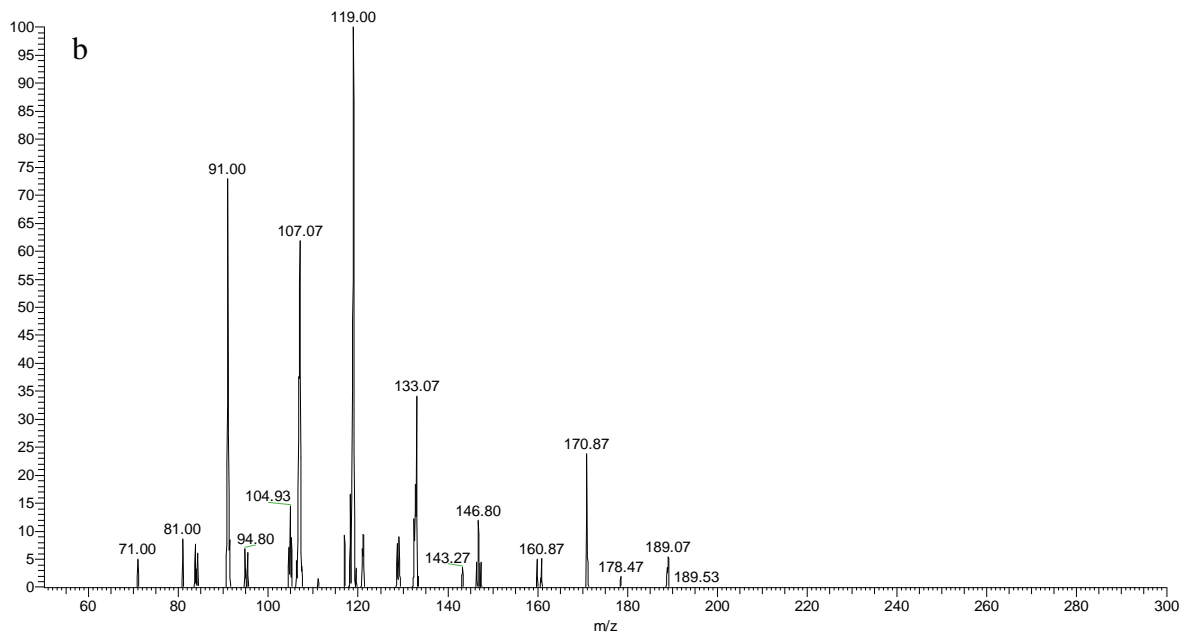
4.5 Wyniki badań

4.5.1 Tandemowa spektrometria mas ESI-MSⁿ

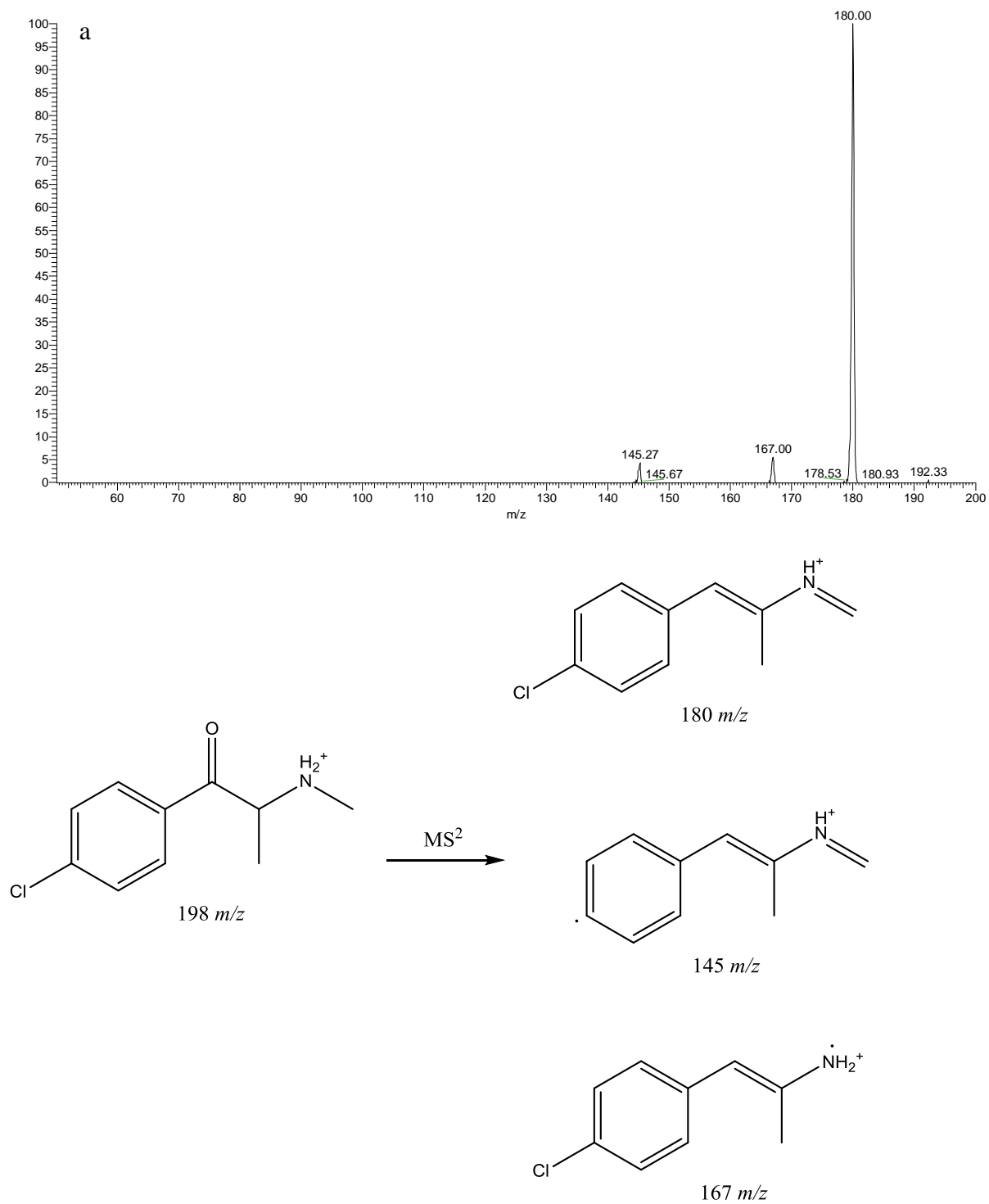
Wszystkie otrzymane w wyniku analizy techniką bezpośredniego nastrzyku do detektora mas widma masowe oraz proponowane fragmentacje poszczególnych cząsteczek, przedstawione zostają na poniższych rysunkach.



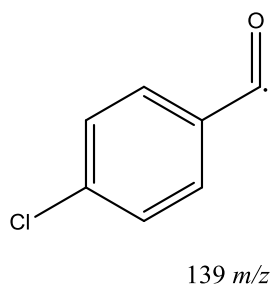
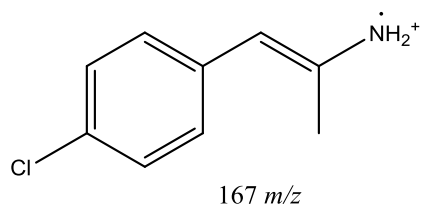
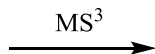
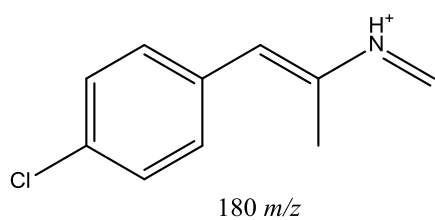
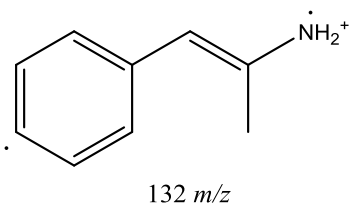
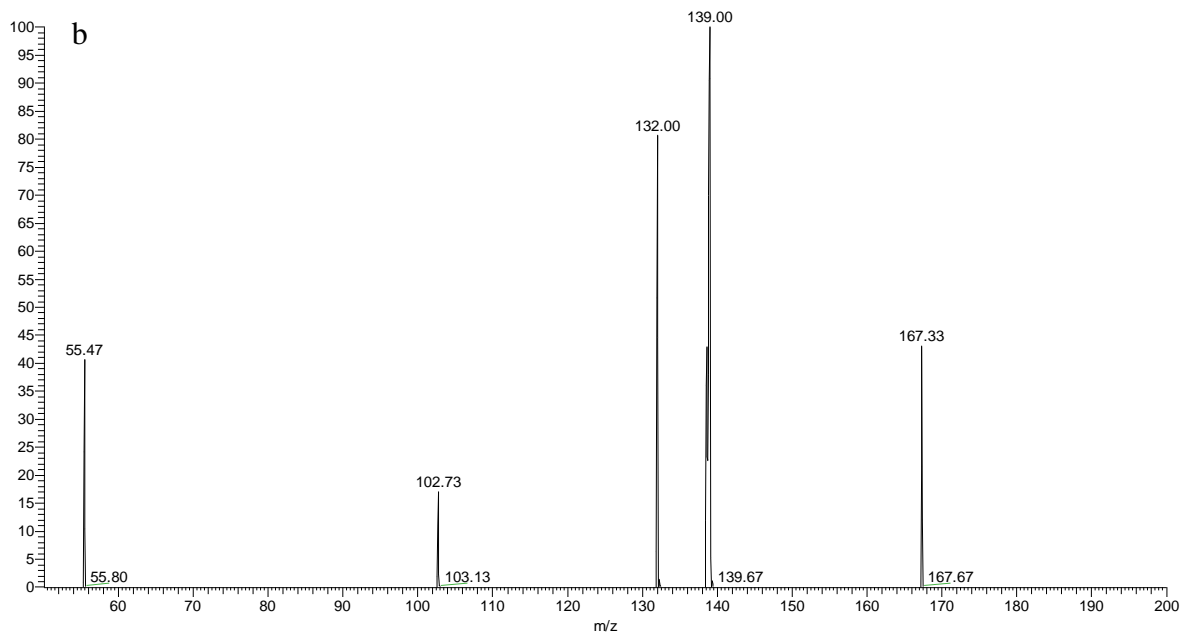
Rys. 18a. Widmo ESI-MS² cząsteczki PV8 wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



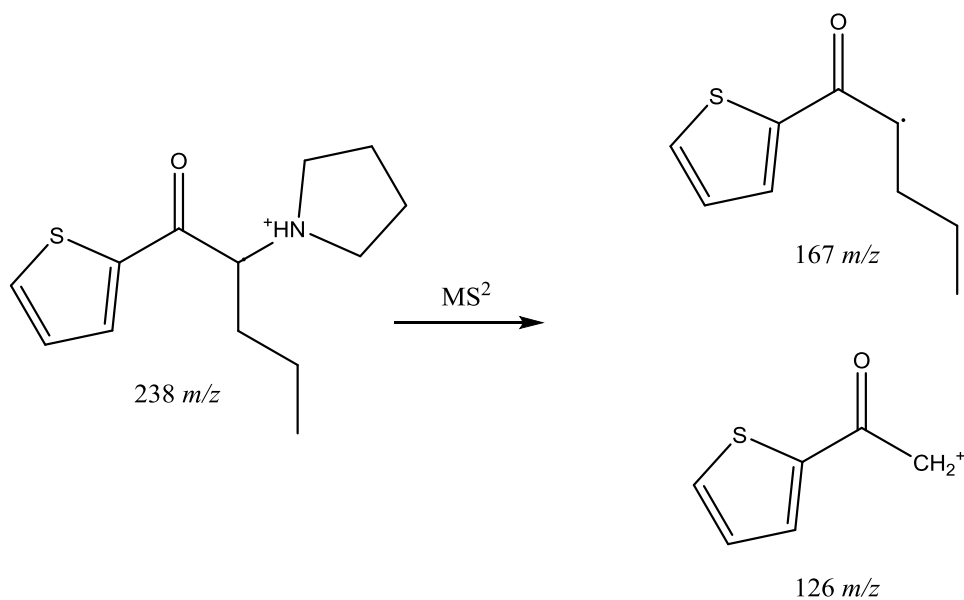
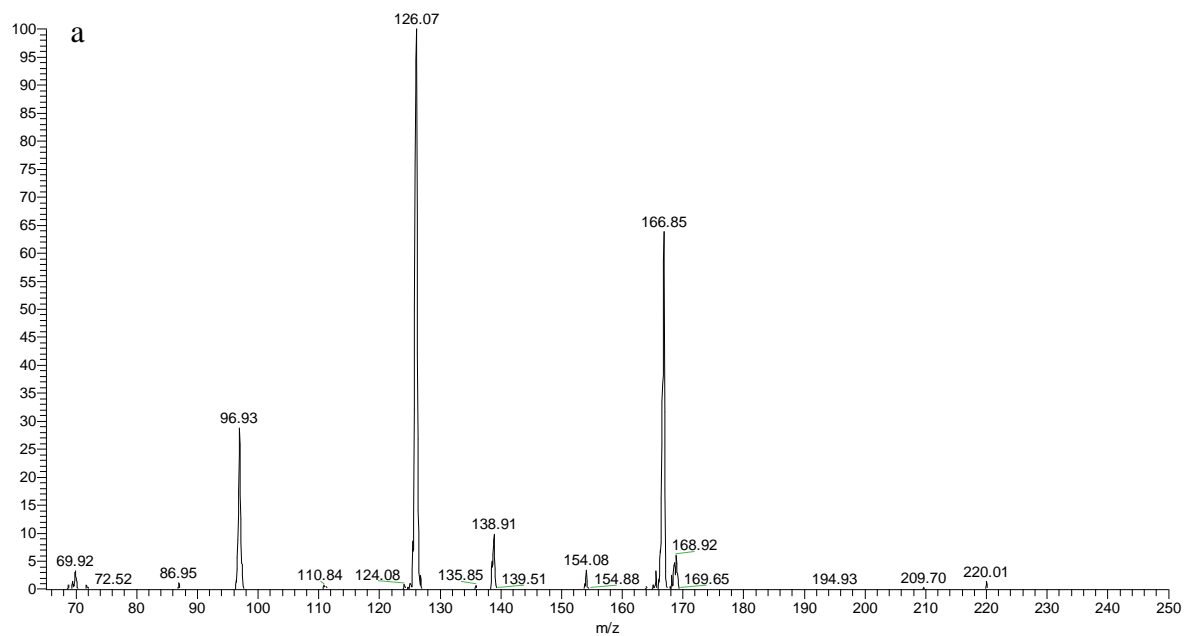
Rys. 18b. Widmo ESI- MS^3 cząsteczki PV8 wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



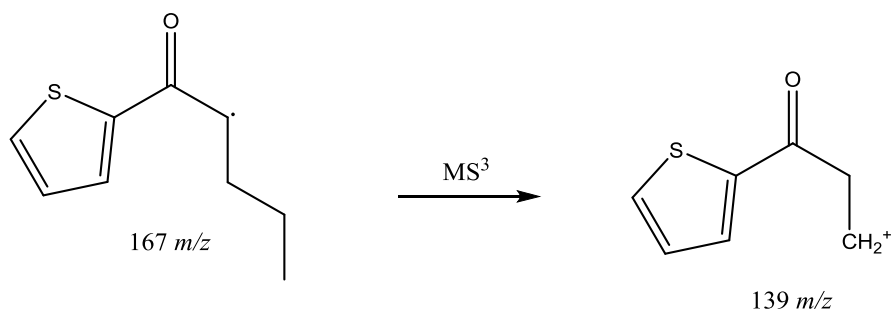
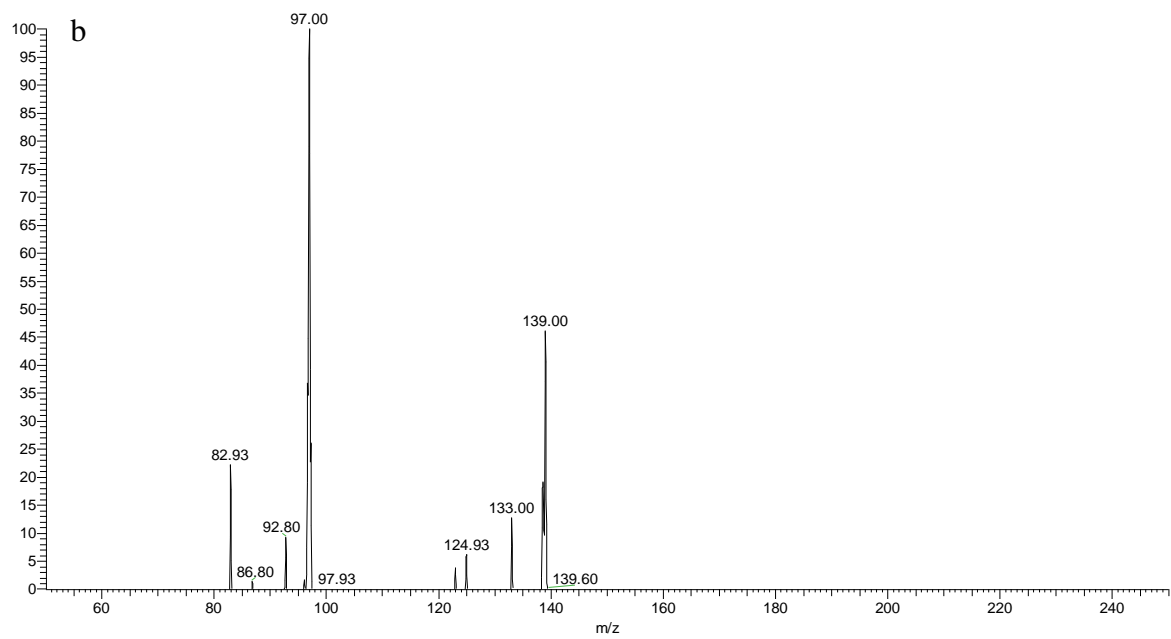
Rys. 19a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 4-CMC wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



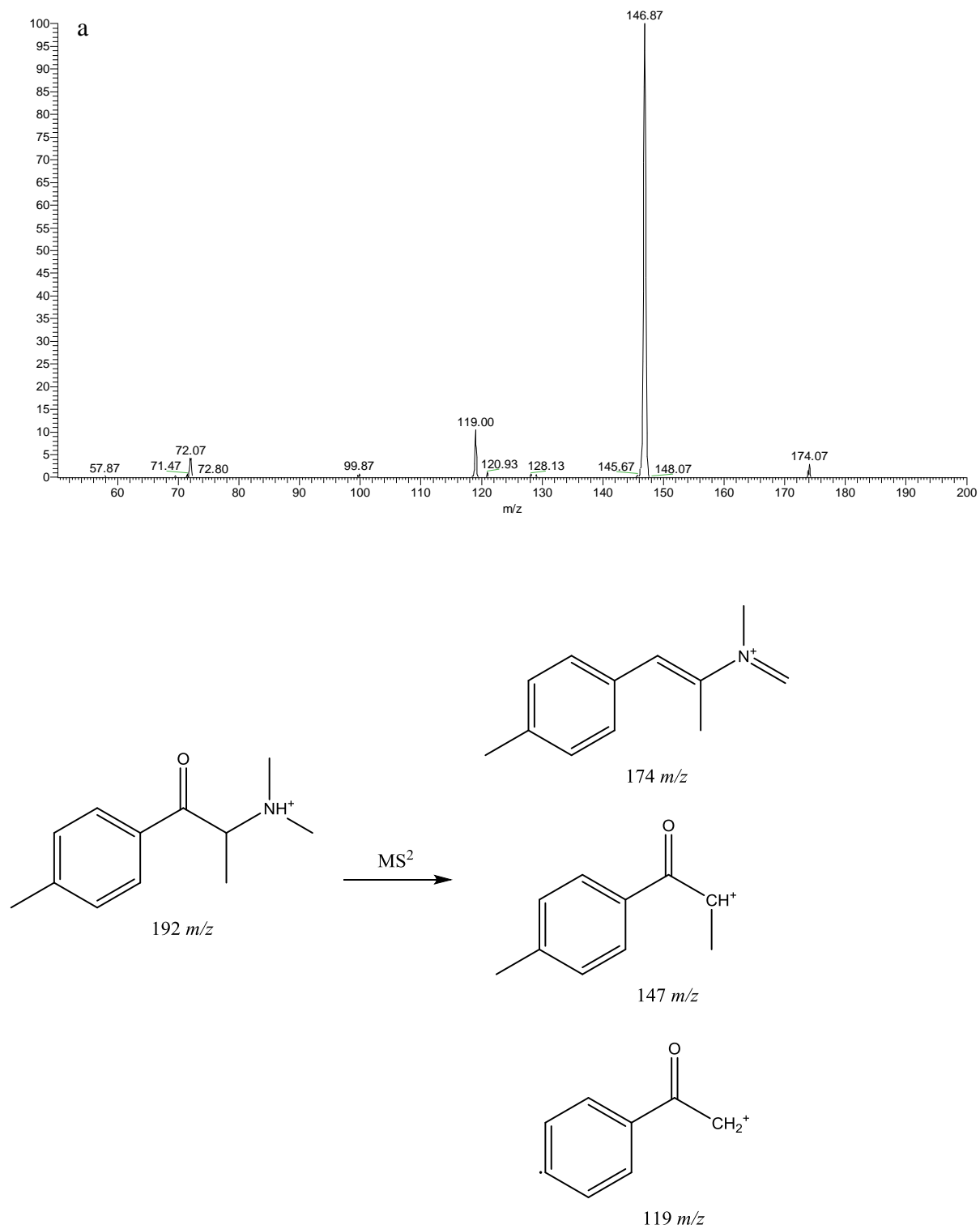
Rys. 19b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 4-CMC wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



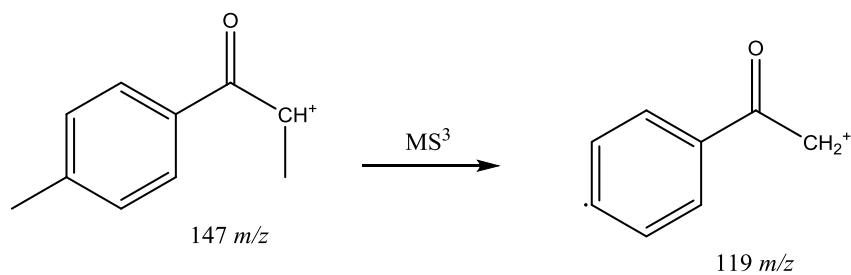
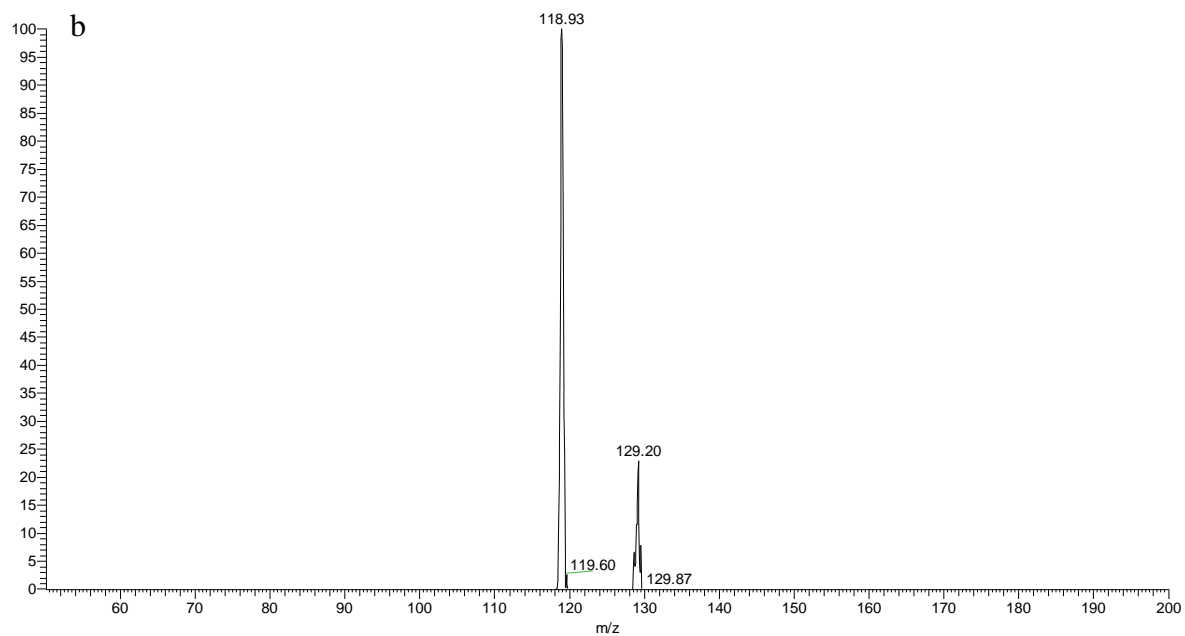
Rys. 20a. Widmo ESI-MS² cząsteczki α -PVT wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



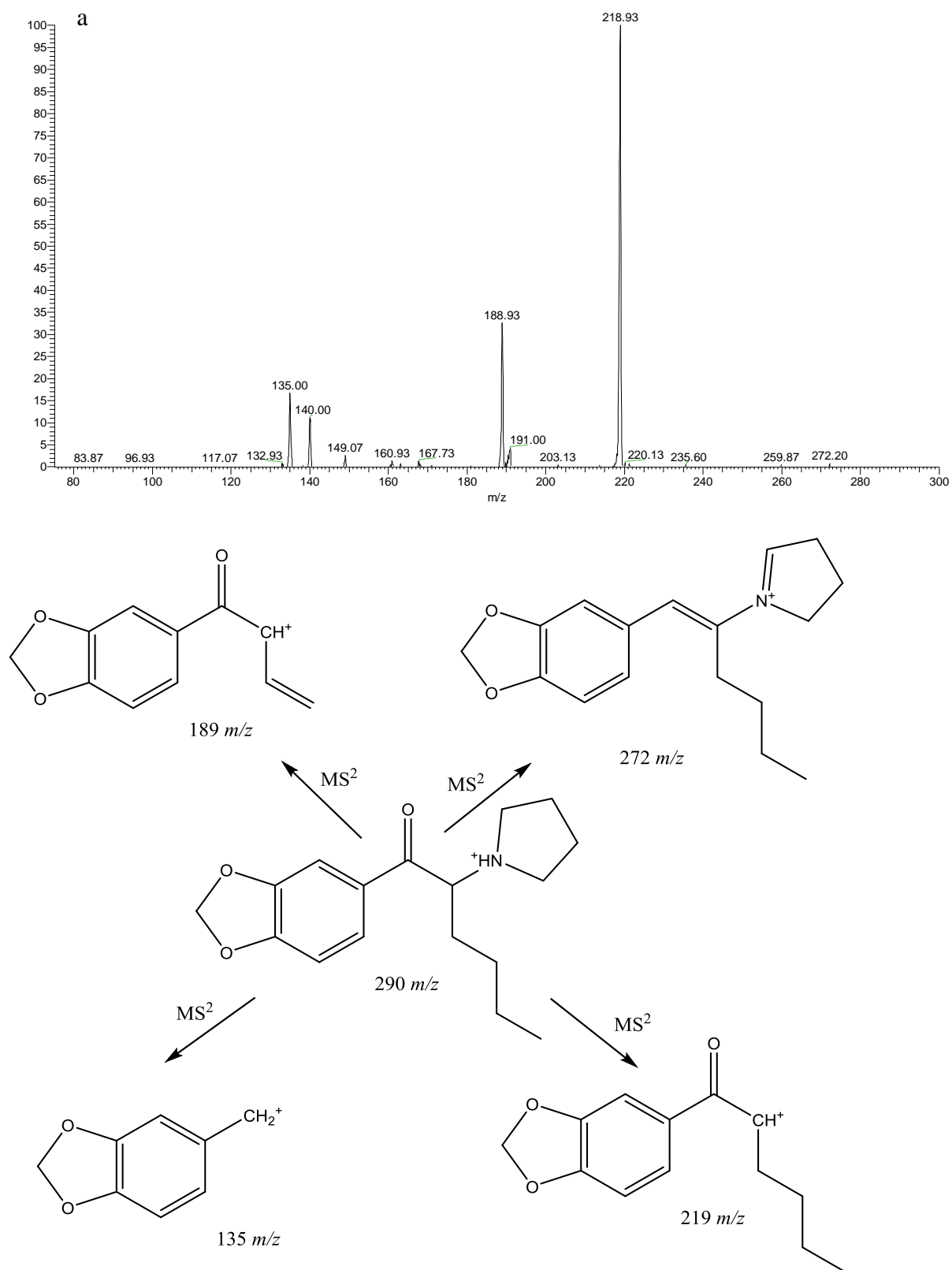
Rys. 20b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki α -PVT wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



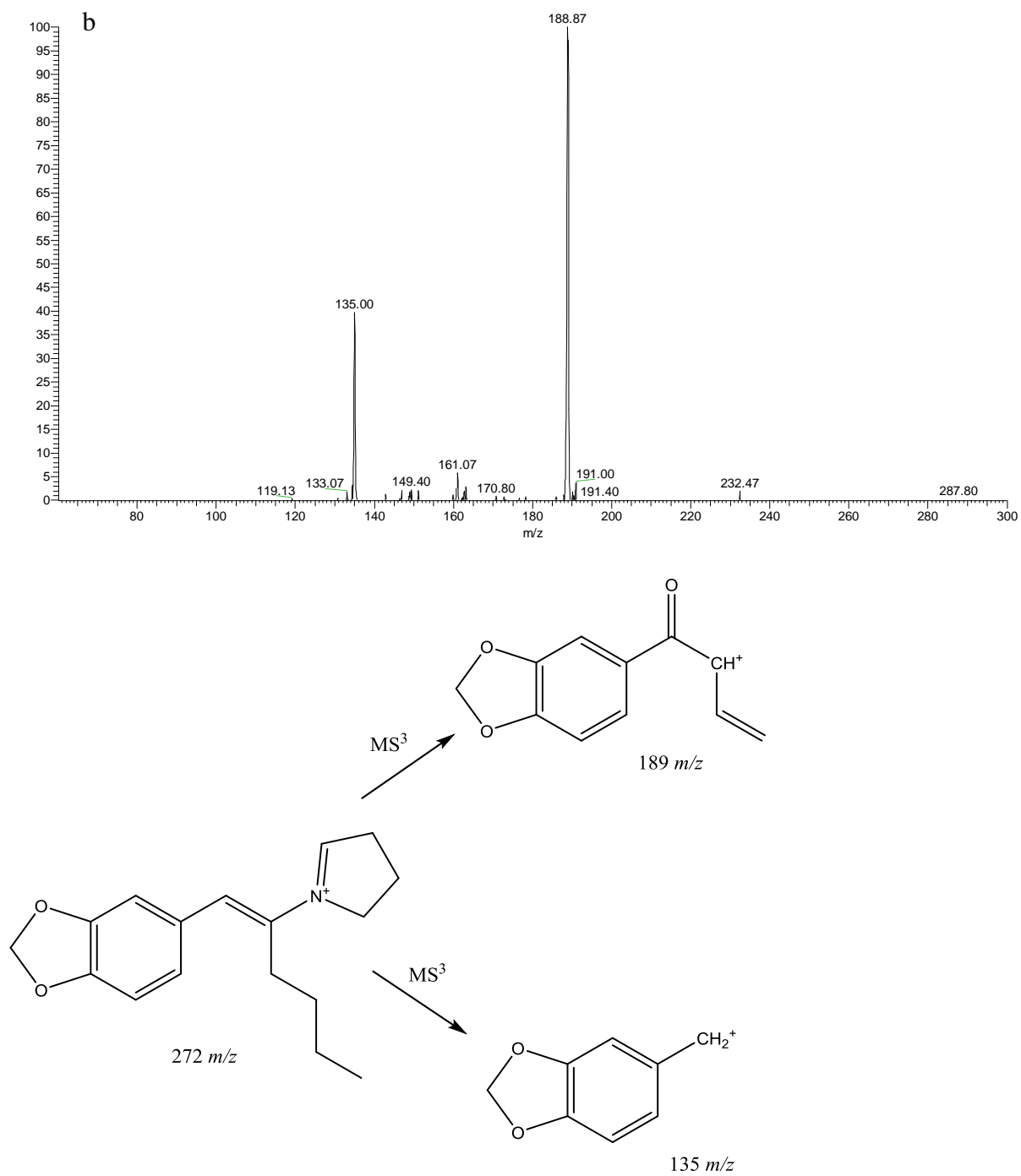
Rys. 21a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 4-metylo-*N,N*-dimetylometkatonu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



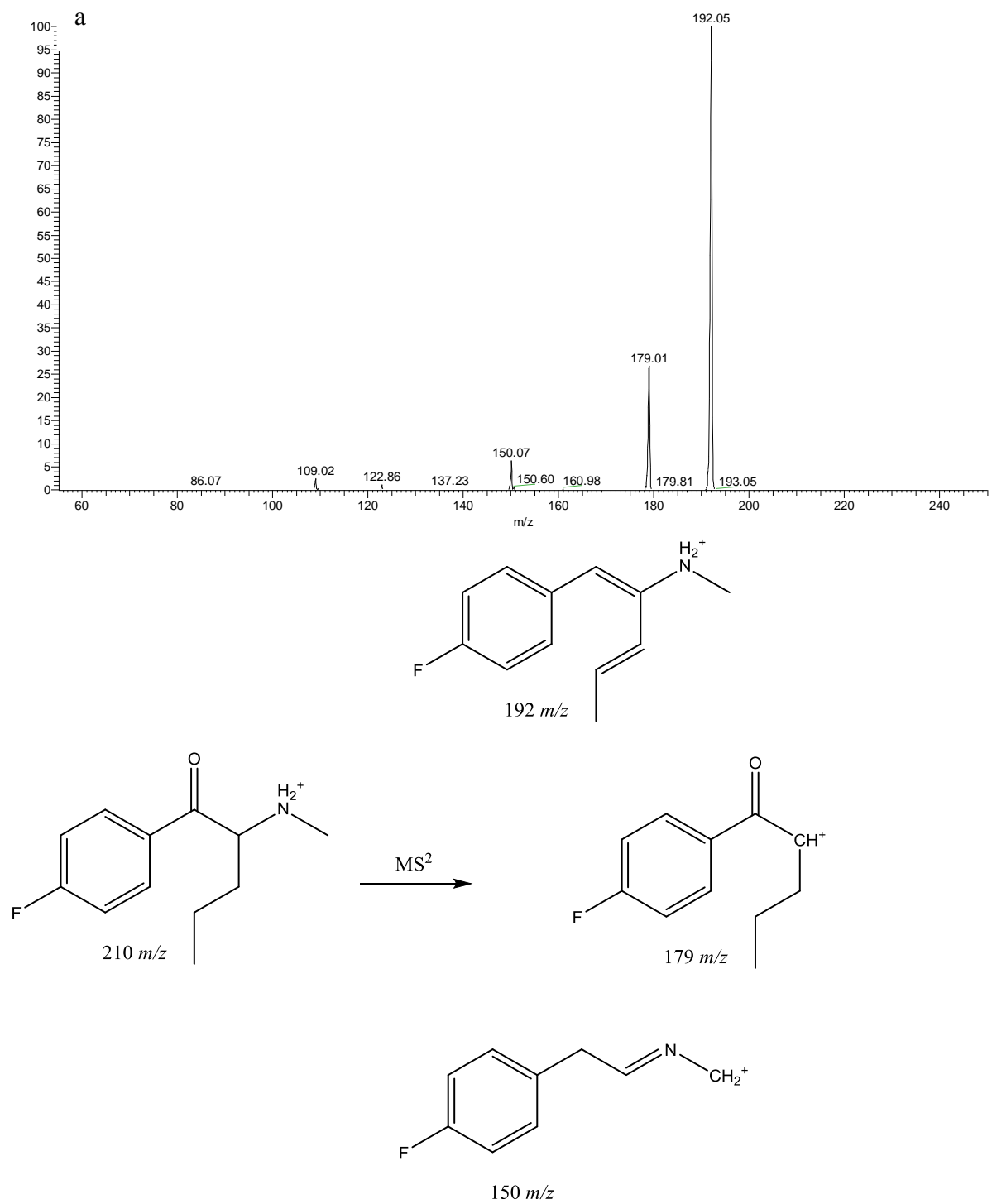
Rys. 21b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 4-metylo-*N,N*-dimetyloacetonylu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



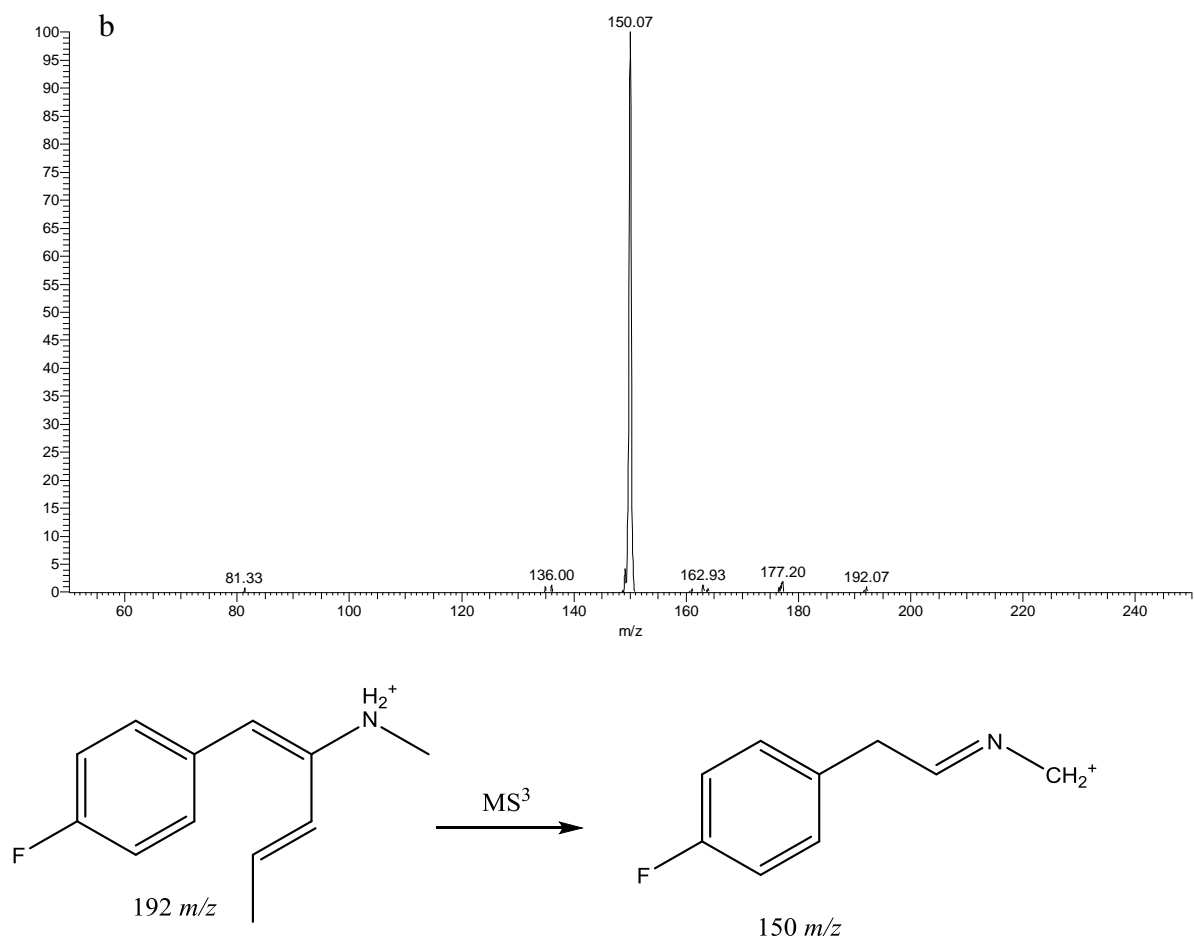
Rys. 22a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 3,4-metyleniodioksy- α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



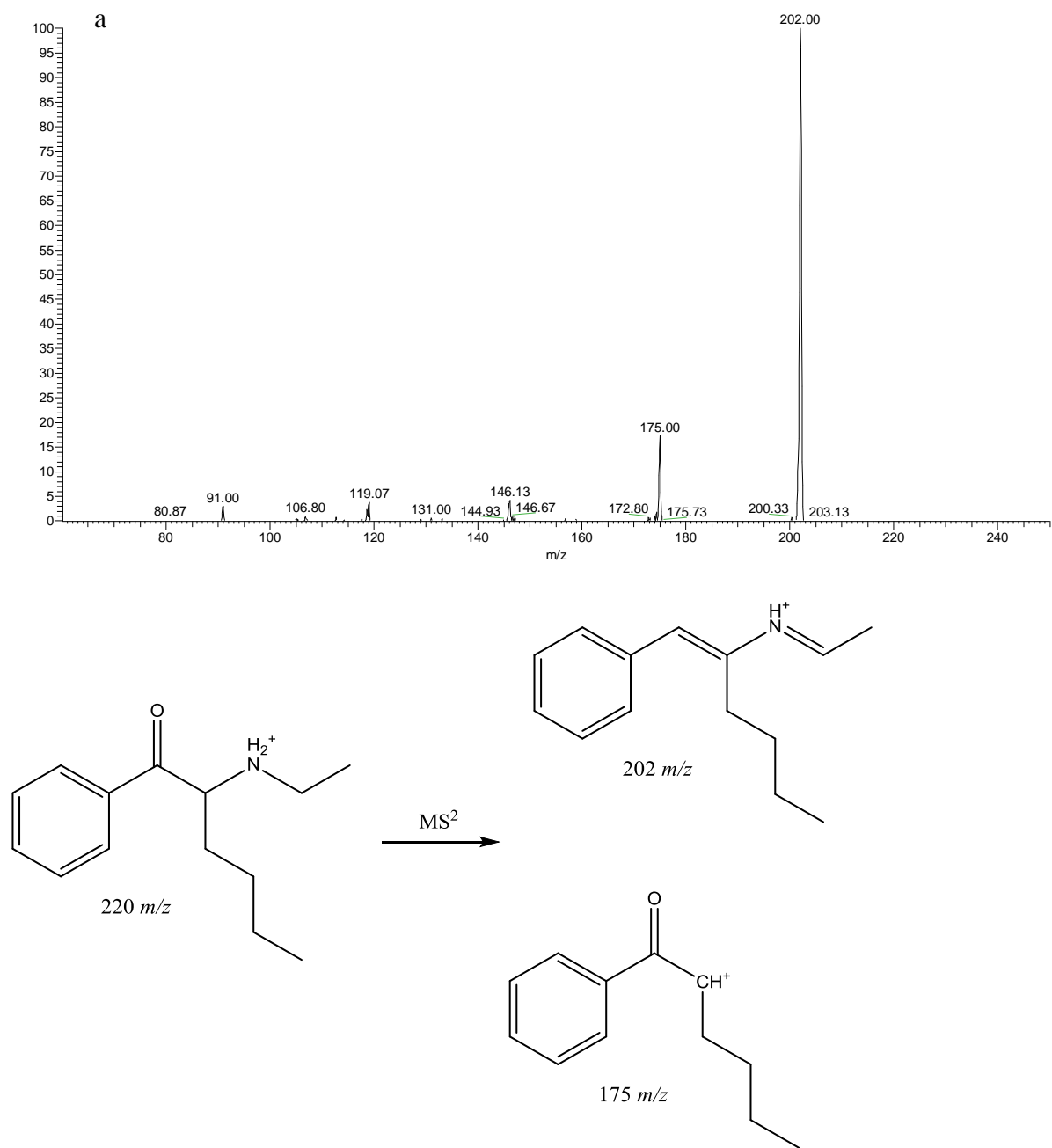
Rys. 22b. Widmo ESI- MS^3 cząsteczki 3,4-metyleniodioksy- α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



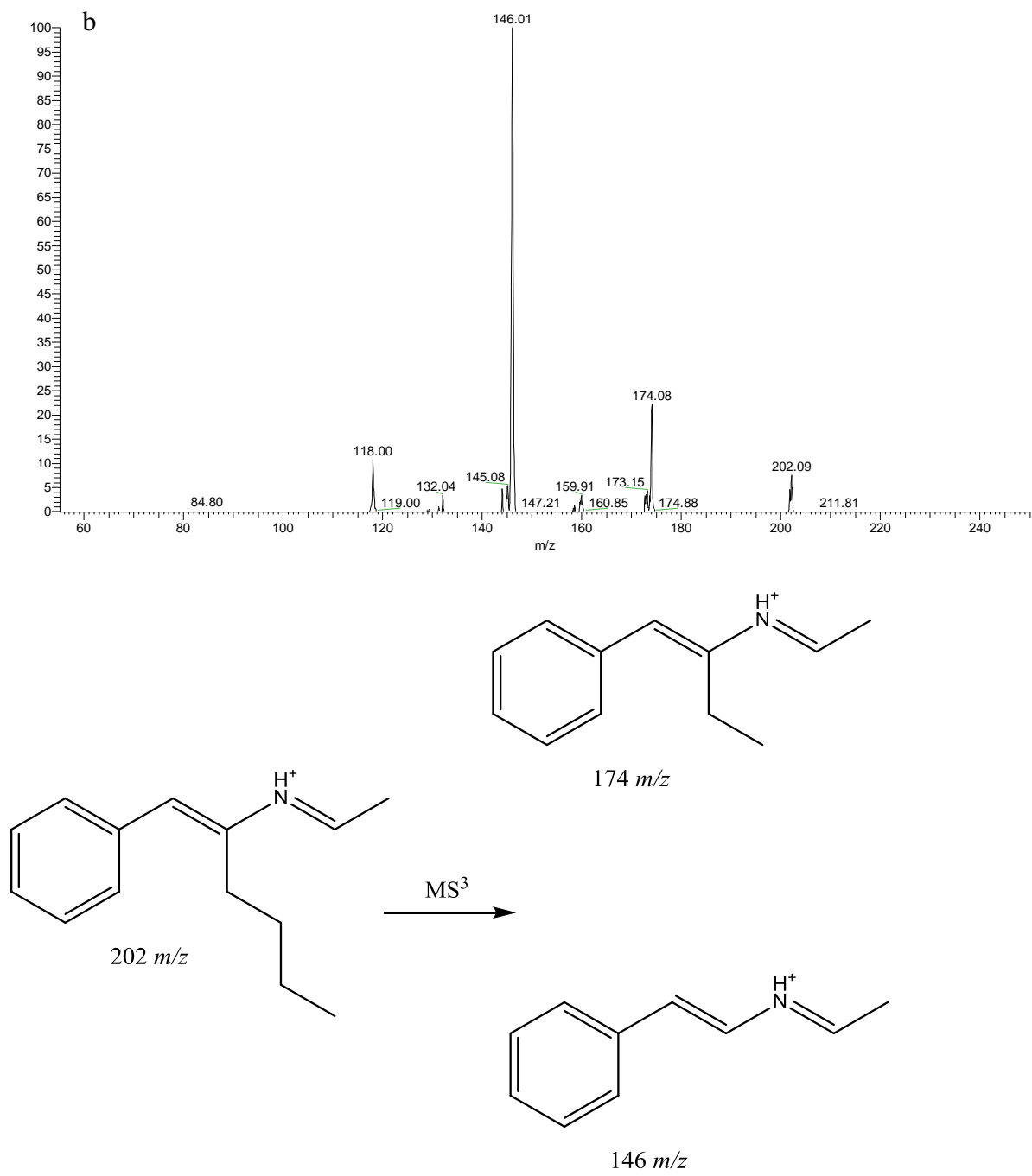
Rys. 23a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 4F-PD wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



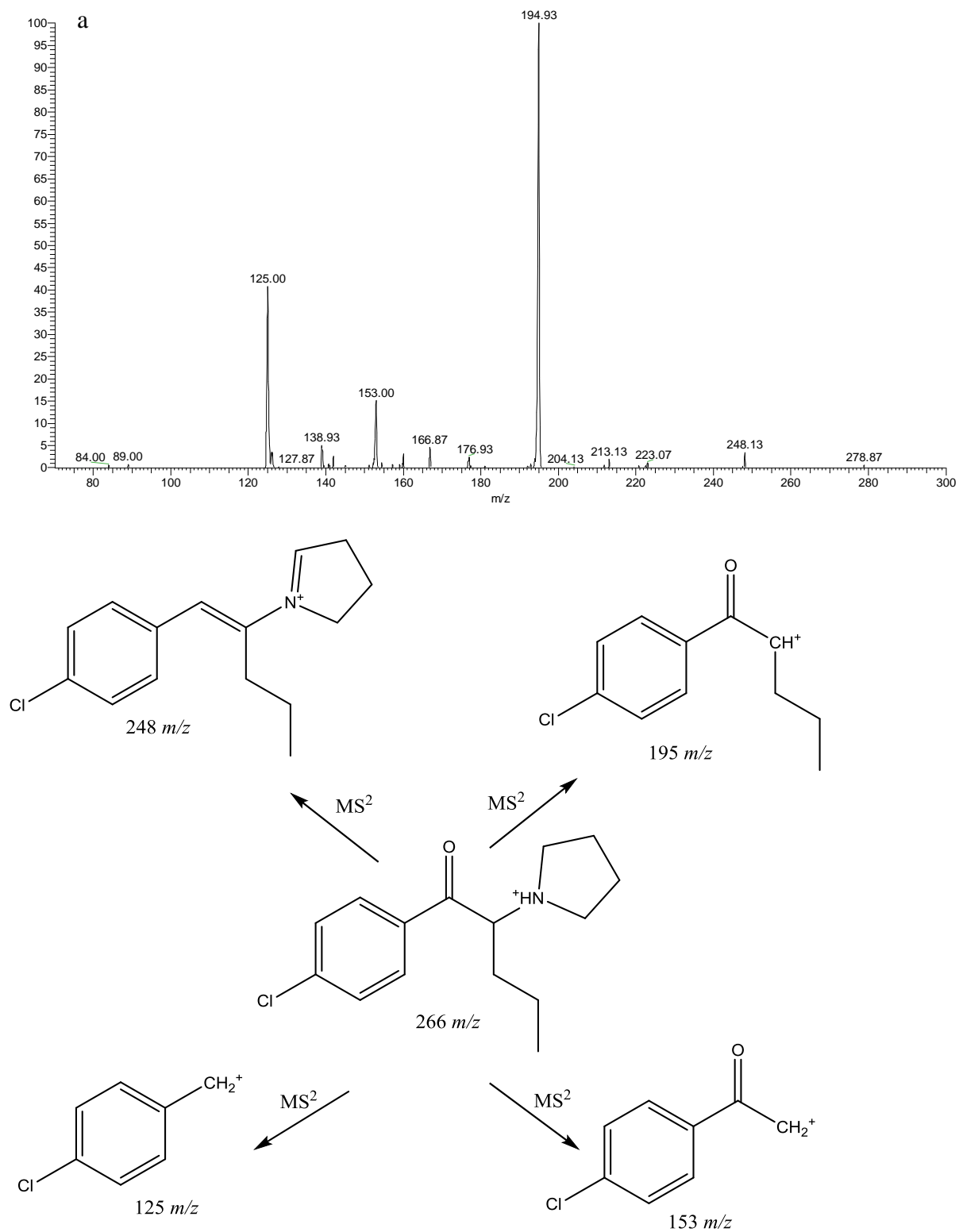
Rys. 23b. Widmo ESI- MS^3 cząsteczki 4F-PD wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



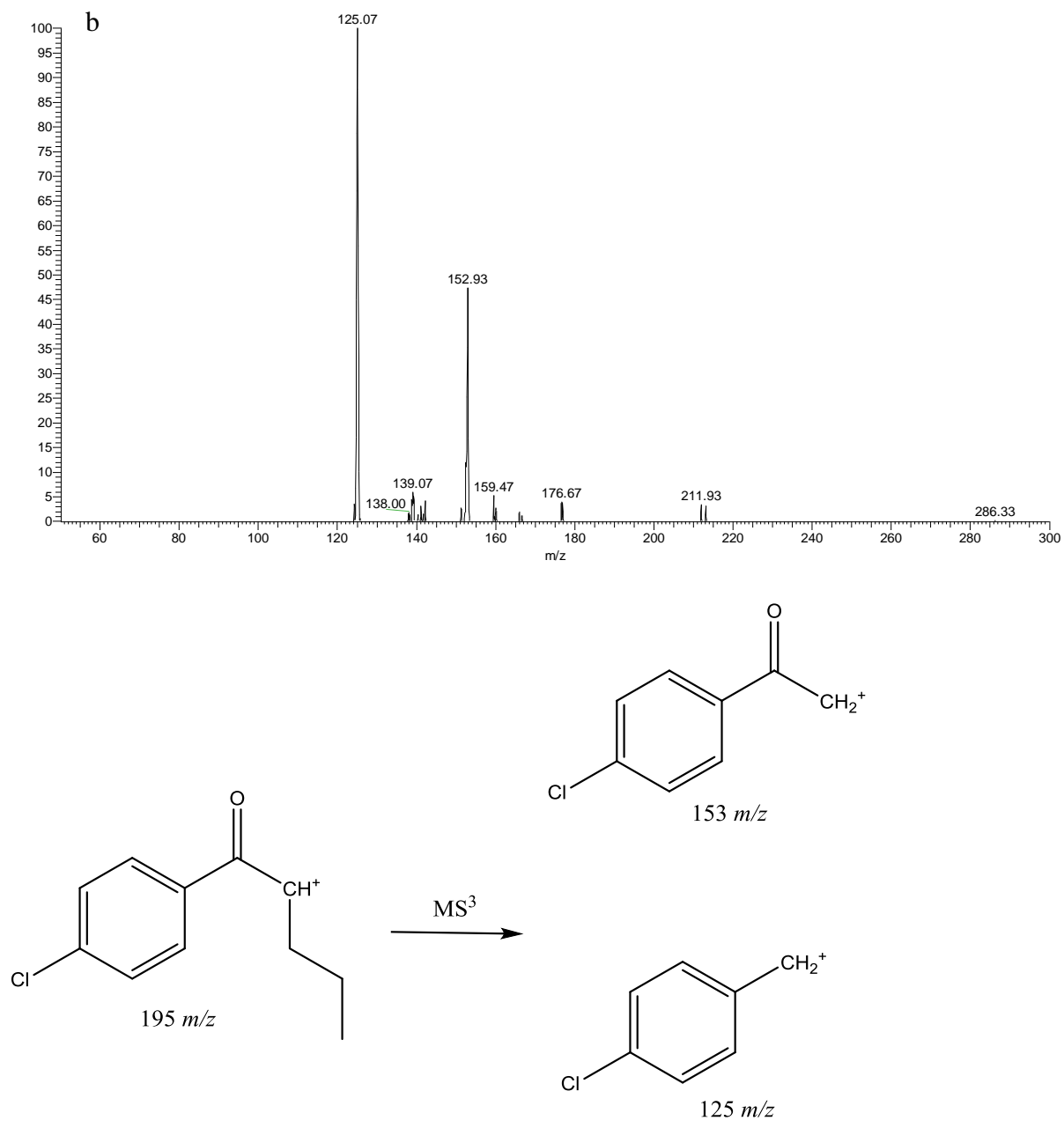
Rys. 24a. Widmo ESI- MS^2 cząsteczki α -EAHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



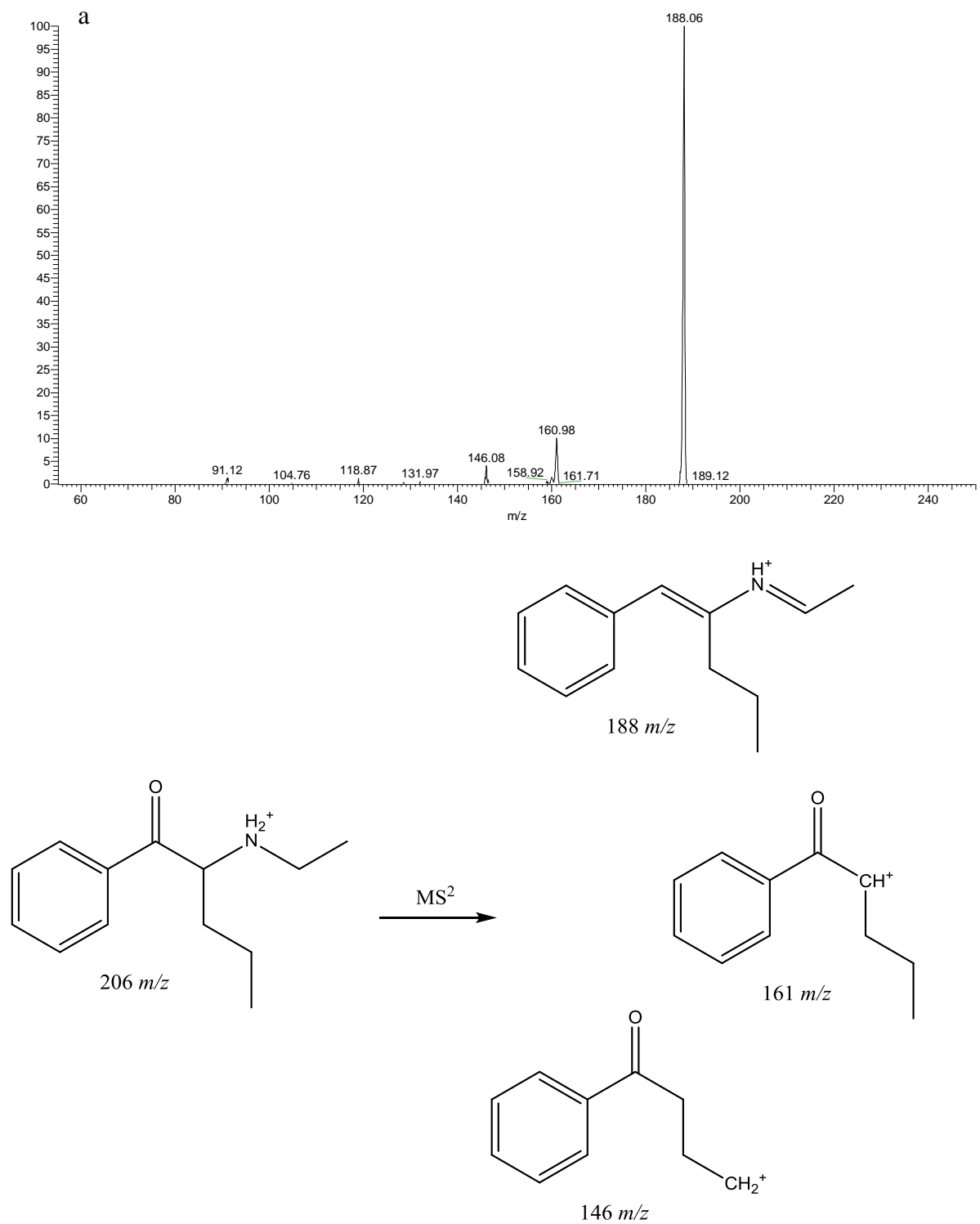
Rys. 24b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki α -EAHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



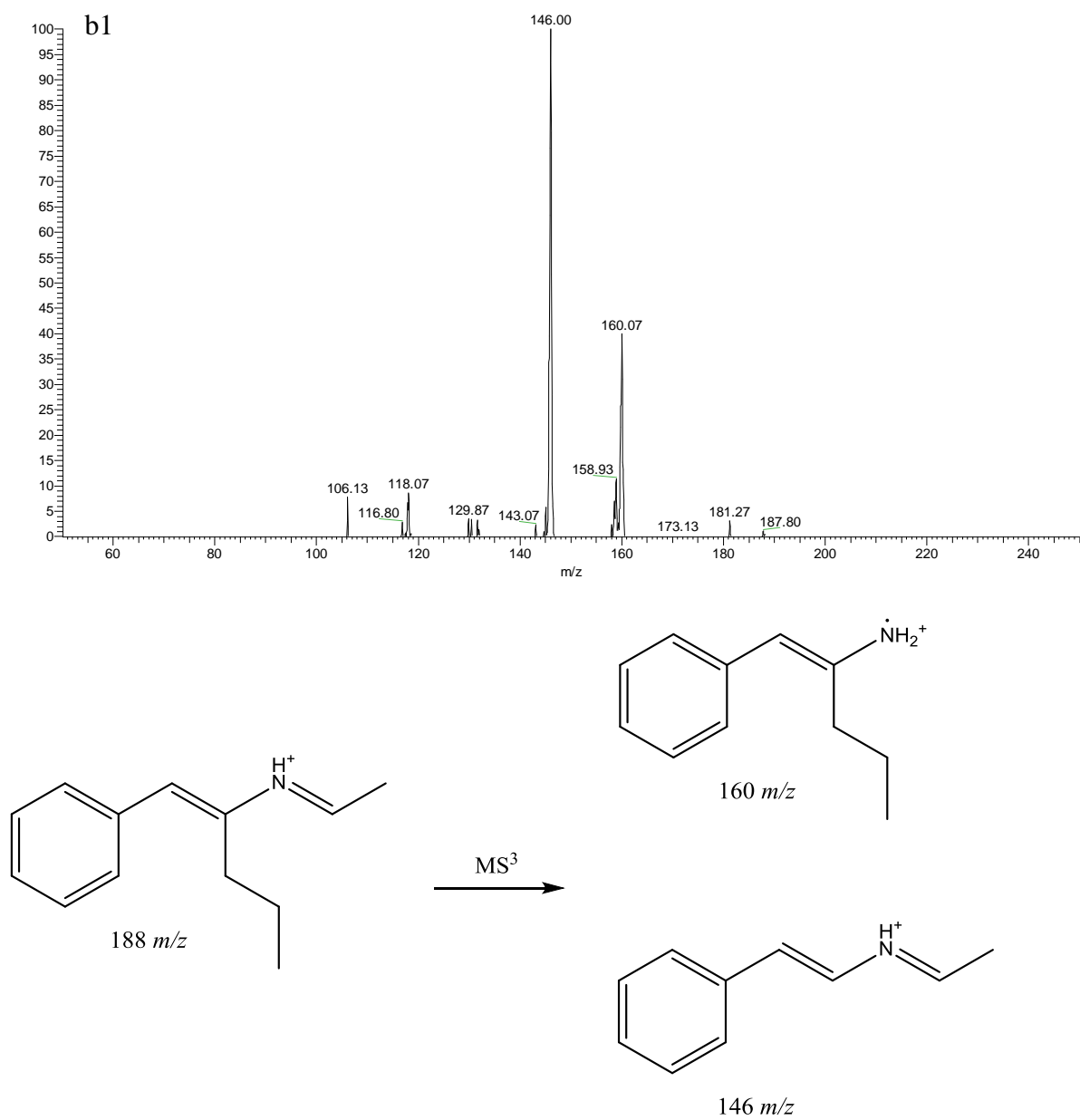
Rys. 25a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 4-Cl- α -PVP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



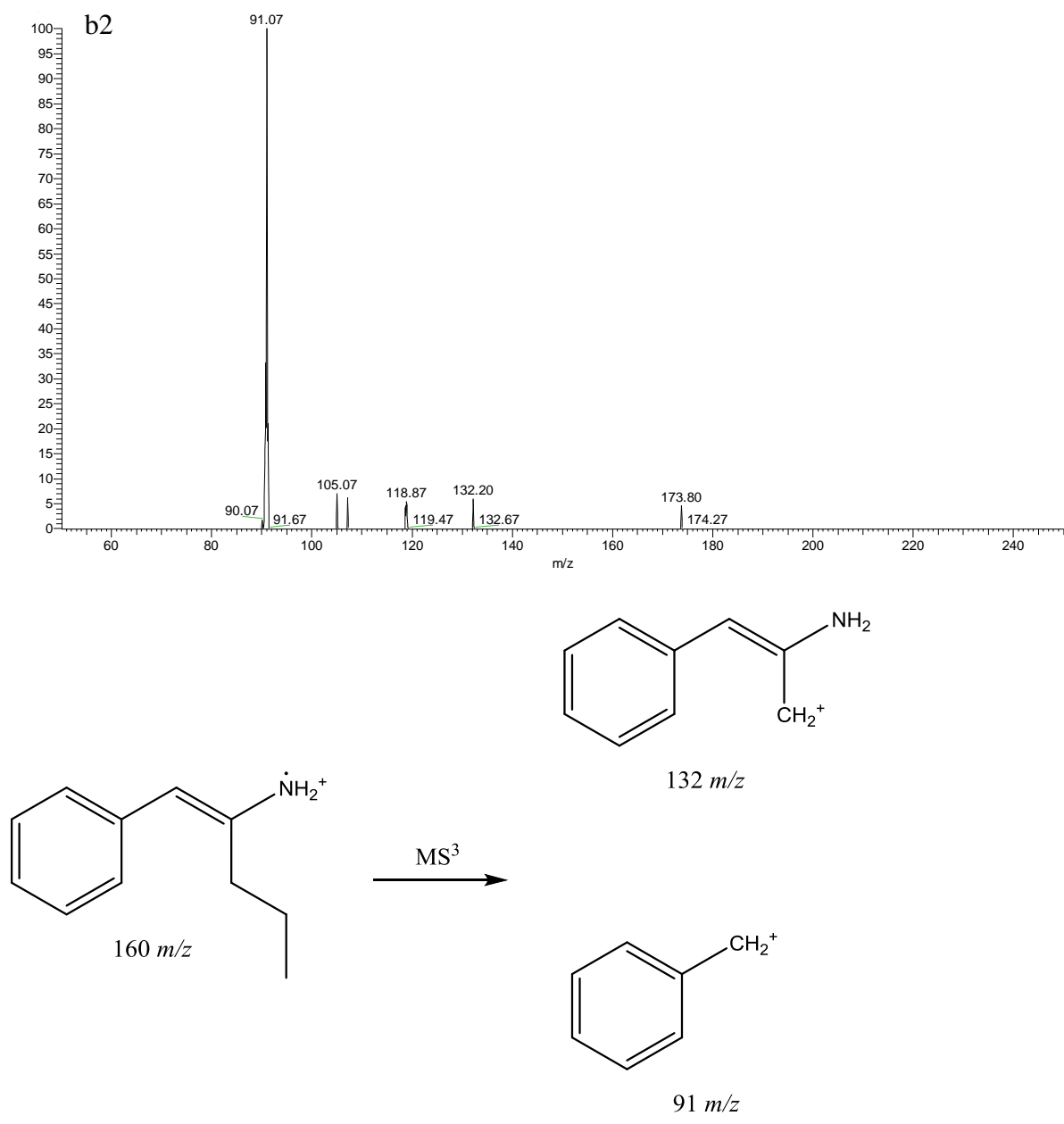
Rys. 25b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 4-Cl- α -PVP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



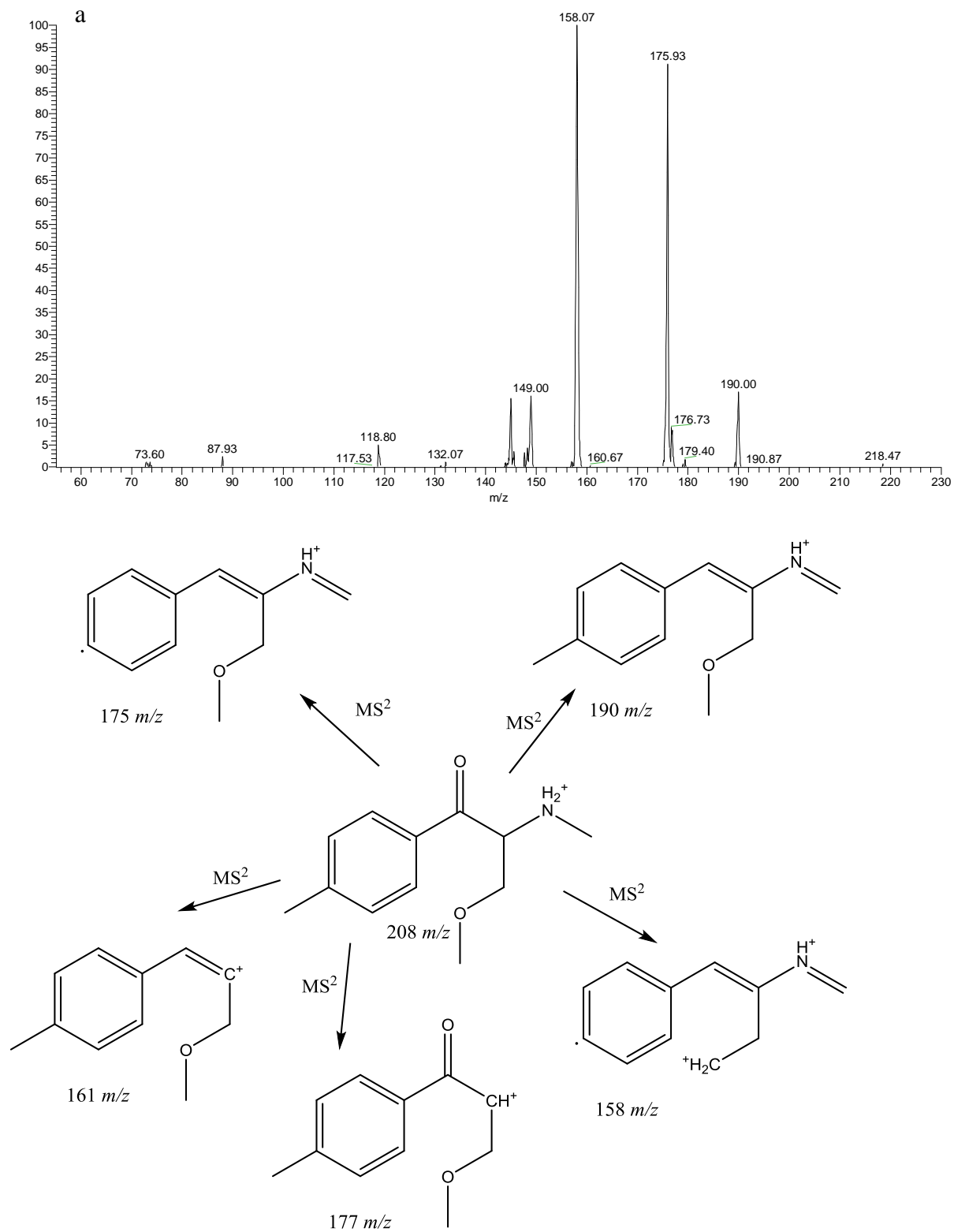
Rys. 26a. Widmo ESI-MS² cząsteczki α -EAPP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



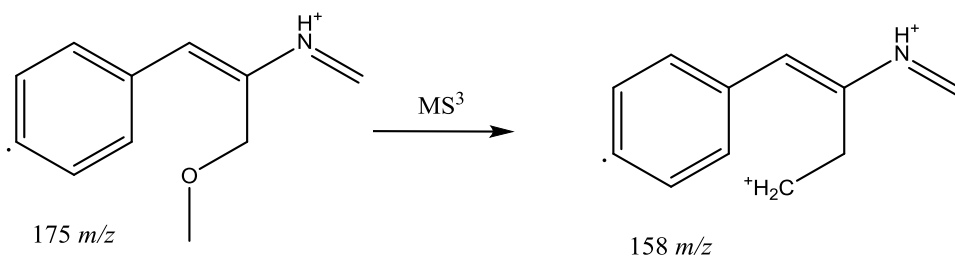
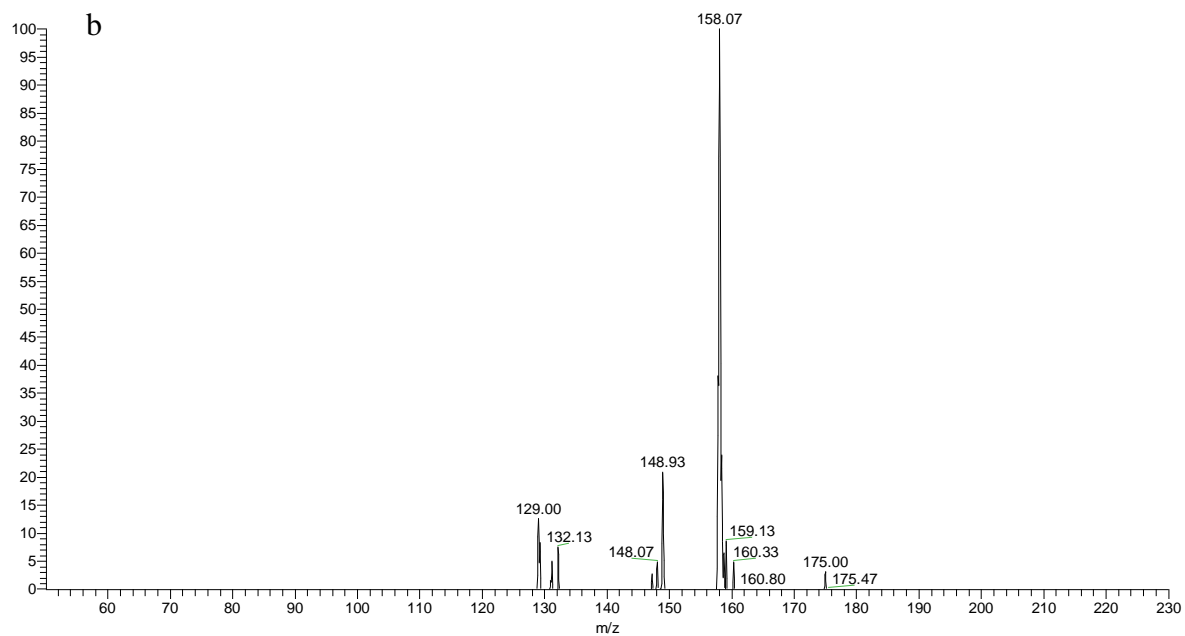
Rys. 26b1. Widmo ESI-MS³ cząsteczki α -EAPP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



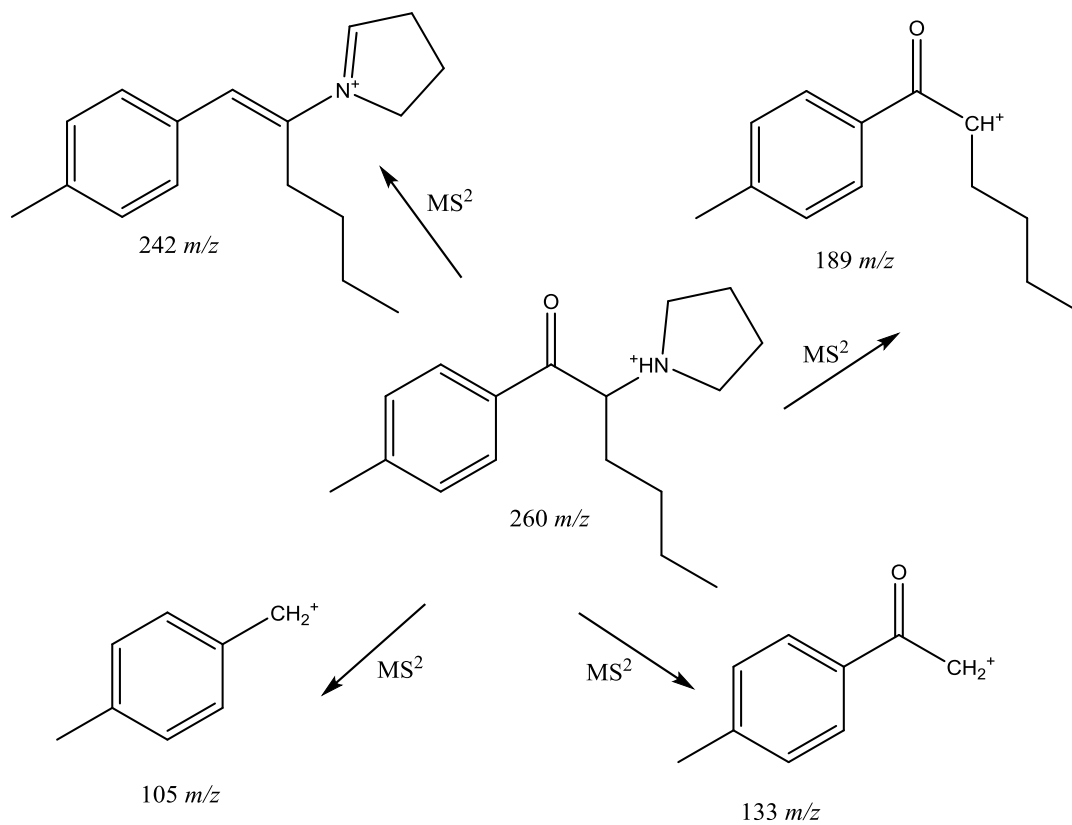
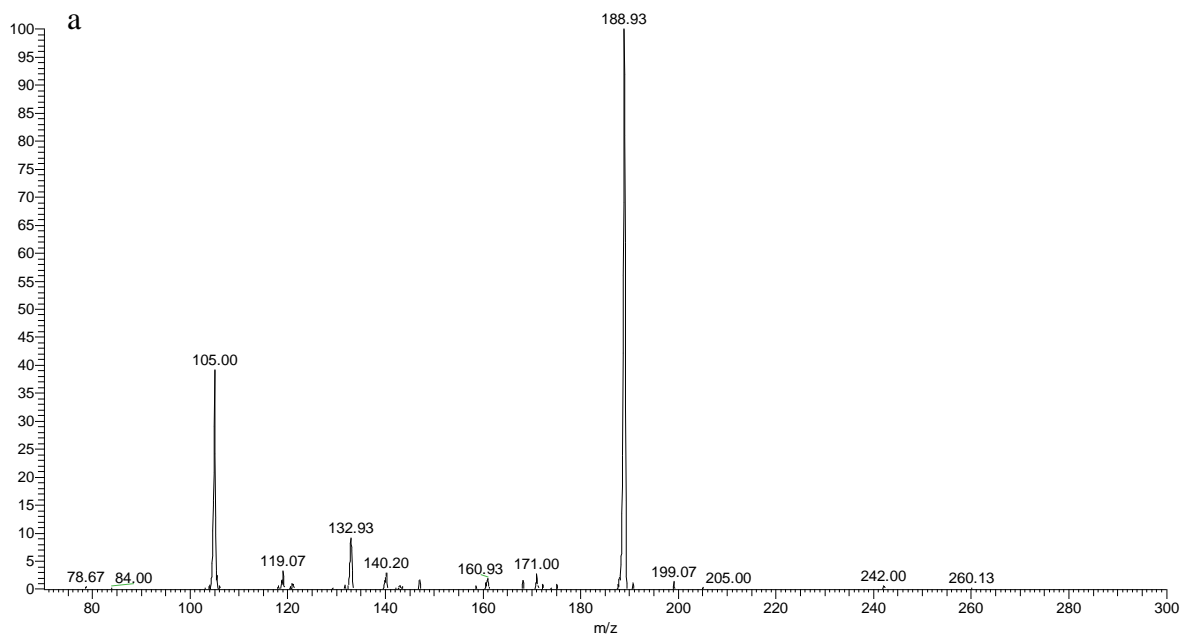
Rys. 26b2. Widmo ESI-MS³ cząsteczki α -EAPP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



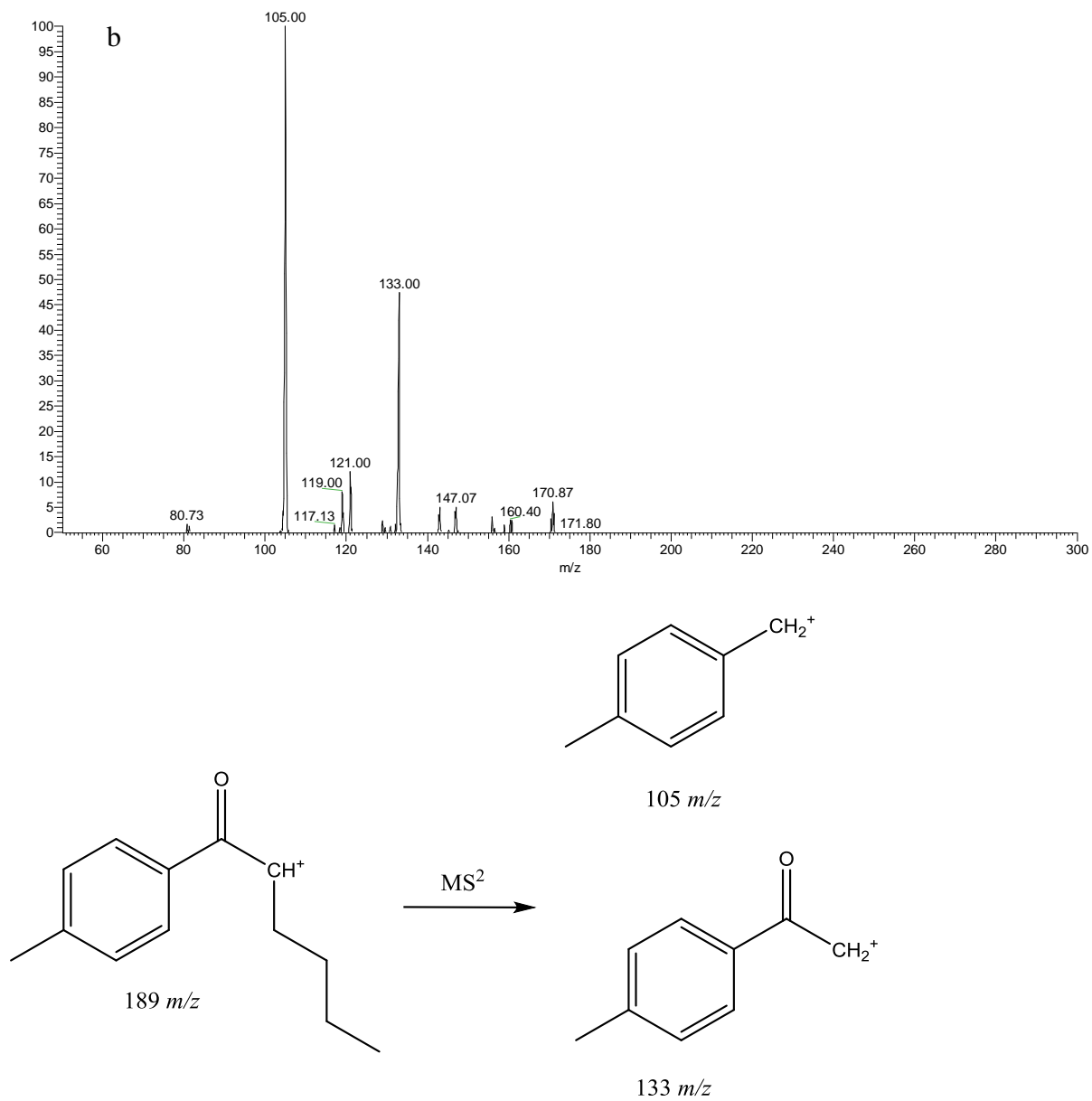
Rys. 27a. Widmo ESI-MS² cząsteczki meksedronu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



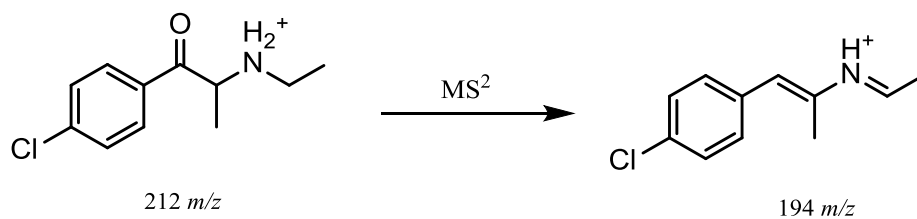
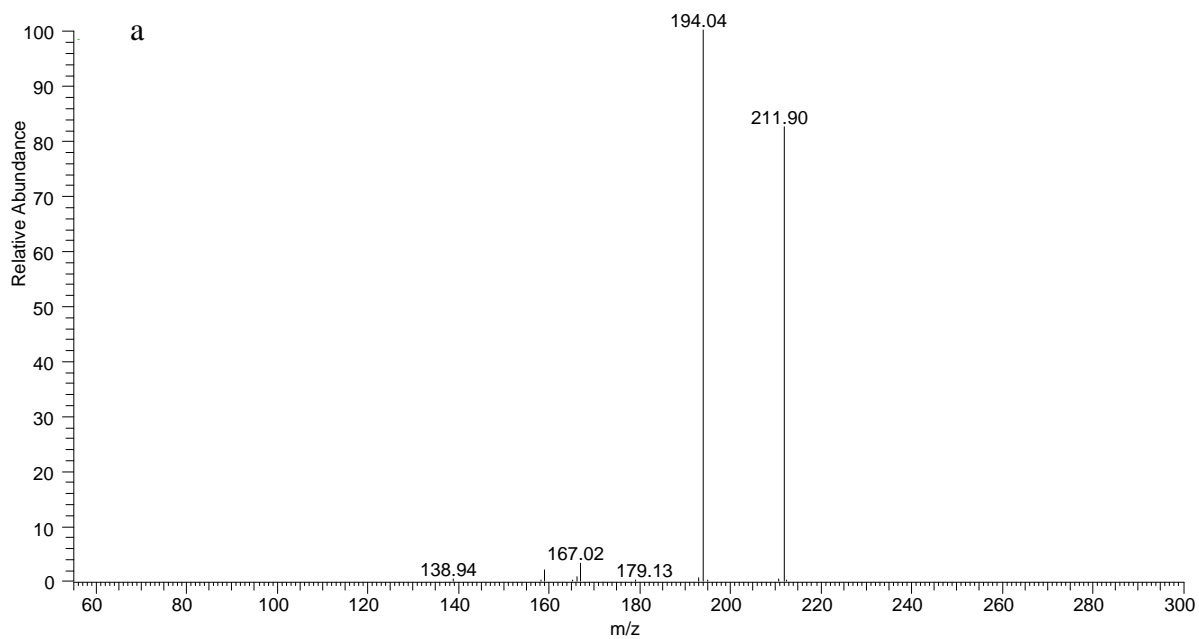
Rys. 27b. Widmo ESI- MS^3 cząsteczki meksedronu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



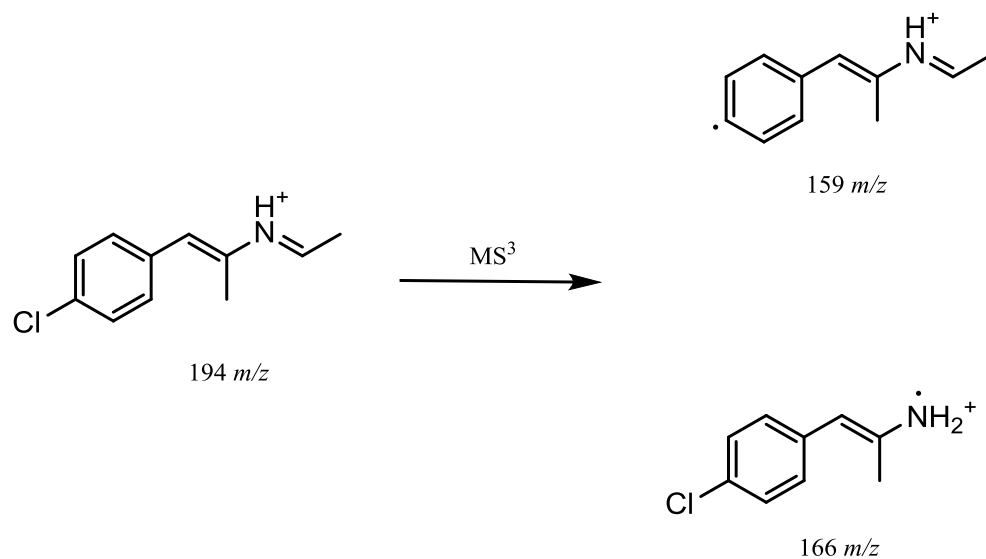
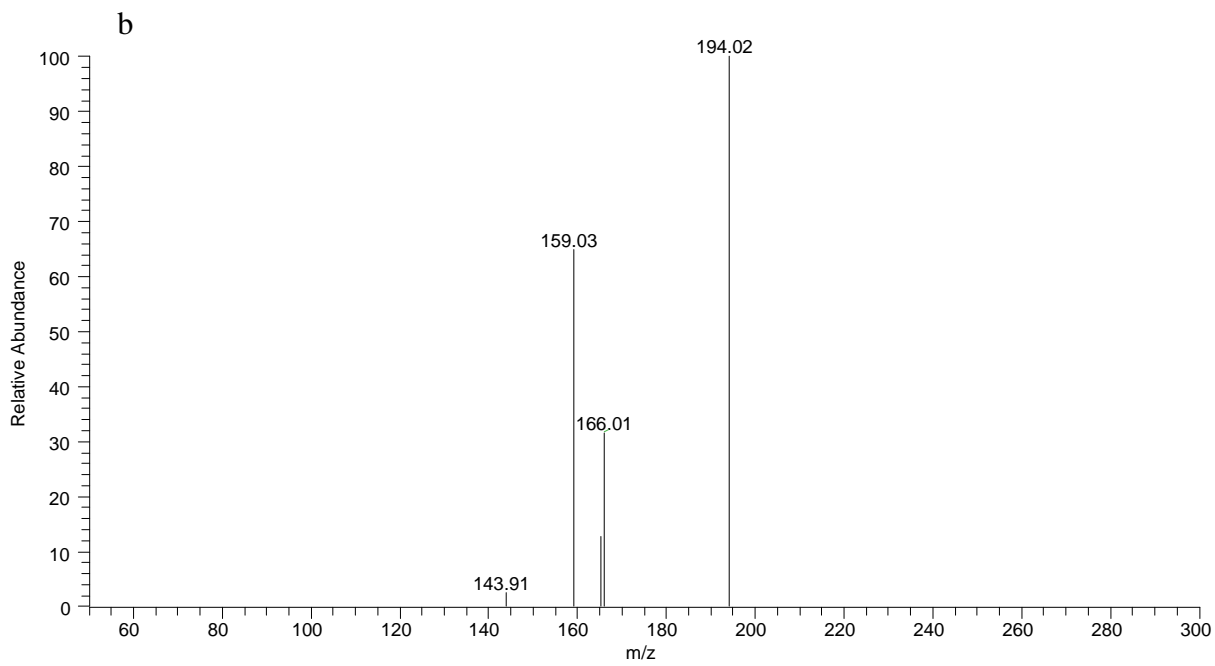
Rys. 28a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 4-metylo- α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



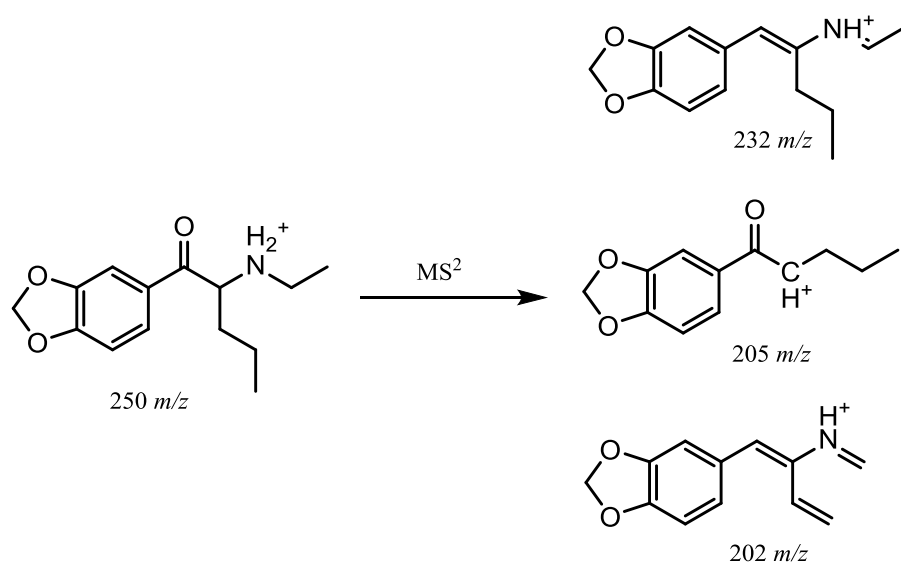
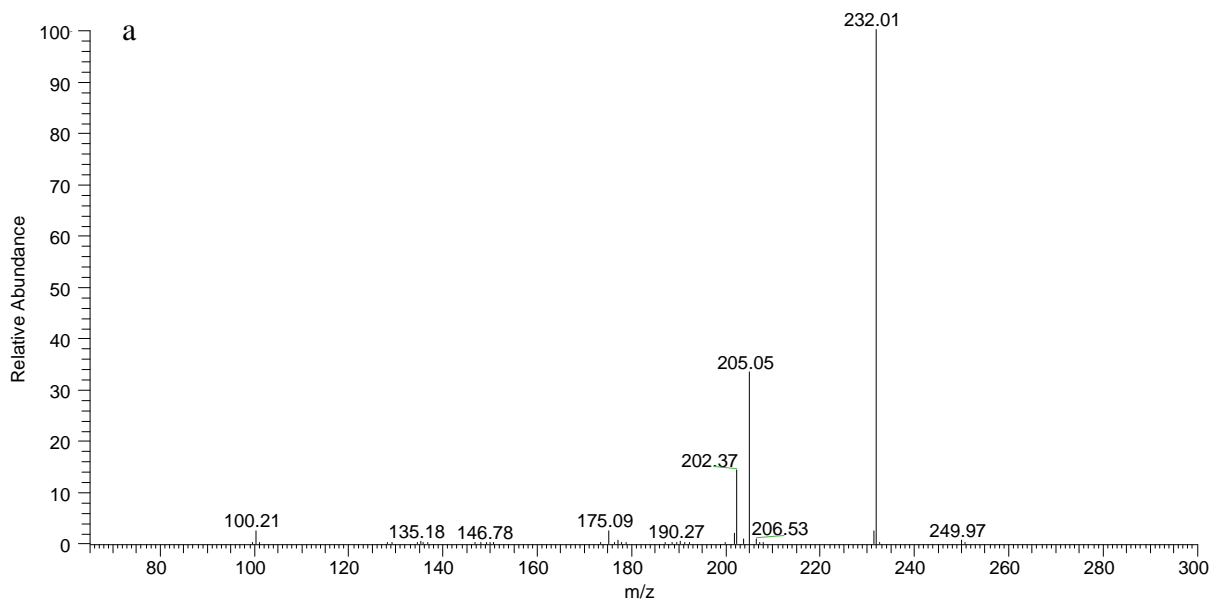
Rys. 28b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 4-metylo- α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



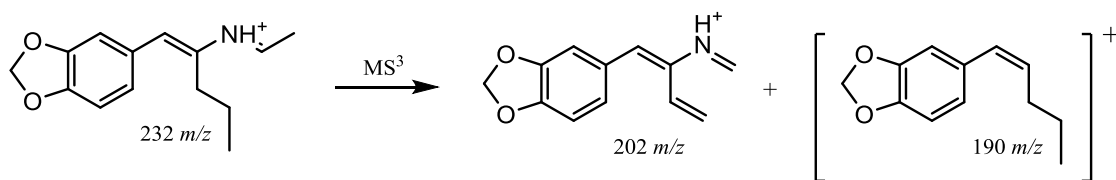
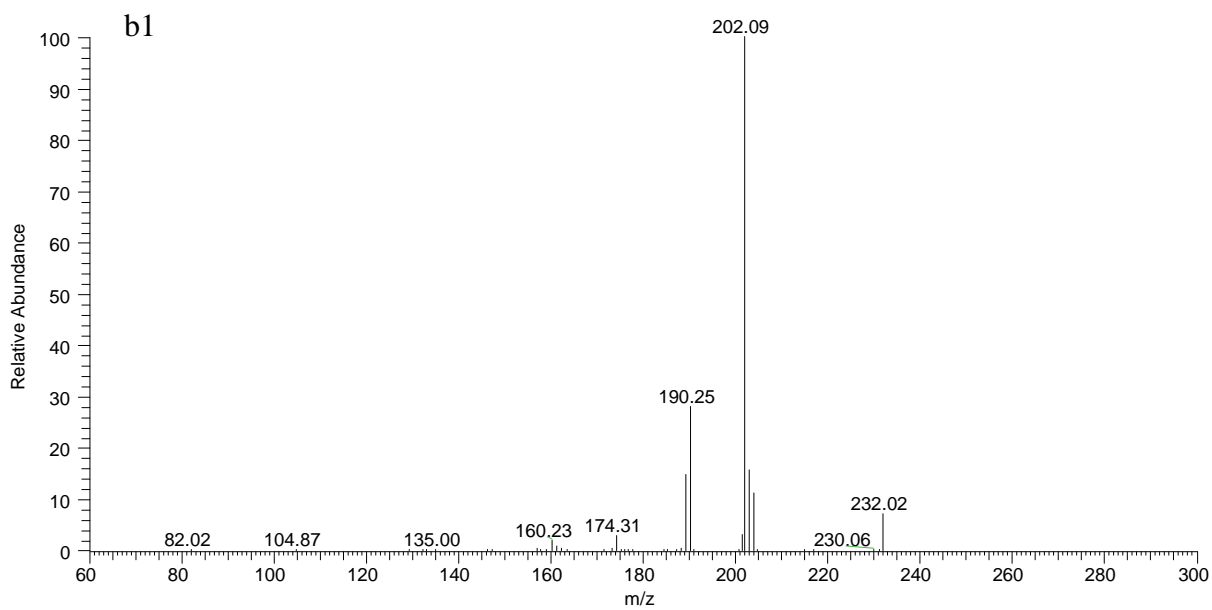
Rys. 29a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 4-CEC wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



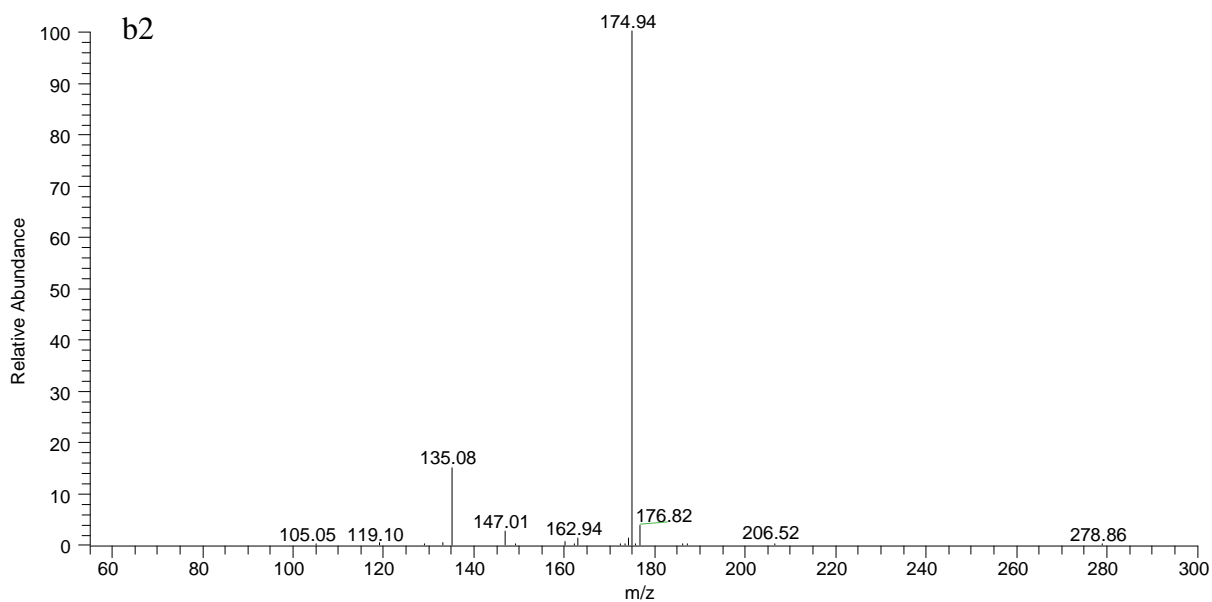
Rys. 29b. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 4-CEC wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury

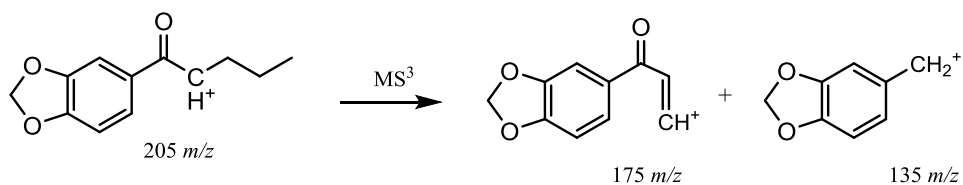


Rys. 30a. Widmo ESI-MS² cząsteczki *N*-etylopentylonu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury

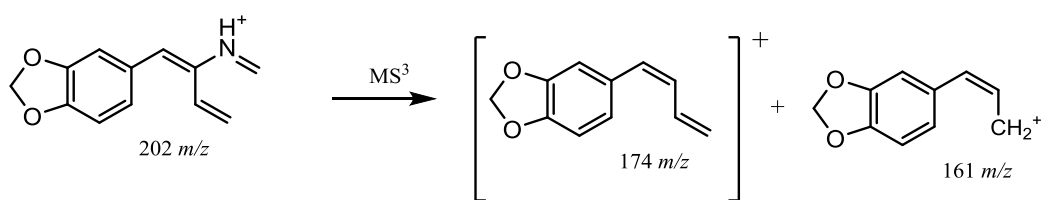
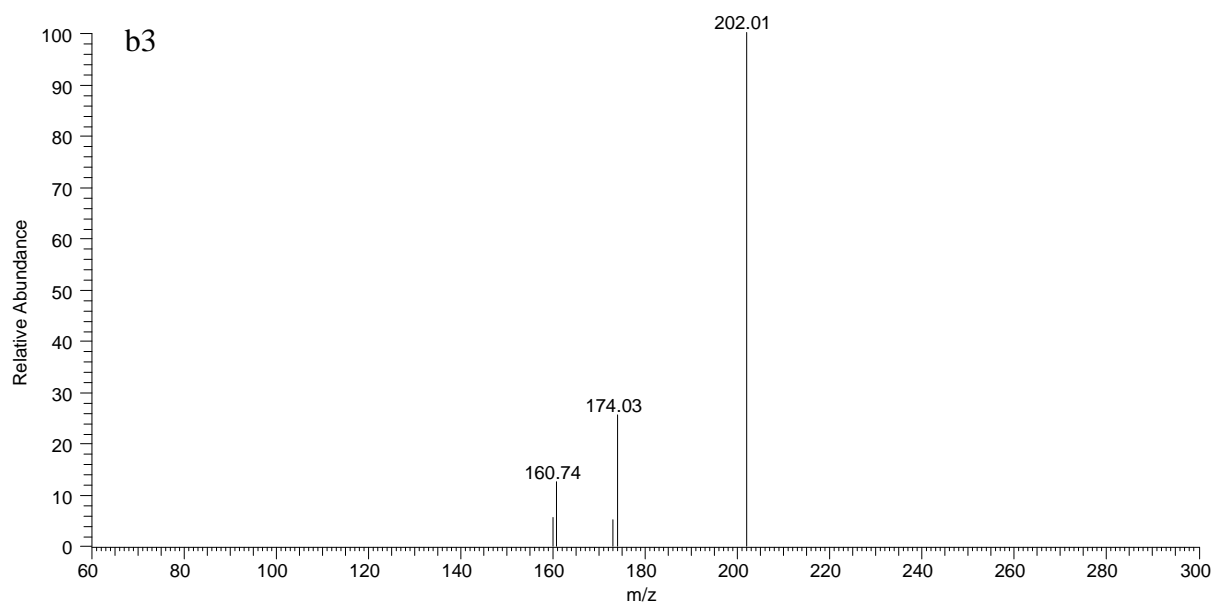


Rys. 30b1. Widmo ESI-MS³ cząsteczki *N*-etylopentylonu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury

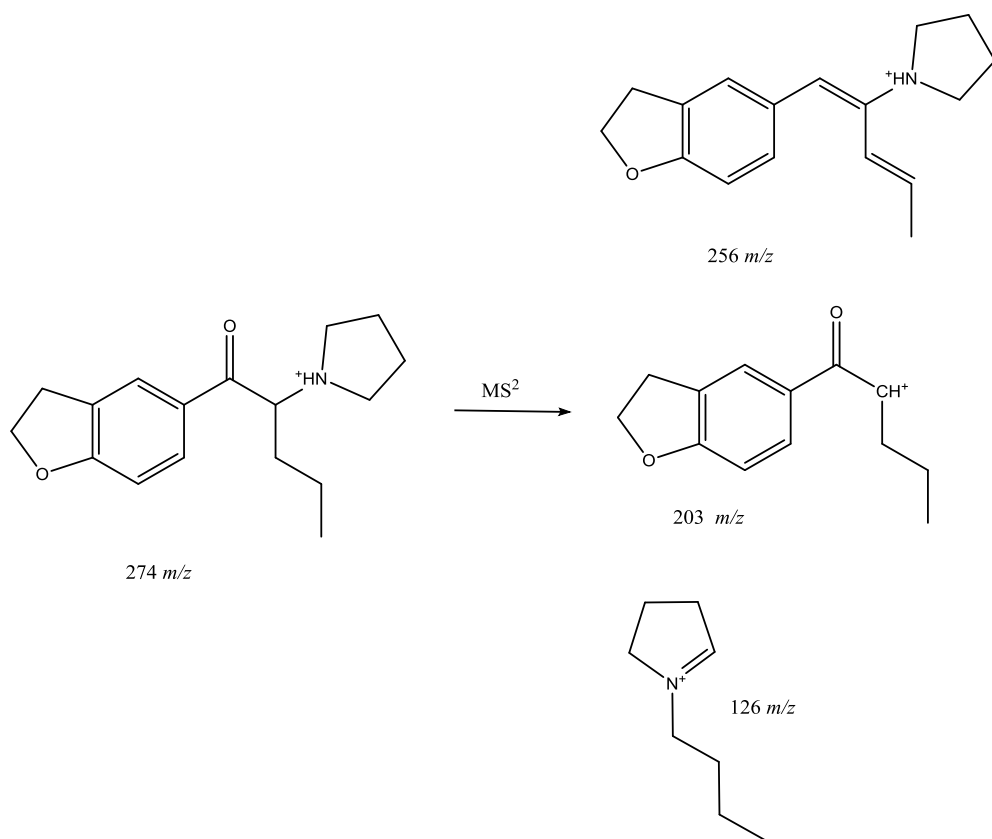
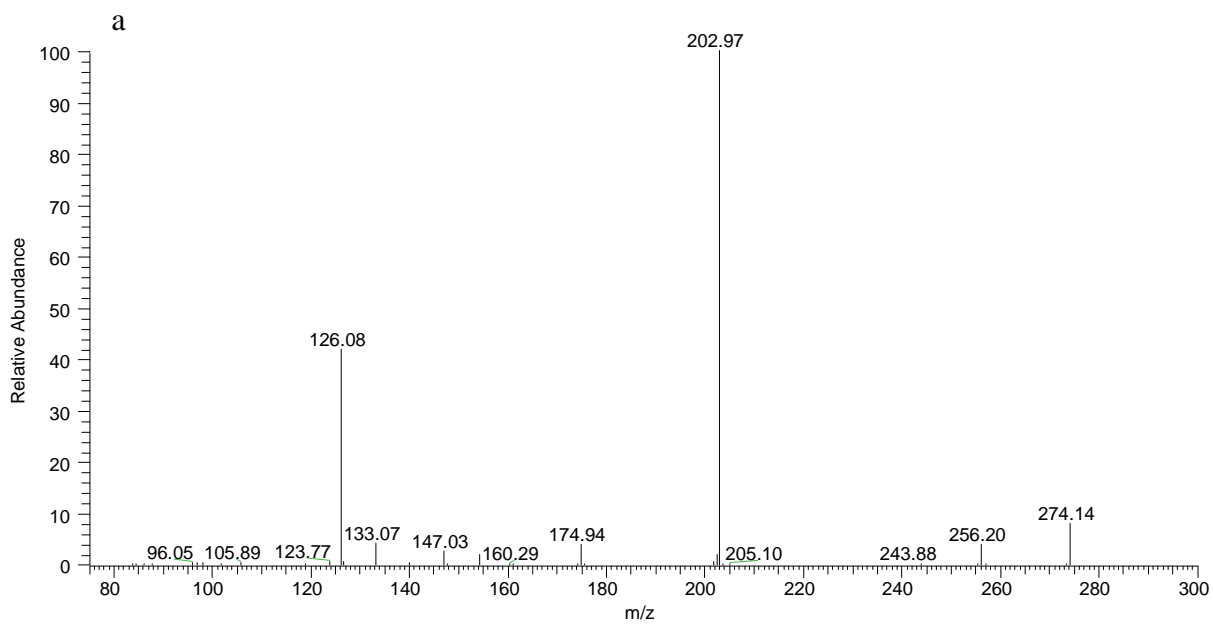




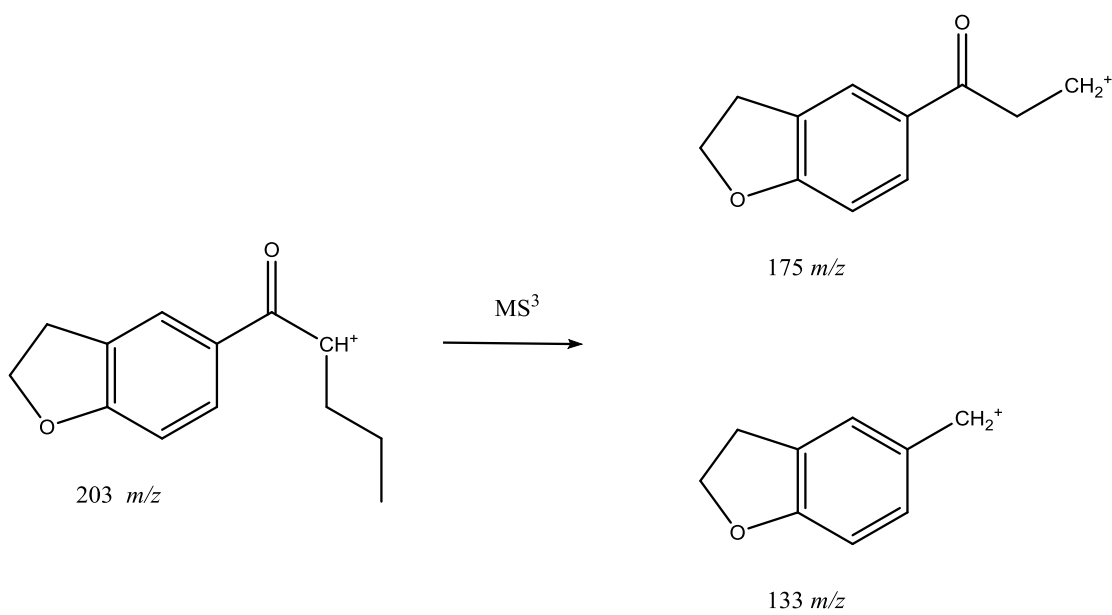
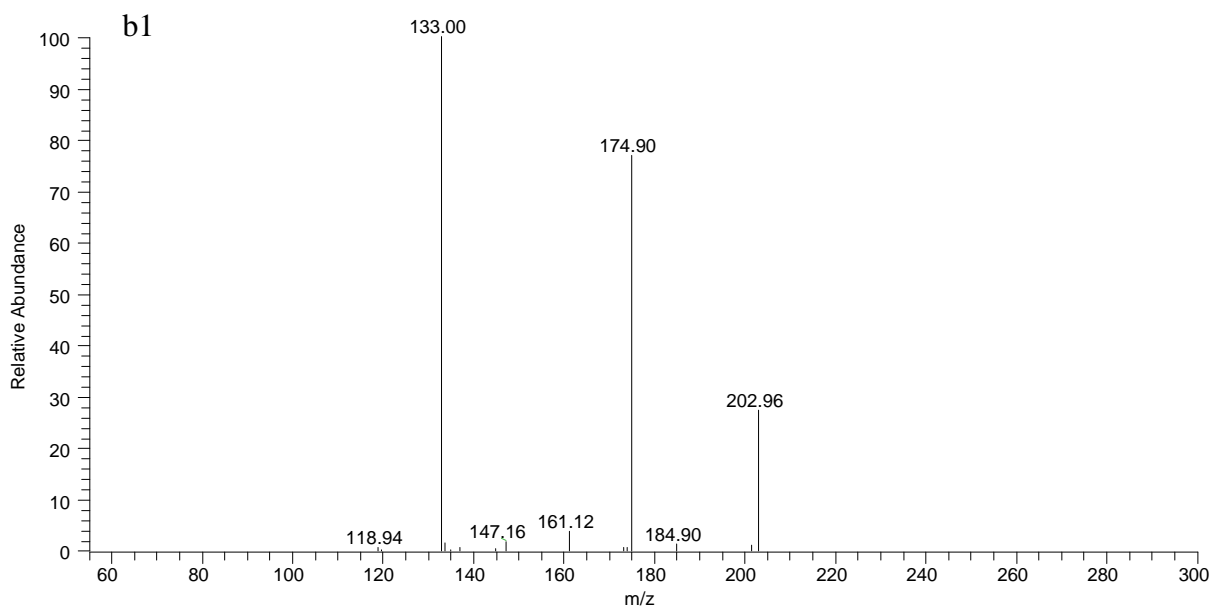
Rys. 30b2. Widmo ESI-MS³ cząsteczki *N*-etylopentylonu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



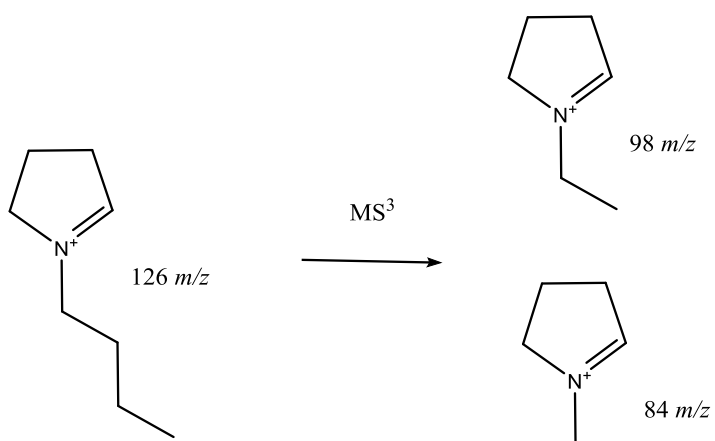
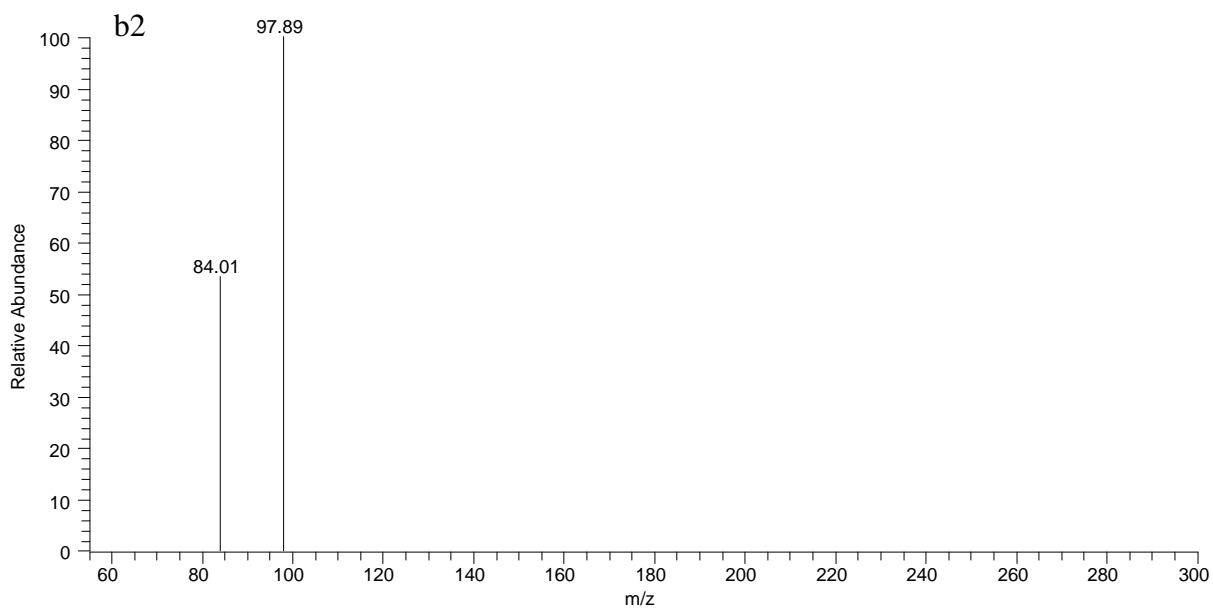
Rys. 30b3. Widmo ESI-MS³ cząsteczki *N*-etylopentylonu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



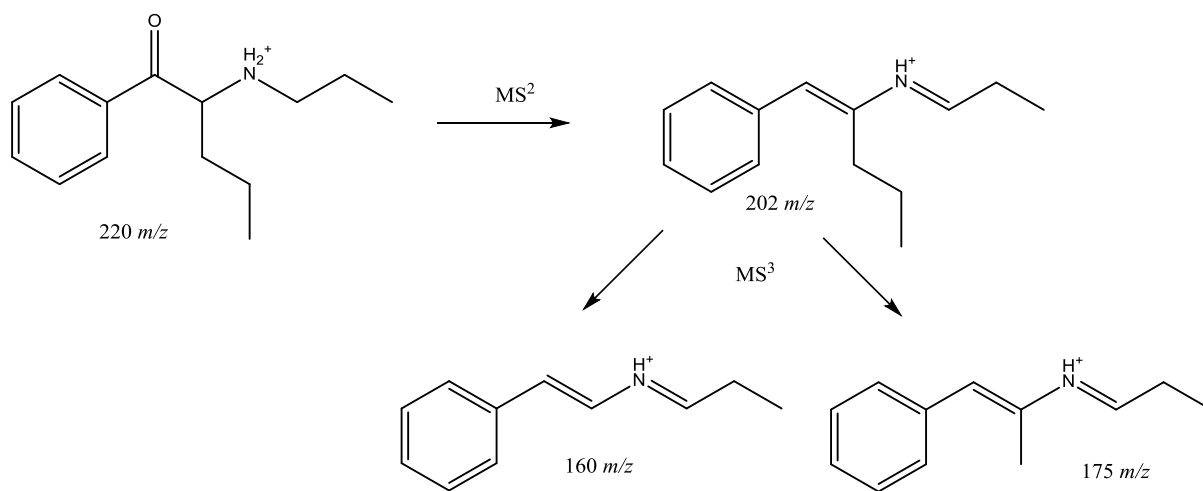
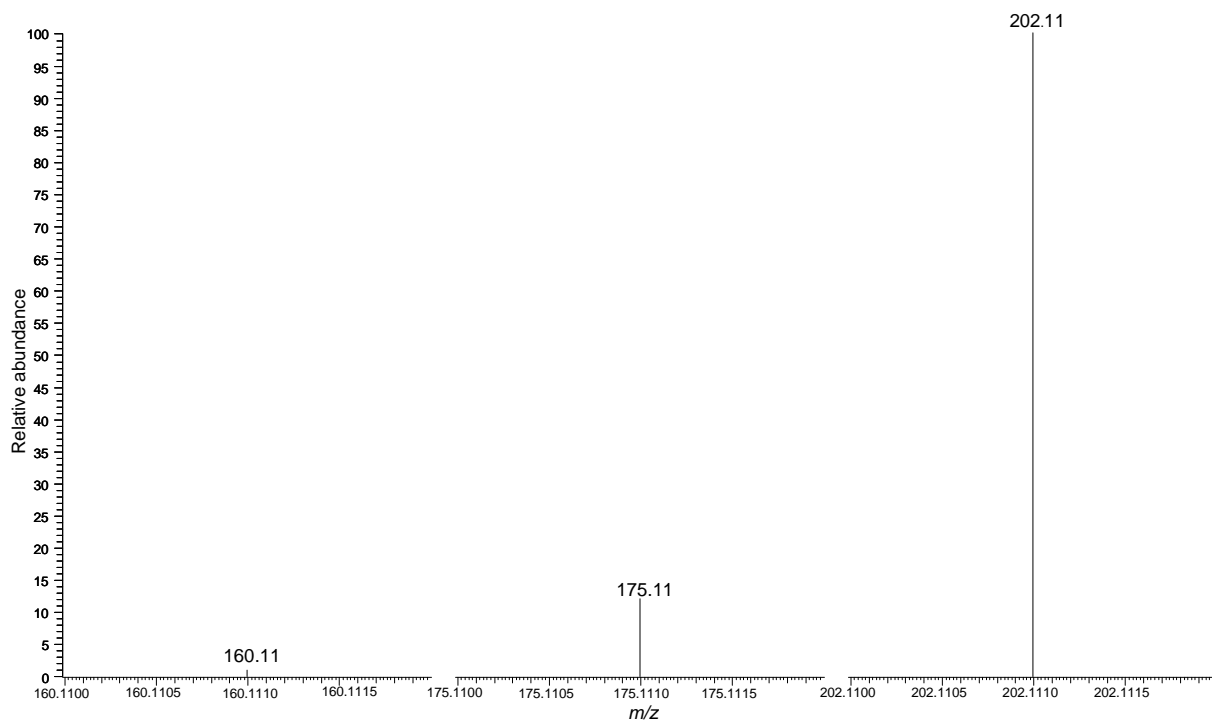
Rys. 31a. Widmo ESI-MS² cząsteczki 3-desoxy-3,4-MDPV wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



Rys. 31b1. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 3-desoxy-3,4-MDPV wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



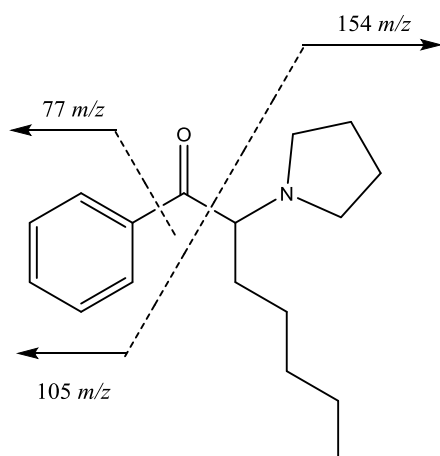
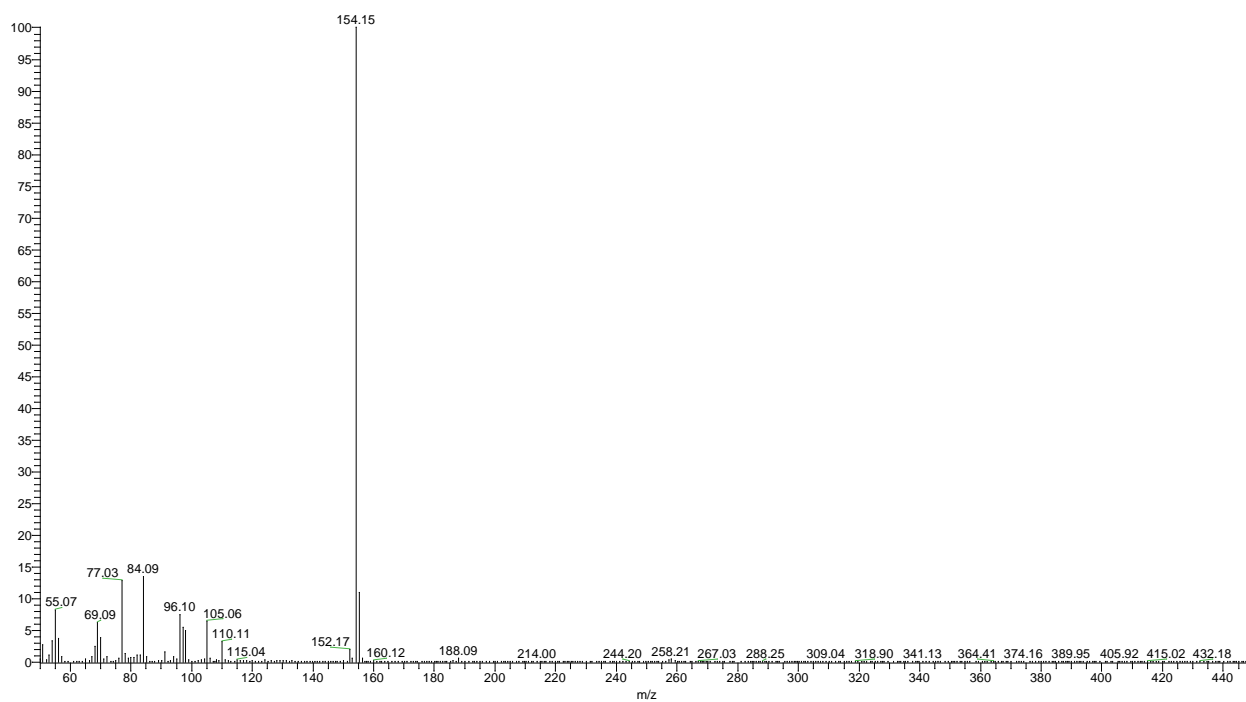
Rys. 31b2. Widmo ESI-MS³ cząsteczki 3-desoxy-3,4-MDPV wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



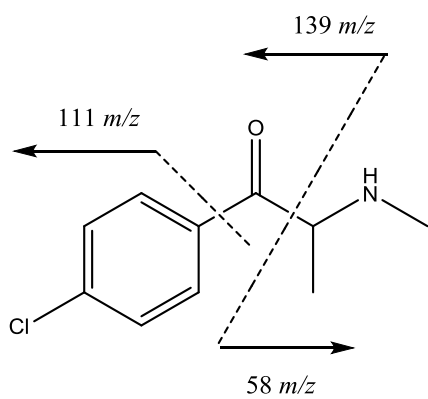
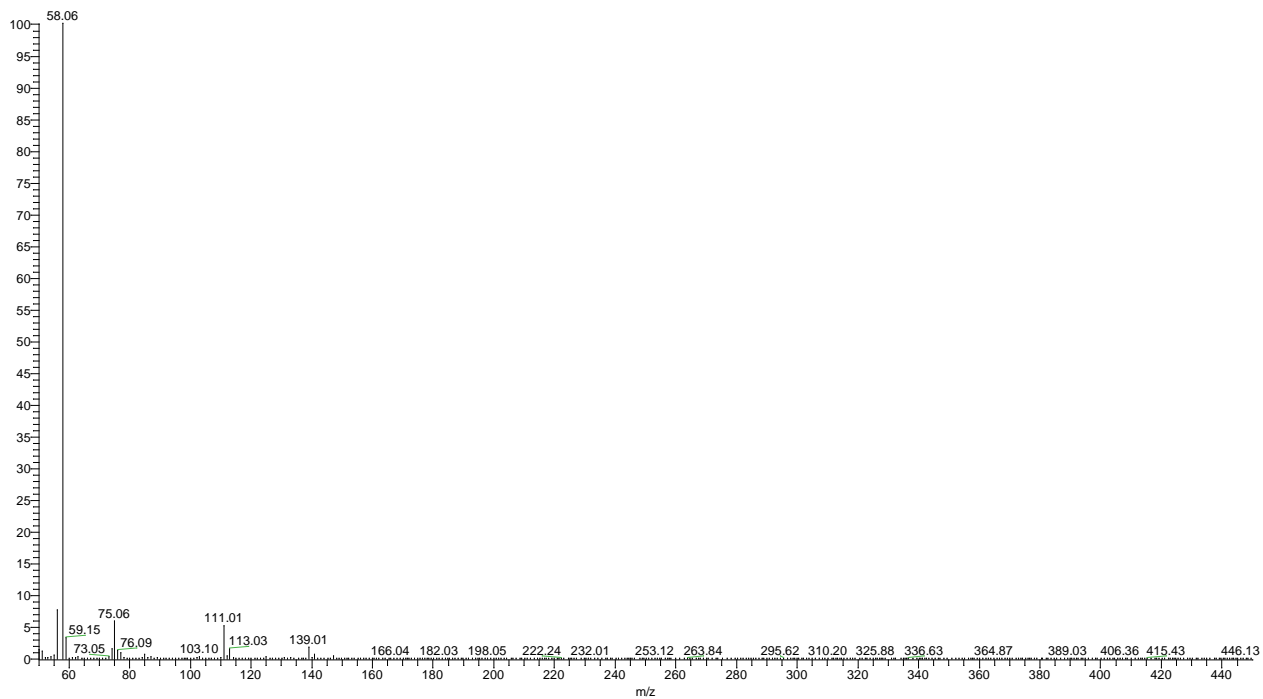
Rys. 32. Widmo ESI-MS³ cząsteczki α -PAPP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury

4.5.2 Chromatografia gazowa sprzężona z spektrometrią mas (GC-MS)

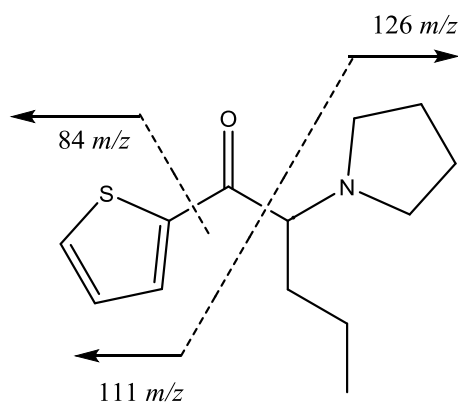
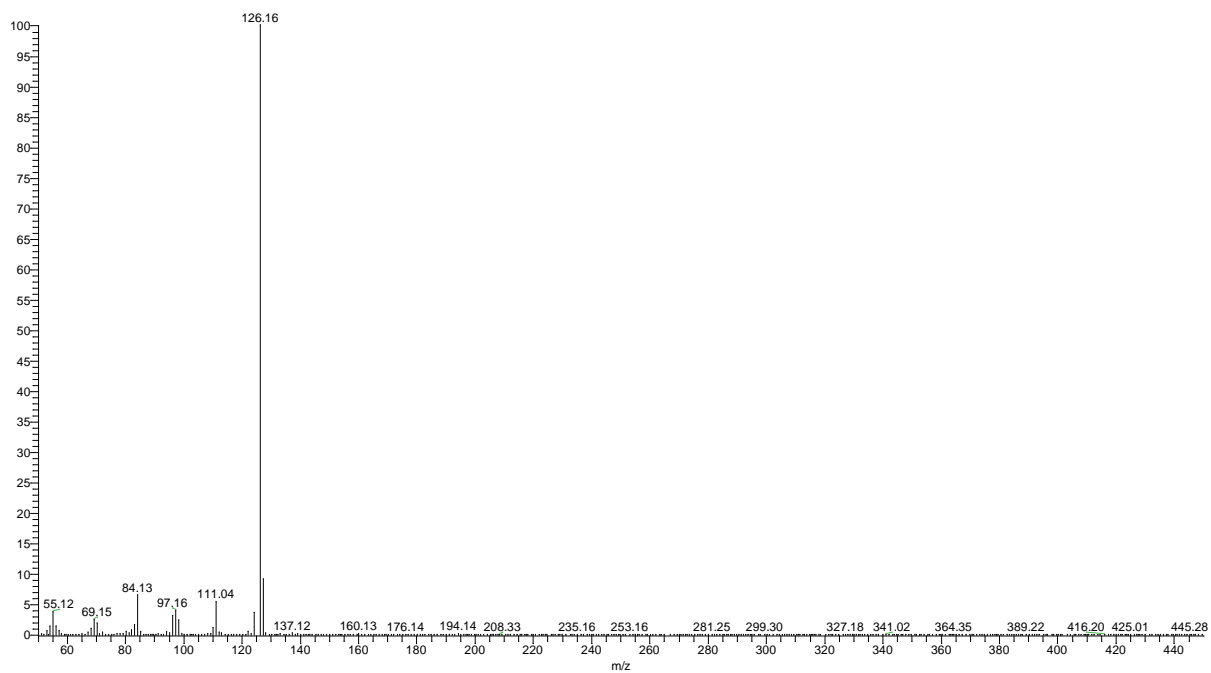
Wszystkie otrzymane widma masowe po analizie techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie jonizacji typu EI oraz proponowane fragmentacje poszczególnych cząsteczek, przedstawione zostają na poniższych rysunkach.



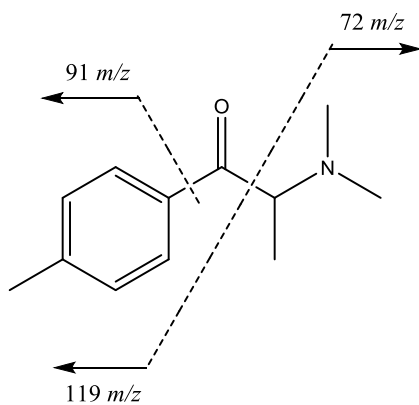
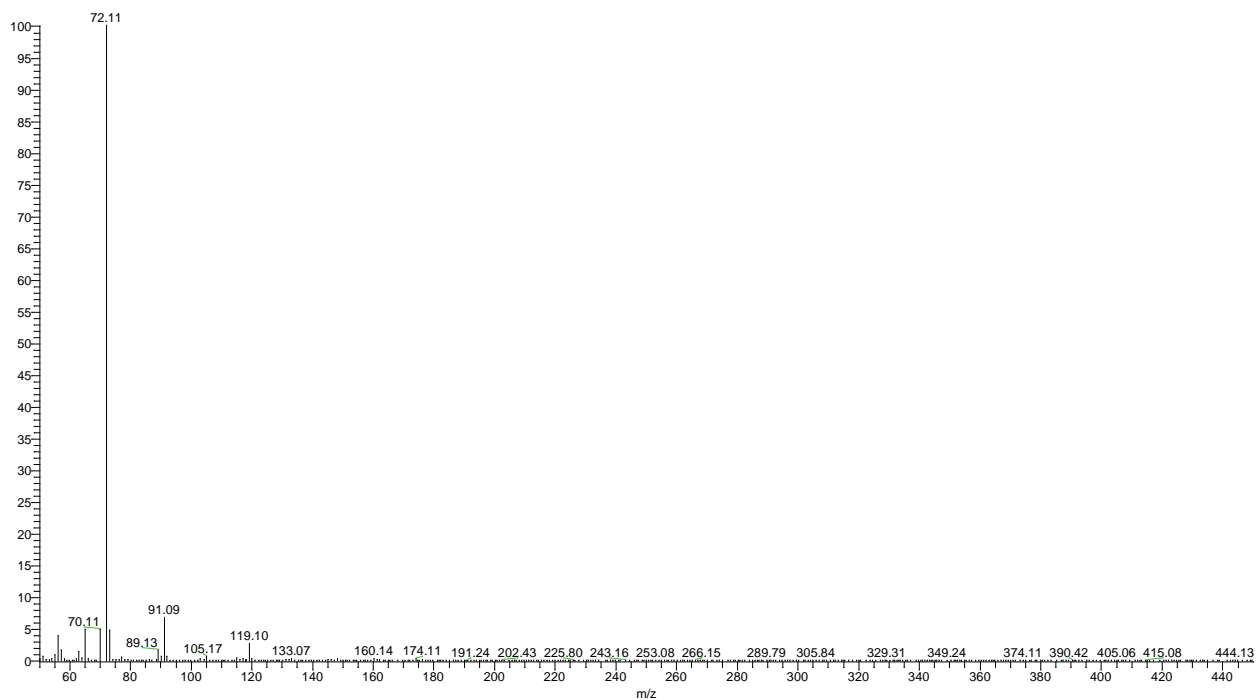
Rys. 33. Widmo EI-MS cząsteczki PV8 wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



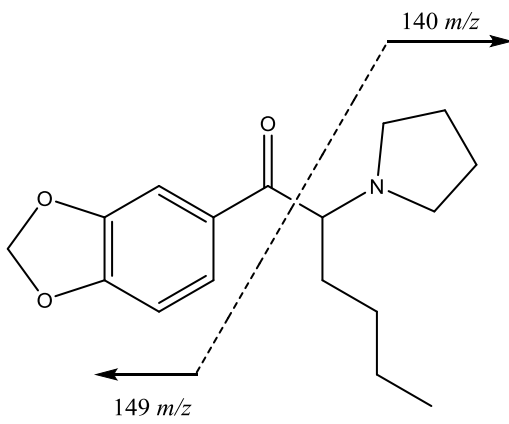
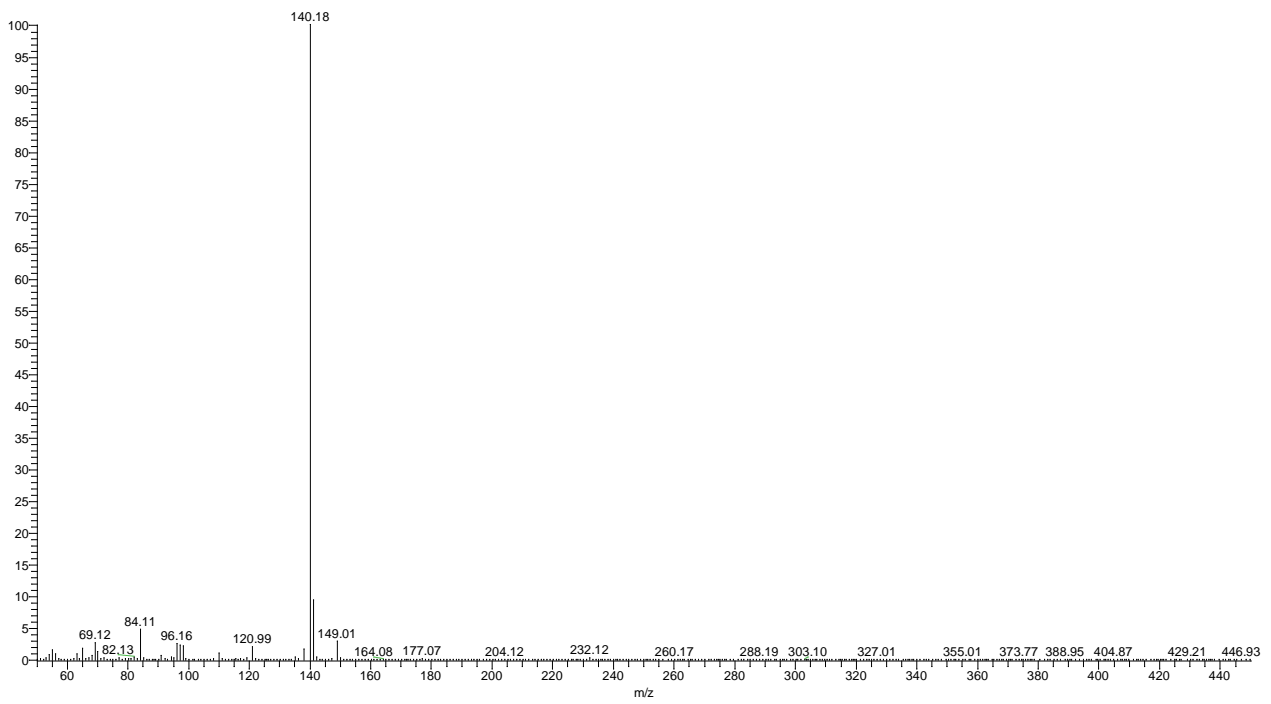
Rys. 34. Widmo EI-MS cząsteczki 4-CMC wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



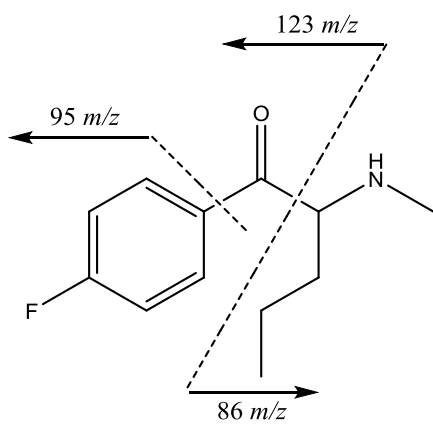
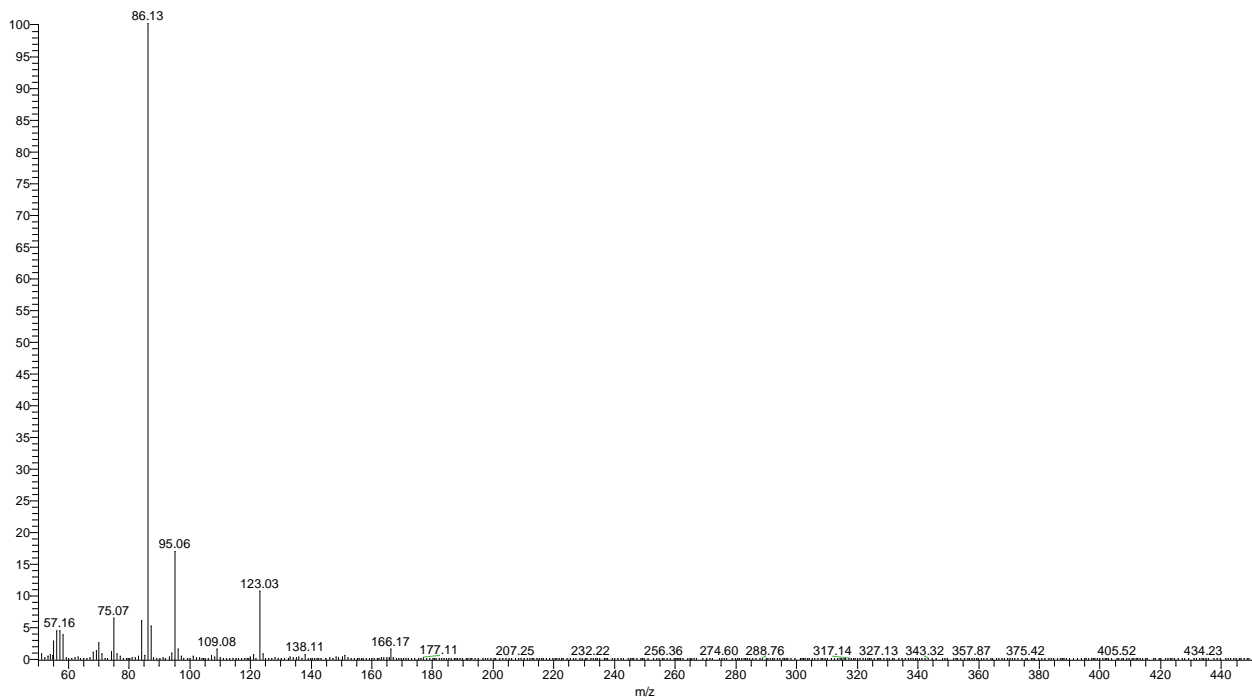
Rys. 35. Widmo EI-MS cząsteczki α -PVT wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



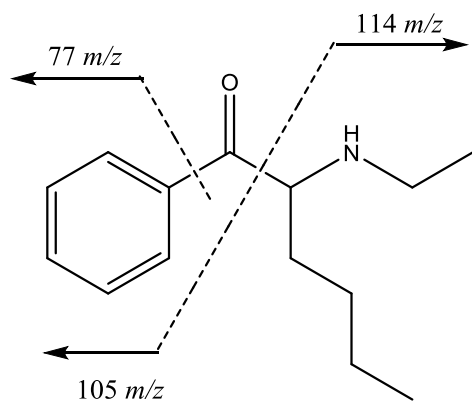
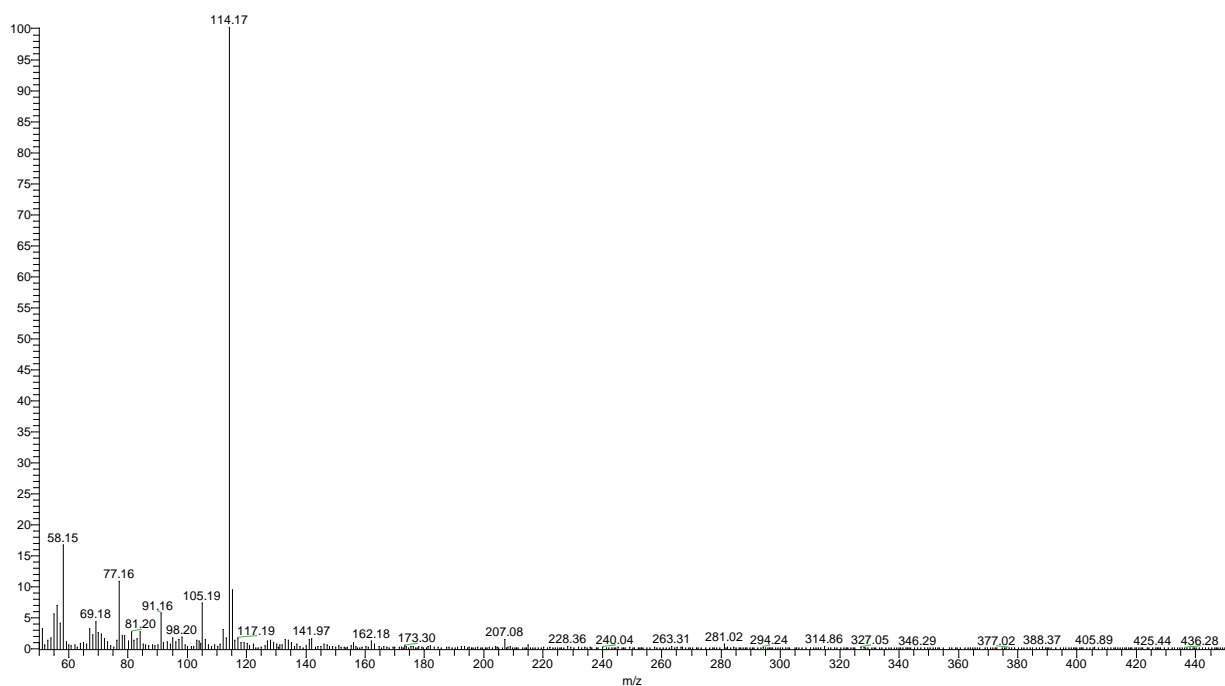
Rys. 36. Widmo EI-MS cząsteczki 4-metylo-*N,N*-dimetyloacetamidu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



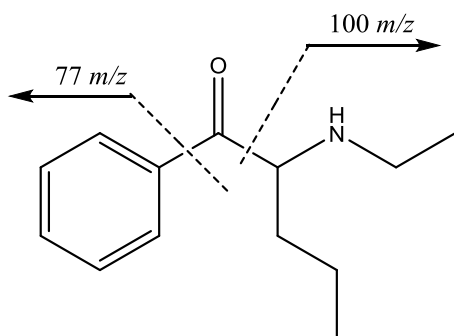
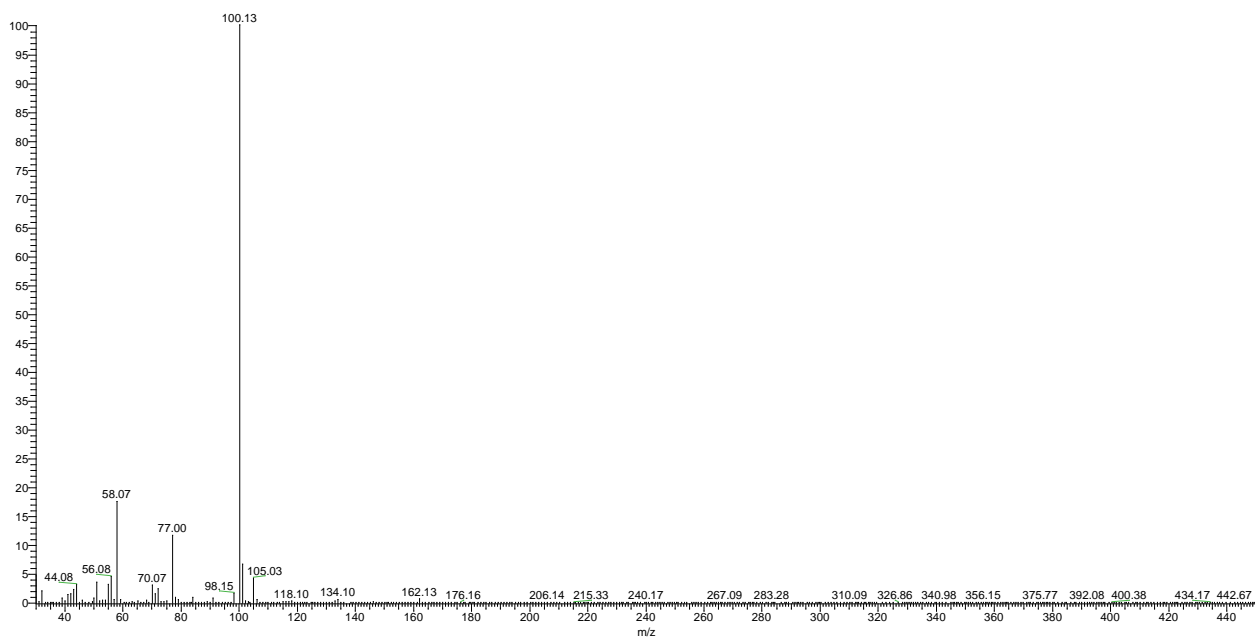
Rys. 37. Widmo EI-MS cząsteczki 3,4-metyleniodioksy- α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



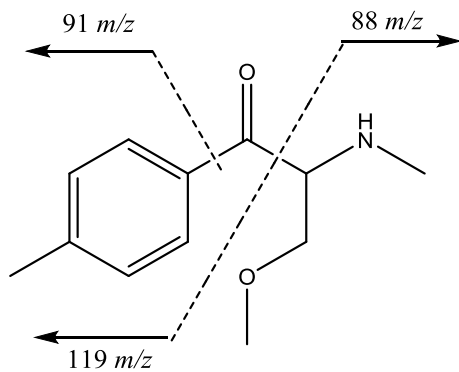
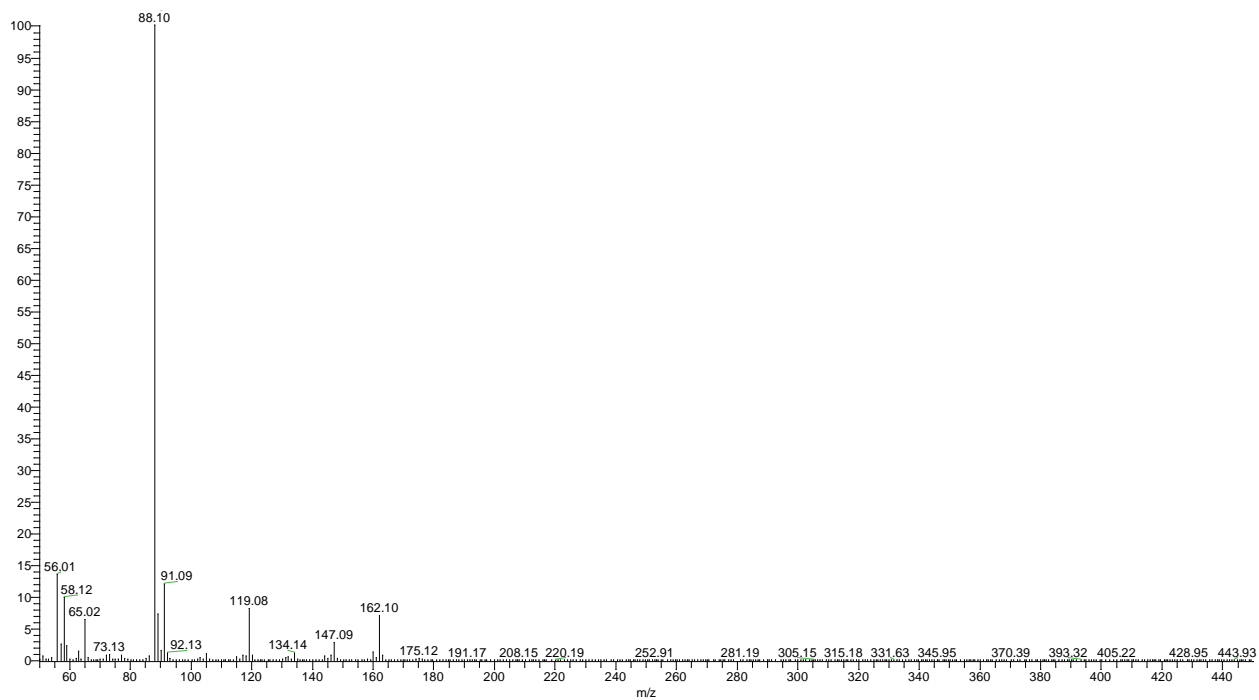
Rys. 38. Widmo EI-MS cząsteczki 4F-PD wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



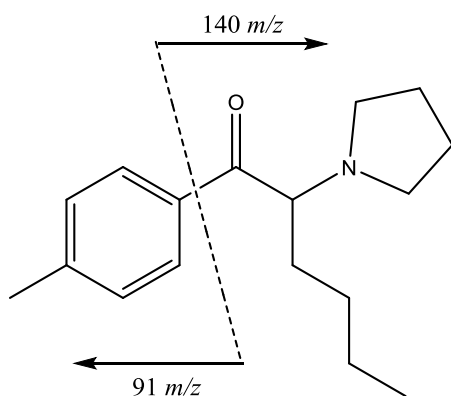
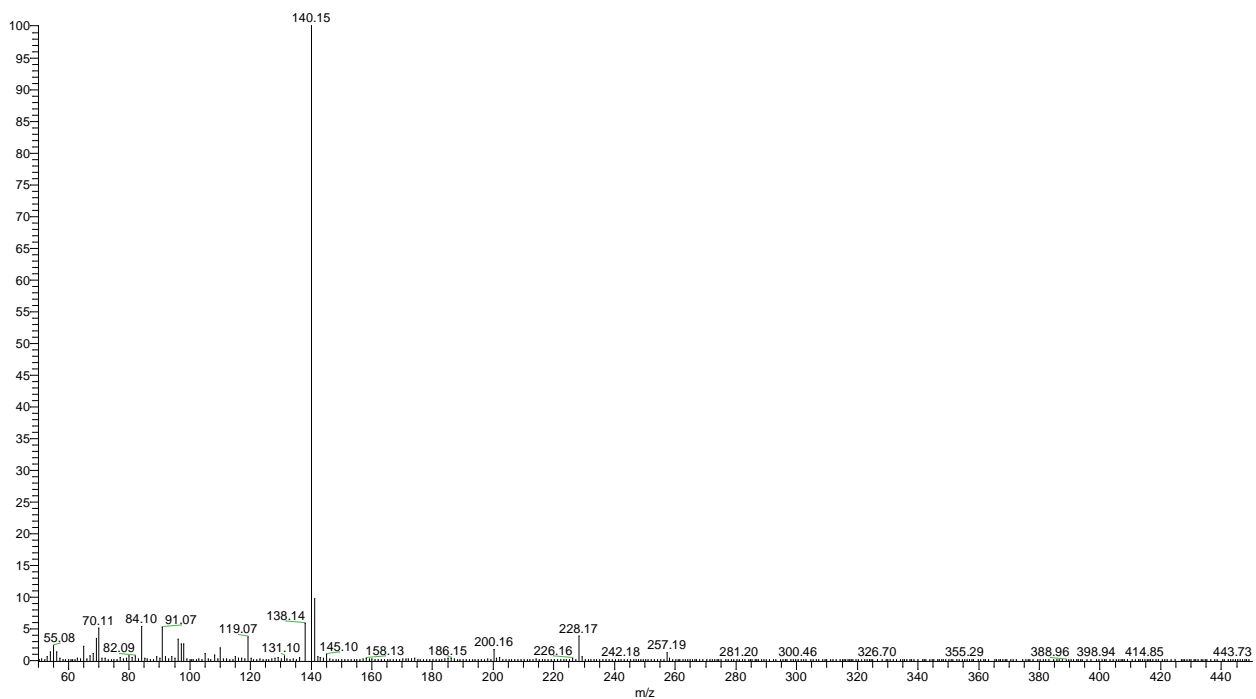
Rys. 39. Widmo EI-MS cząsteczki α -EAHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



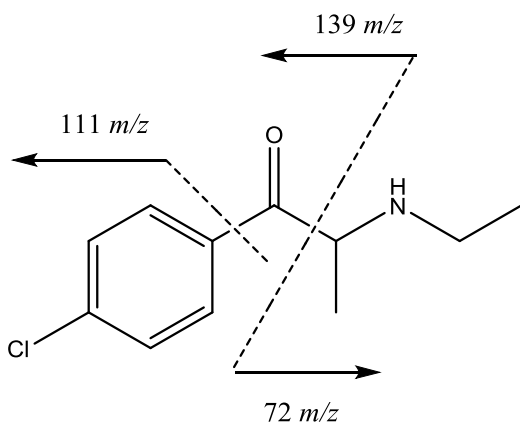
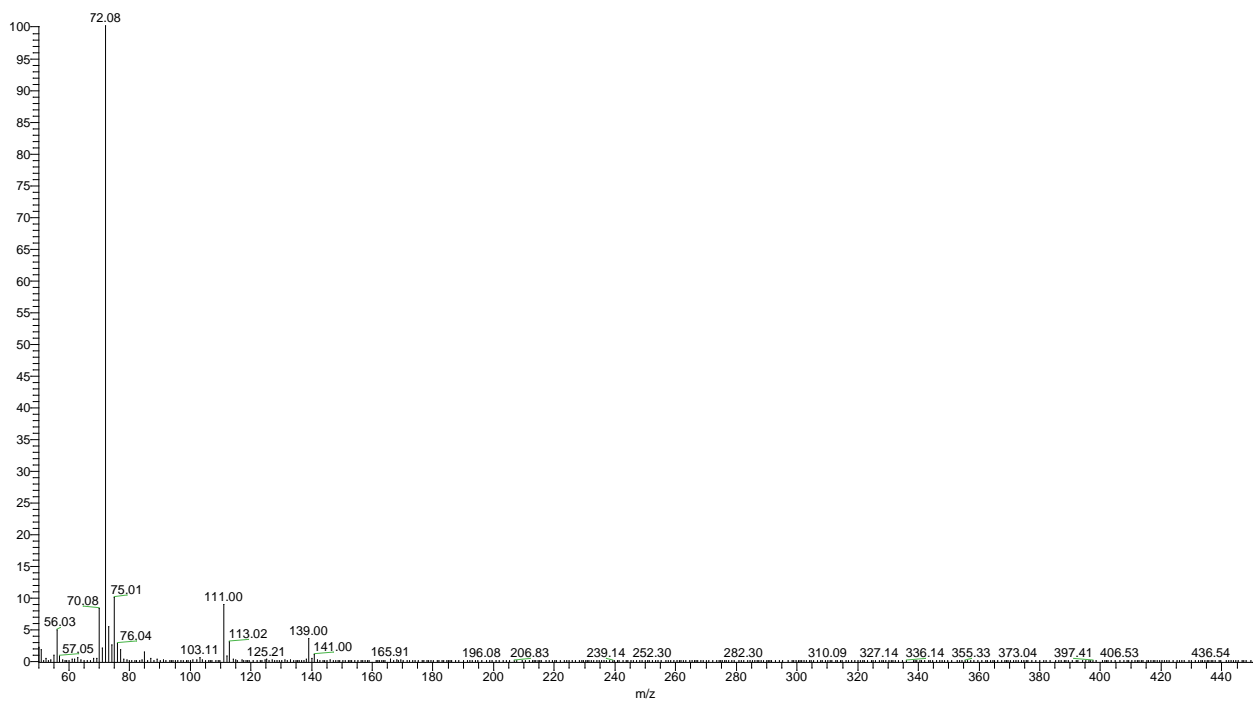
Rys. 40. Widmo EI-MS cząsteczki α -EAPP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



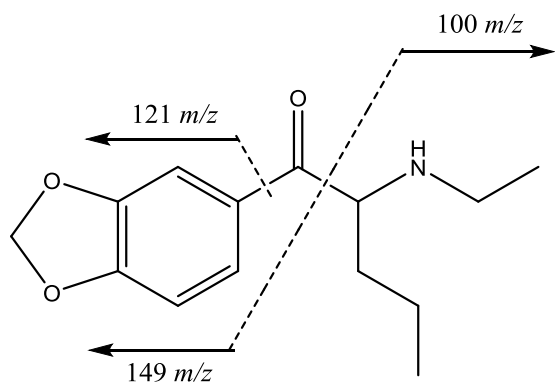
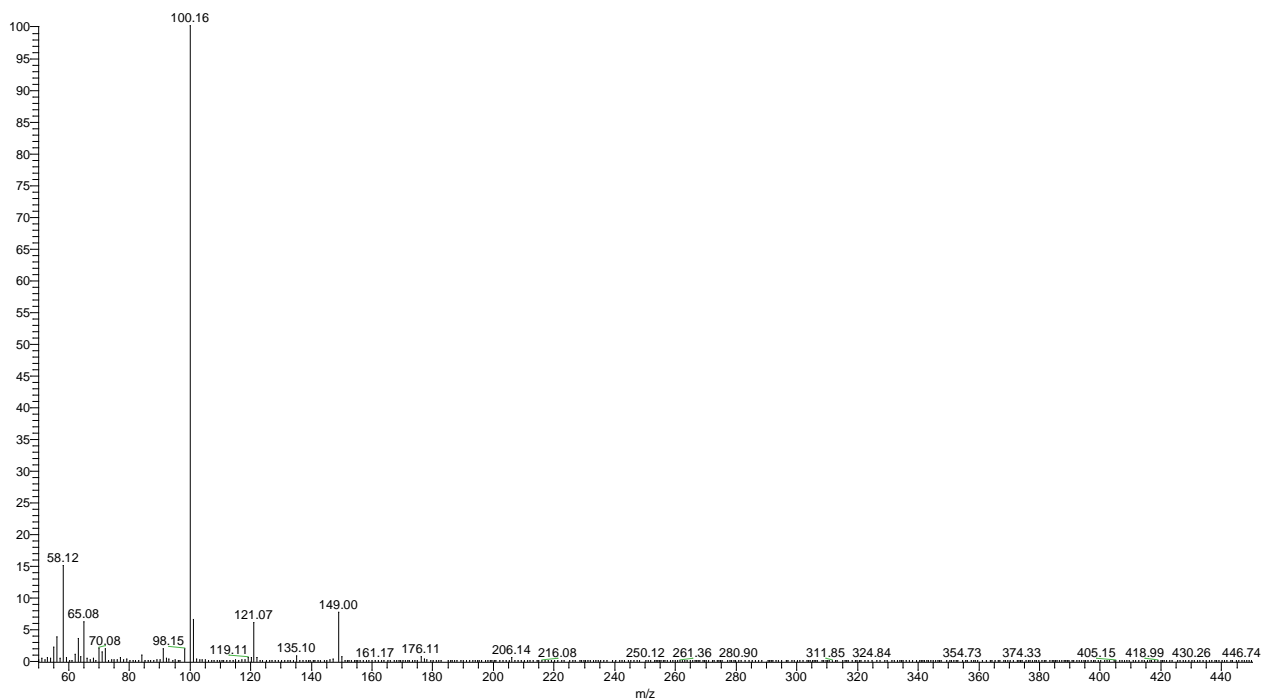
Rys. 41. Widmo EI-MS cząsteczki meksedronu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



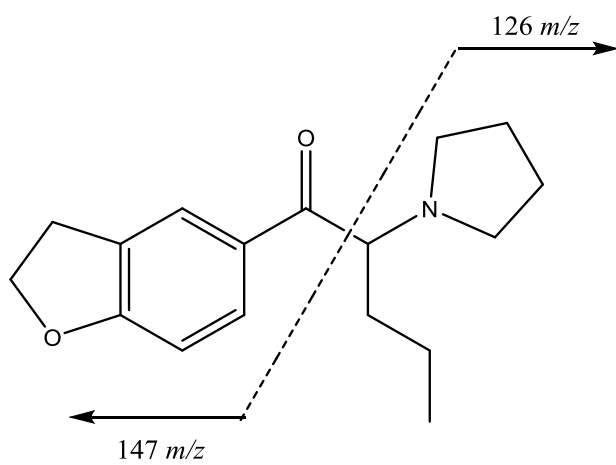
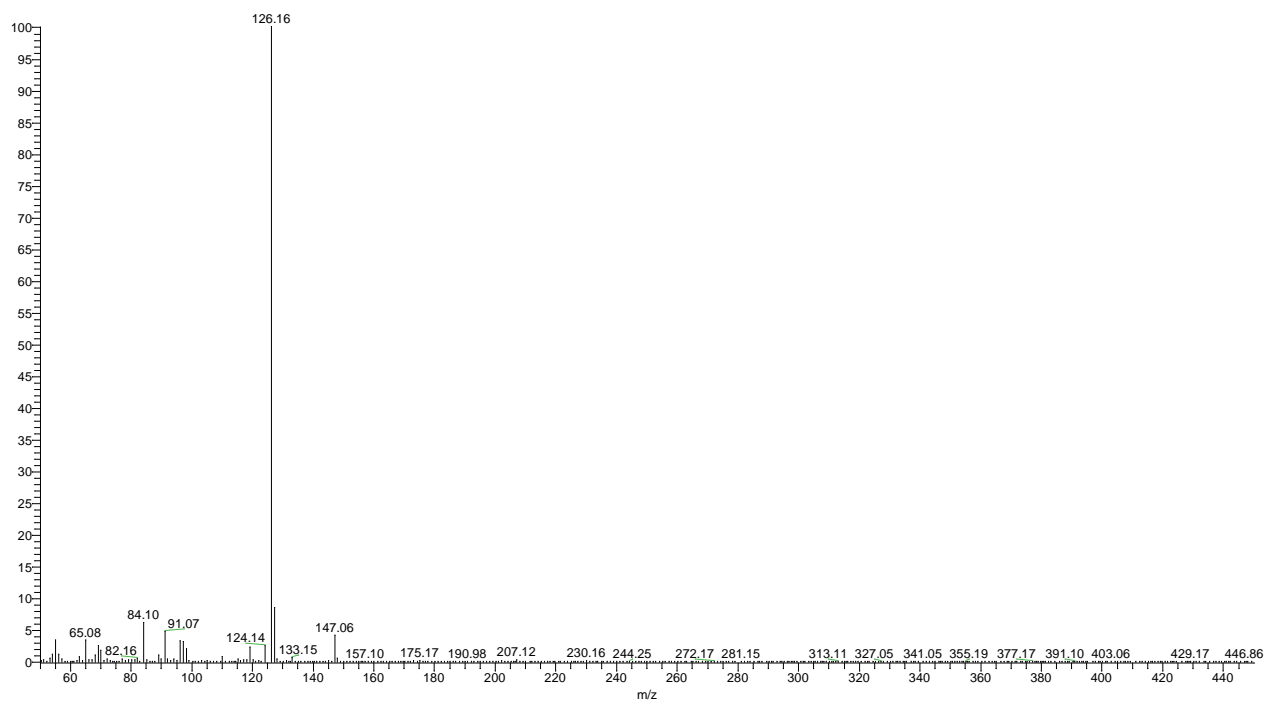
Rys. 42. Widmo EI-MS cząsteczki 4-metyl- α -PHP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



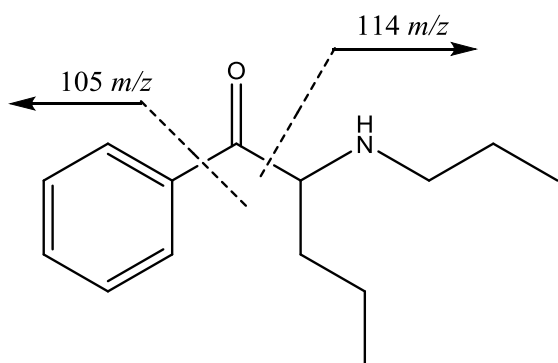
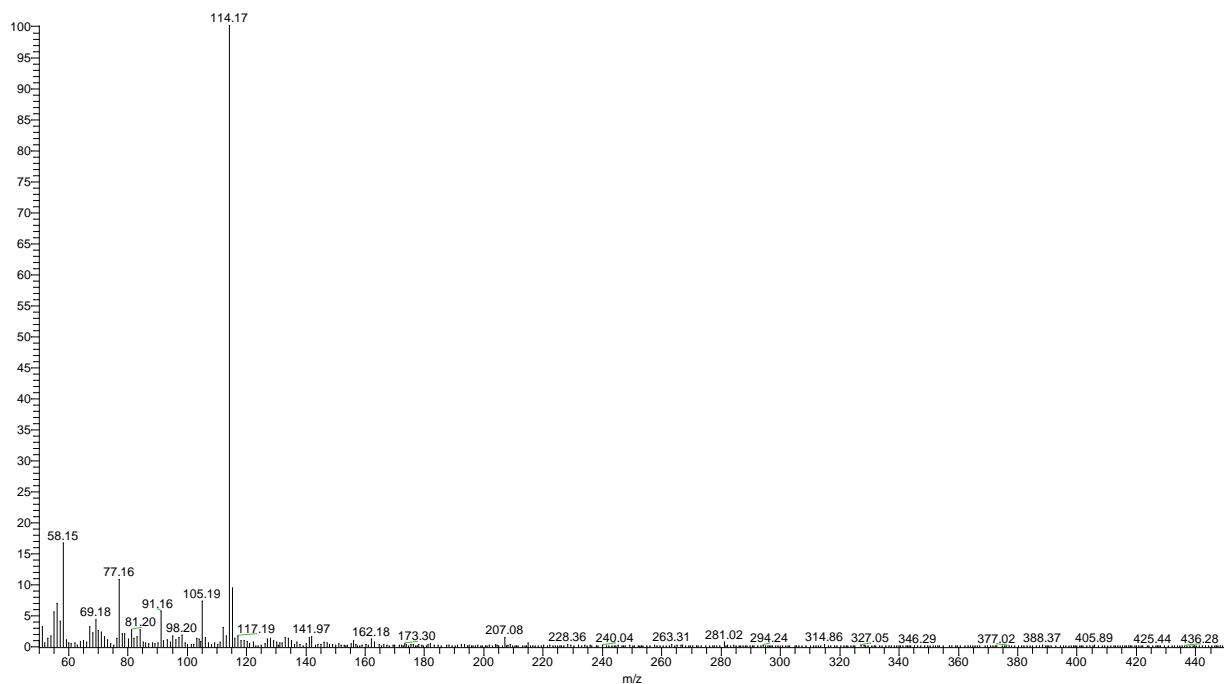
Rys. 43. Widmo EI-MS cząsteczki 4-CEC wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



Rys. 44. Widmo EI-MS cząsteczki *N*-etylopentylonu wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



Rys. 45. Widmo EI-MS cząsteczki 3-desoksy-3,4-MDPV wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury



Rys. 46. Widmo EI-MS cząsteczki α -PAPP wraz z proponowaną fragmentacją jej struktury

4.6 Biblioteka danych analitycznych dotycząca najnowszych pochodnych katynonu

Opierając się na przeprowadzonych analizach chromatograficznych oraz spektroskopowych nowych substancji psychoaktywnych z grupy pochodnych katynonu zabezpieczanych na polskim rynku pseudonarkotykowym przez organy ścigania w latach 2015 – 2018, w połączeniu z danymi dostępnymi w literaturze światowej, zebranymi w ciągu ostatnich 4 lat, utworzyłam bibliotekę danych analitycznych dla technik chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie jonizacji ESI oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie jonizacji EI dla 43 najnowszych związków z tej grupy. Przedstawiona w Tabeli nr 8 biblioteka wykorzystywana może być w toku analiz toksykologicznych przez laboratoria sądowe oraz kryminalistyczne.

Tabela nr 8 Biblioteka danych analitycznych dotyczących najnowszych pochodnych katynonu - nazwy zwyczajowe, masy cząsteczkowe, jony prekursorowe i jony fragmentacyjne dla jonizacji typu ESI-MS oraz jony podstawowe i pozostałe dla jonizacji typu EI-MS

Nazwa zwyczajowa	Masa cząsteczkowa [Da]	Jon prekursorowy oraz jony fragmentacyjne [M+H ⁺] uzyskane techniką LC-ESI-MS ⁿ [m/z]	Jon podstawowy oraz pozostałe uzyskane techniką GC-EI-MS [m/z]
4-metylo- <i>N,N</i> -dimetylometkatynon, 4-MDMC	191,16	174 , 147, 119, 159, 129	72 , 119, 91, 70
4-chlorometkatynon, 4-CMC	198,15	198 , 180, 167, 145, 139	58 , 75, 111, 139
Heksedron, HEX	205,15	206 , 188, 132, 175, 100, 105, 119, 91	100 , 77, 69, 44, 58
4-F-Pentedron	209,20	210 , 192, 179, 150, 109	86 , 95, 123, 75, 109, 57

4-Cl-Pentedron	225.10	226 , 144, 208, 125, 166, 164, 178, 173, 131, 138	86 , 44
4-Metylo-pentedron, 4-MPD	205.15	206 , 188, 158, 146, 145, 144, 131, 130	86
α -EAPP	205.30	206 , 188, 161, 146, 160, 118, 91	100 , 77, 105, 58
Meksedron	207.20	208 , 190, 176, 158, 149, 148	88 , 119, 91, 162, 56, 65
4-chloroetkatynon, 4-CEC	211.15	212 , 194, 159, 166, 144, 131	72 , 111, 75, 70, 56
<i>N</i> -Etyloheksedron	219.17	220 , 130, 202, 146, 91, 158, 175	114 , 105, 58
α -EAHP	219.25	220 , 202, 175, 146, 174, 146	114 , 105, 91, 77, 58
α -PVT	237.01	238 , 167, 126, 139, 97	126 , 111, 97, 84, 55
4-Cl-EAPP	239.12	240 , 158, 164, 125, 180, 138, 187, 145, 195, 192	100 , 58
4-Bromoetkatynon, 4-BEC	255.03	256/258 , 159, 144, 132	72 , 44, 185, 155
<i>N</i> -Etyl-4 metylpentedron, 4-MEAP	219.32	220	100 , 91
α -PAPP	219.15	220 , 202, 175, 160	114 , 105, 91, 77, 58
<i>N</i> -Etylopentylon	249.08	250 , 232, 205, 202, 190, 175, 135	100 , 121, 149, 58
bk-EPDP	249.14	250 , 232, 202, 205, 189, 174, 172, 160, 149, 135	149 , 121
Propylon	235.13	236 , 188, 146, 218, 175,	86 , 149, 135, 121, 44

		160, 118	
6-MeO-bk-MDMA	237.11	238 , 190, 175, 58	58 , 204, 179
α -PHP	245.36	246 , 228, 175	140 , 141, 105, 96, 77
α -PiHP	245.19	246 , 140, 91, 119	140 , 188, 98, 84
α -PHPP, PV8	259.39	260	154 , 105, 77
α -POP, PV9	273.41	274	168 , 105, 77
4-F- α -PVP	249.32	250	126 , 95
4-metylo- α -PHP	259.20	260 , 189, 105, 133	140 , 119, 91, 84, 70
4-F- α -PHP	263.18	264 , 140, 123, 109, 190, 137	140 , 123, 96, 84, 69
4-F- α -PHPP	277.38	278	154 , 123, 95
4-F- α -PV9, 4-F- α -POP	291.40	292 , 274, 221, 203, 189	168 , 169, 123, 110, 95, 84, 55
4-Cl- α -PPP	237.10	238 , 167, 185, 139, 98	98 , 56, 111, 69
4-Cl- α -PHP	279.15	280 , 125, 140, 138, 209	140 , 111, 84
4-Br- α -PVP	309.08	310/312 , 160, 126, 168, 131, 183	126 , 183, 155, 84
4-Metoksy- α -PVP	261.36	262	126 , 135, 107
4-Cl- α -PVP	265.42	266 , 195, 125, 153, 248	126 , 111, 84, 139
3-desoxy-3,4-MDPV	273.15	274 , 203, 126, 175, 133, 98	126 , 91, 84, 65, 147
4-Metoksy- α -PHPP	289.41	290	154 , 135
3,4-metylenodioksy- α -PHP	289.40	290 , 219, 189, 135, 161, 147, 133	140 , 149, 121, 84, 96, 69
4-Metoksy- α -POP	303.44	304	168 , 135
3,4-Dimetoksy- α -PVP	291.39	292	126 , 137, 165

Tiotinon	169.24	170	58, 83, 111
α -PBT	223.33	224	
5-Br- α -PBT	302.23	302/304	112
4-Br- α -PBT			
3-Br- α -PBT			
5-Br- α -PVT	316.26	316/318	126, 189, 191
4-Br- α -PVT			
3-Br- α -PVT			
4,5-Br- α -PVT	395.15	393/395	126, 267, 269, 271

5. Identyfikacja nowej substancji psychoaktywnej z grupy pochodnych katynonu – α -propyloaminopentiofenonu w materiale rzeczowym oraz analiza jakościowa i ilościowa w pośmiertnym materiale biologicznym

5.1 Wstęp

Syntetyczne pochodne katynonu, obok syntetycznych kannabinoidów są obecnie najpopularniejszymi związkami wśród nowych substancji psychoaktywnych (NPS). Corocznie, w literaturze opisywanych jest kilkanaście nowych substancji z tej grupy, pojawiających się na pseudonarkotykowym rynku całego świata. Wraz z liczebnością nowych „katynonów” oraz chęcią wzbogacania doświadczeń wynikających z ich zażywania wśród konsumentów, rośnie liczba przypadków zatruc, w tym śmiertelnych. Powodem przedawkowania jest brak świadomości biorcy o składzie zażywanego produktu, a w szczególności o stężeniu substancji psychoaktywnej w nim zawartej, równoczesne przyjmowanie kilku różnych produktów lub celowe zażycie dużej, większej niż zwykle porcji.

5.2 Materiał do badań

W niniejszej części pracy przedstawiona zostanie analiza toksykologiczna pośmiertnego materiału biologicznego w postaci płynów ustrojowych tj. krwi i płynu z gałki ocznej oraz wycinków narządów wewnętrznych tj. nerki, wątroby i mózgu pobranych w czasie sekcji zwłok młodej kobiety, u której doszło do zatrucia śmiertelnego nową substancją psychoaktywną. Przy denatce zabezpieczono foliowy woreczek z zawartością białego proszku. Materiał ten potraktowany zostały podczas prowadzonej analizy toksykologicznej jako materiał porównawczy.

5.3 Przygotowanie prób materiałów rzeczowych do analizy

Celem przygotowania próby materiału rzeczowego w postaci proszku do analizy technikami chromatografii cieczowej oraz gazowej sprzężonych ze spektrometrią mas, przeprowadzono opracowaną na potrzeby niniejszej pracy procedurę ekstrakcji opisaną w podrozdziale 2.1.

5.4 Przygotowanie prób materiałów biologicznych do analizy

Wstępne badania przesiewowe materiału biologicznego w postaci krwi przeprowadzono techniką immunoenzymatyczną ELISA w kierunku obecności substancji z grupy syntetycznych katynonów z przeciwciałami ukierunkowanymi na metkatynon, amfetaminę, trójcykliczne antydepresanty, delta-9-tetrahydrokannabinol (delta-9-THC) oraz benzodiazepiny. Materiał przygotowywany był do przeprowadzenia powyższej analizy przesiewowej poprzez rozcieńczenie 50 µl próby krwi w 200 µl EIA buforu, znajdującego się w pakiecie odczynników do testu ELISA.

Do analizy HPLC-MS substancje aktywne izolowano z materiału biologicznego techniką ekstrakcji typu ciecz – ciecz. W tym celu do 2 ml krwi oraz 2 ml płynu z gałki ocznej dodano po 2 ml roztworu amoniaku o pH = 12 oraz po 4 ml acetonitrylu celem odbiałczenia i poddano działaniu ultradźwięków przez 60 minut. Następnie do zawartości każdej próbki dodano 10 ml octanu etylu, wytrząsano przez 2 h, a następnie mieszaninę odwirowano, zebrano warstwę supernatantu i odparowywano ją w temperaturze pokojowej w strumieniu azotu do sucha, a pozostałości przenoszono do 1 ml metanolu. Tak przygotowane próby przenoszono do szklanych insertów umieszczonych w fiolkach i poddawano analizie.

W przypadku wycinków narządów wewnętrznych jak wątroba, nerka oraz mózg, pobierano po 5 gramów każdego z nich, rozdrabniano i homogenizowano, a następnie ekstrahowano w sposób opisany powyżej używając następujących objętości odczynników: 10 ml roztworu amoniaku o pH=12, 10 ml acetonitrylu, 20 ml octanu etylu, 2 ml metanolu.

5.5 Metodyka analizy technikami instrumentalnymi

5.5.1 Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

Do analizy jakościowej i ilościowej techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystano chromatograf cieczowy UHPLC Dionex sprzężony ze spektrometrem masowym TSQ Endura Thermo Scientific. Zastosowano kolumnę RP-MS Accucore, 100x2,1mm (Thermo Scientific). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina odczynnika A (0,02 M wodny roztwór kwasu mrówkowego i 0,05 M roztwór wodny mrówczanu amonu) oraz

odczynnika B (10 % roztworu A i 90% acetonitrylu). Analiza była prowadzona w przepływie gradientowym - 0–2 min, 95 % (A) + 5 % (B); 2–30 min, 30 % (A) + 70 % (B); 30–32 min, 30 % (A) + 70 % (B); 32–40 min, stosunek objętościowy powracał do wyjściowego tj. 95 % (A) + 5 % (B). Przepływ fazy ruchomej wynosił 100 μ l/min. Źródłem jonizacji analitów był elektrosprej w trybie jonizacji dodatniej (ESI(+)-MS), zakres monitorowania jonów od 50 m/z do 500 m/z. Temperatura źródła wynosiła 250 °C, gazem nośnym i do jonizacji były odpowiednio azot i argon. Do obsługi chromatografu i spektrometru masowego, a także interpretacji wyników wykorzystano program Xcalibur 4.0.

5.5.2 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Analiza GC-MS prowadzona na chromatografie gazowym Trace 1310 Thermo Scientific z kolumną Rxi[®]-5Sil MS, 15 m, (Restek) sprzężony ze spektrometrem gazowym TSQ Thermo Scientific. Temperatura injektora, 260 °C; temperatura pieca, 100 °C przez 2 min, następnie wzrost o 20 °C/min do 260 °C; hel jako gaz nośny przy przepływie 1,2 ml/min; temperatura źródła MS, 250 °C; objętość nastrzyku 1 μ l. Otrzymane widma masowe w jonizacji typu elektron impakt (EI) porównywane były z biblioteką widm masowych EI CaymanChem Library (2017).

5.5.3 Tandemowa spektrometria mas MSⁿ

Źródłem jonizacji analitów był elektrosprej. Fragmentację ESI-MS² oraz ESI-MS³ jonów prowadzono w trybie dodatnim (ESI(+)-MS) w zakresie monitorowania wartości od m/z 50 – 500. Temperatura źródła wynosiła 250 °C, przepływ analitu 8 μ l/min, energia kolizji w zakresie od 20 – 45%, gaz nośny stanowił azot, gaz jonizujący – hel.

5.5.4 Analiza ilościowa

Metoda wzorca wewnętrznego

W celu ilościowego oznaczenia α -propyloaminopentiofenonu w materiale autopsyjnym zastosowano standardową metodę dodawania. Metoda ta pozwala przezwyciężyć efekty

matrycowe i różnice w szybkościach odzyskiwania [44, 45]. Co więcej, metoda ta nie wymaga żadnych próbek ludzkich, które są negatywne dla docelowego związku. Zbieranie czystych próbek tkanek ludzkich jest problematyczne ze względów etycznych. Z drugiej strony, metoda ta może być stosowana przez podmioty, które nie mają możliwości pozyskania próbki materiału biologicznego w postaci próby ślepej. Celem możliwości wyznaczenia stężenia α -propyloaminopentiofenonu w poszczególnym materiale biologicznym, stworzono krzywą kalibracji w oparciu siedem stężeń równych 20, 50, 100, 200, 500, 1000 i 5000 ng/mL docelowego związku. Różne stężenia docelowego związku i ustalone stężenia wzorca wewnętrznego (IS) tj. pentedronu (CaymanChem) dodano do każdej porcji tej samej matrycy, jak opisano wcześniej. Stężenie, w którym prosta krzywej kalibracji przecinała się z poziomą osią x stężenia docelowego związku, wykazało istniejące stężenie docelowego związku w matrycy.

Efekty matrycy i wskaźnik odzysku

W pierwszej kolejności, w celu określenia efektów matrycy i stopnia odzysku we wszystkich analizowanych płynach i tkankach, stężenie docelowego związku w każdej matrycy mierzono standardową metodą dodawania wzorca. Następnie, przygotowałam metanолоwый roztwór certyfikowanego wzorca α -propyloaminopentiofenonu w stężeniu, jakiego można było oczekiwać w ostatecznie rekonstruowanym roztworze metanolu, zakładając, że odzysk ekstrakcji docelowego związku wynosił 100% dla każdej matrycy. Każda matryca została przygotowana według opisanej w podrozdziale 4.3 procedury z dodaniem wzorca wewnętrznego w pierwszym etapie. W ostatnim zaś, 1 ml (dla płynu ustrojowego) i 2 ml (dla tkanek stałych) czystego metanolu dodano i zmieszano w celu rozтворzenia pozostałości ekstraktu próbki po odparowaniu. Ponadto 1 ml lub 2 ml powyższych roztworów metanolu zawierających końcowe stężenie 100% odzysku α -propyloaminopentiofenonu dodano do innej pozostałości ekstraktu próbki i zmieszano. Wobec powyższego, ostatecznie otrzymano trzy rodzaje gotowych do nastrzyku roztworów metanolu. Pierwszy, uzyskany z próbki po rekonstrukcji czystym metanolem oznaczono jako B (za pomocą powierzchni piku); ten otrzymany po rekonstrukcji metanolem zawierającym 100% odzysku stężenia związku docelowego dla tej samej próbki oznaczono jako A (za pomocą powierzchni piku); roztwór metanolu bez rekonstruowanej próbki, ale o powyższym docelowym stężeniu związku, opisano jako C. Efekt matrycy i odzysk obliczono według

następujących wzorów: Efekt matrycy (%) = [(A-B) / C] x 100, Wskaźnik odzysku (%) = [B / (A-B)] x 100.

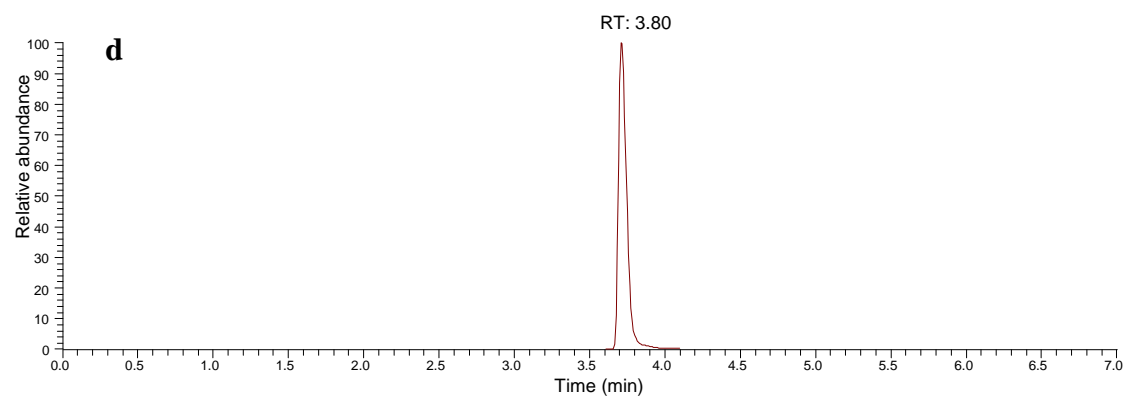
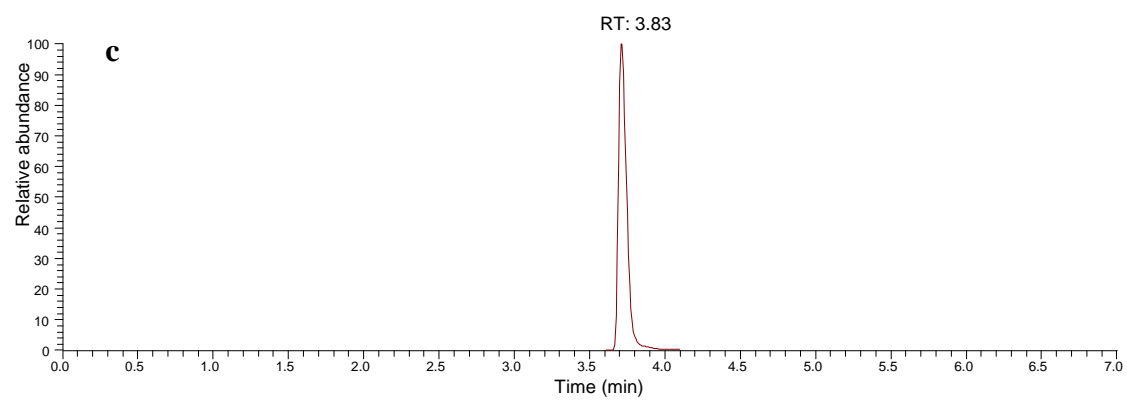
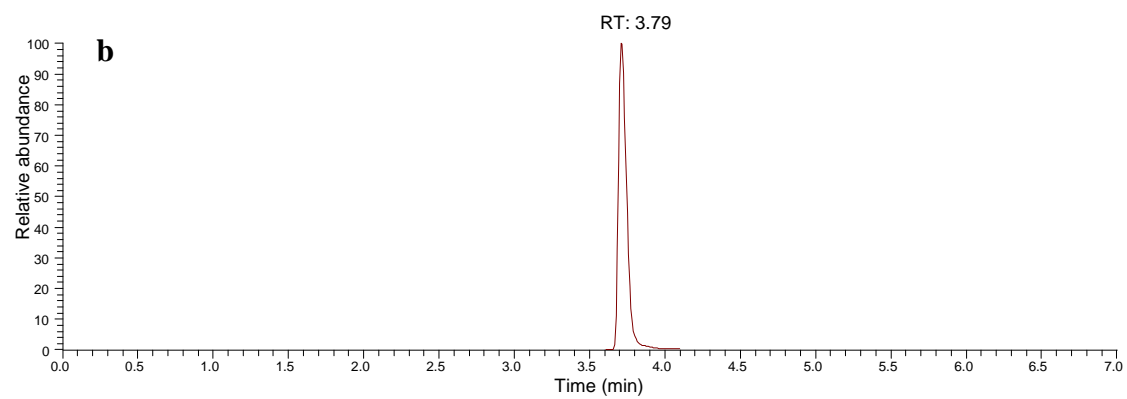
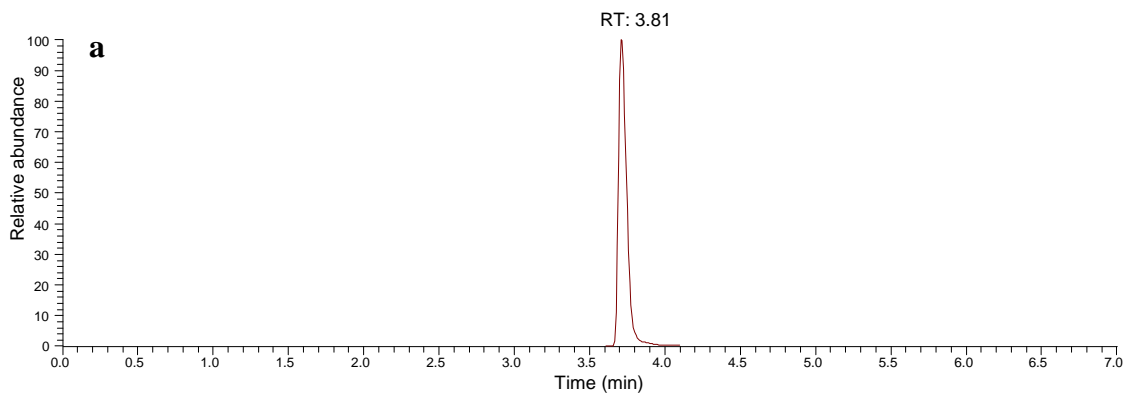
5.6 Wyniki analizy

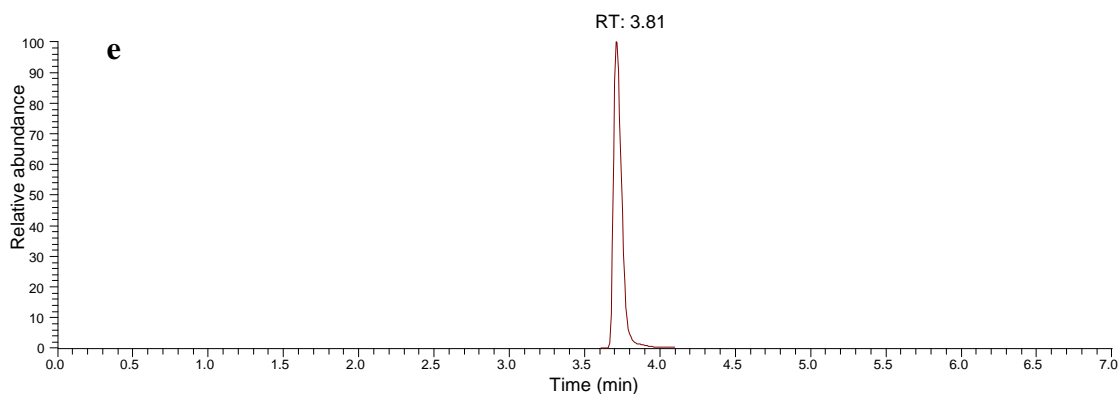
5.6.1 Test immunoenzymatyczny ELISA

W wyniku przeprowadzonej analizy przesiewowej materiału biologicznego w postaci krwi techniką immunoenzymatyczną ELISA uzyskano wynik dodatni w teście na obecność syntetycznych katynonów. Ze względu na brak testów z przeciwciałami dla takich próbek jak płyn z gałki ocznej, wątroba, nerka i mózg, dla powyższych materiałów nie przeprowadzono analizy przesiewowej tą techniką.

5.6.2 Wysokosprawną chromatografią cieczą sprężoną ze spektrometrią mas (HPLC-MS)

W wyniku przeprowadzonej analizy w trybie SRM (single reaction monitoring) zarówno materiału porównawczego w postaci proszku, wzorca α -propylaminopentiofenonu, jak i materiałów biologicznych otrzymano chromatogramy z sygnałem przy czasie retencji pomiędzy 3,79 – 3,83 minuty (Rys. 47a – 47e) i odpowiadający mu na spektrum masowym jon pochodzący od protonowanej cząsteczki o wartości m/z równej 220,17 [M + H⁺], a także jony potomne 202,11 m/z , 175, 11 m/z i 160,11 m/z (Rys. 48a – 48e). Zarówno na chromatogramach, jak i widmach masowych obecne były piki i jony pochodzące tylko od docelowego związku, nie obserwowano w żadnym przypadku dodatkowych sygnałów.

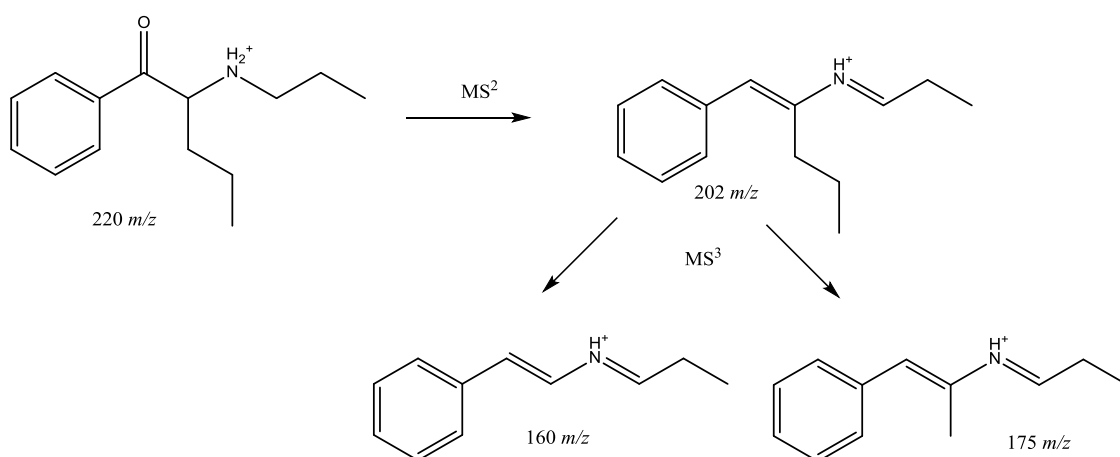




Rys. 47. Chromatogramy otrzymane w wyniku analizy techniką HPLC-MS krwi (a), płynu z gałki ocznej (b), nerki (c), wątroby (d) i mózgu (e)

5.6.3 Tandemowa spektrometria mas (MS^n)

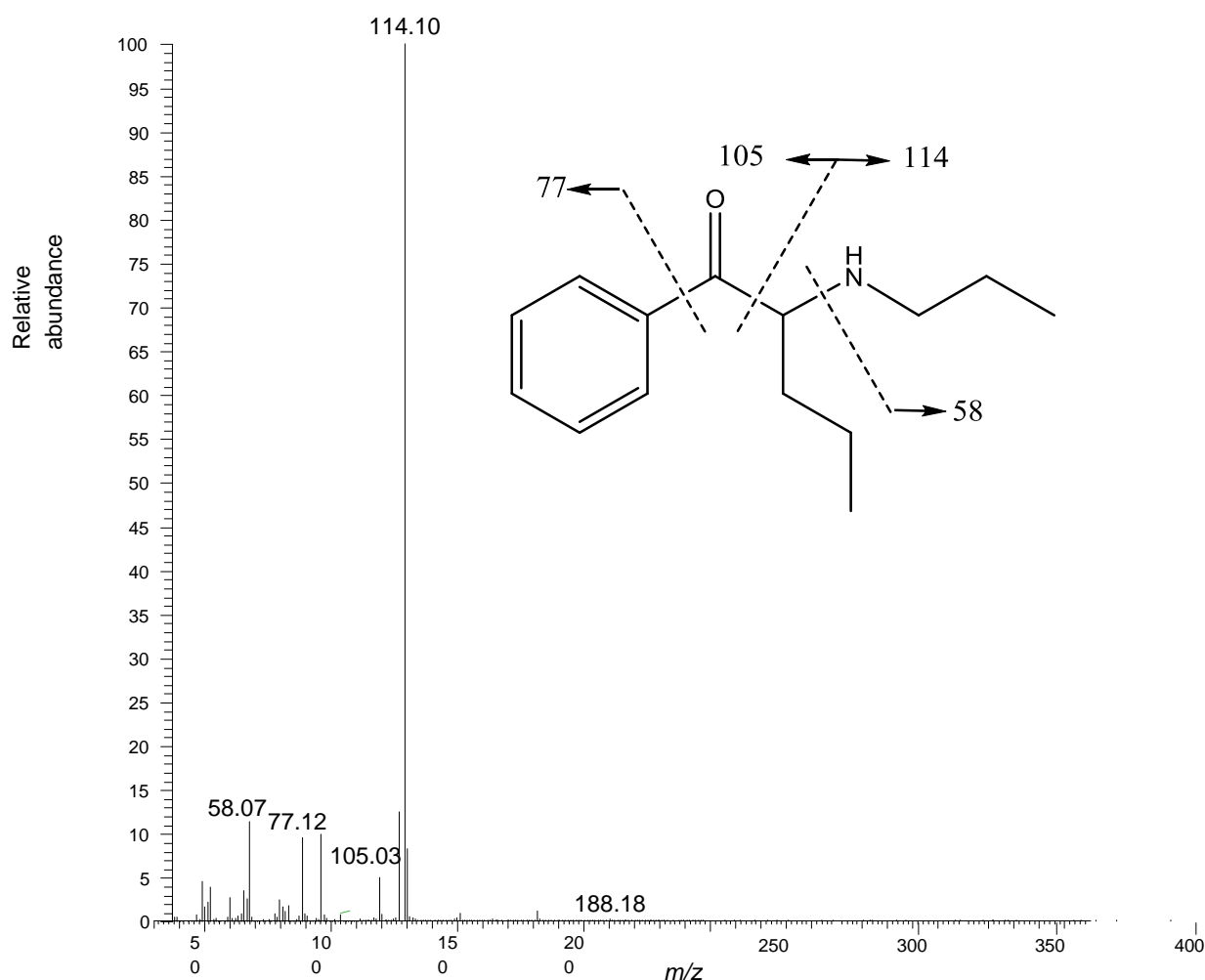
Uzyskany na widmie masowym próby materiału porównawczego w postaci proszku jon pseudomolekularny o wartości $220,17 m/z$ [$M^+ + H^+$], został poddany fragmentacji MS/MS oraz MS/MS/MS w trybie jonizacji dodatniej (ESI+). Widmo masowe MS^2 jonu o wartości $220,17 m/z$ przedstawia jon fragmentacyjny o wartości $202,11 m/z$, który sugerował eliminację cząsteczki wody [$M^+ + H^+ - H_2O$]. Przejście to, jest dobrze poznanym, charakterystycznym dla związków z grupy pochodnych katynonu, co sugeruje obecność w analizowanej próbce takiej substancji. Kolejne jony fragmentacyjne o wartościach $175,11 m/z$ oraz $160,11 m/z$ odpowiadały fragmentom struktury α -propyloaminopentiofenonu.



Rys. 49. Proponowana fragmentacja ESI- MS^n struktury α -propyloaminopentiofenonu

5.6.4 Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)

Otrzymane widmo masowe EI-MS po analizie techniką GC-MS porównano z biblioteką widm CaymanChem Library, co potwierdziło obecność w analizowanej próbce proszku nowej pochodnej katynonu - α -propyloaminopentiofenonu. Dodatkowo, widmo wzorcowej substancji było identyczne z widmem analizowanej próby proszku. Na obu widmach zarówno pik o wartości m/z 114,11 występuje jako pik podstawowy, jak i piki o wartościach m/z 105,03, 77,12 i 58,07 jako jony fragmentacyjne (Rys. 50).



Rys. 50. Widmo masowe EI-MS α -propyloaminopentiofenonu wraz z proponowaną ścieżką fragmentacyjną struktury

5.6.5 Analiza ilościowa materiału biologicznego

Równania krzywych kalibracji wyznaczone metodą dodawania wzorca wewnętrznego i ich współczynniki korelacji (r) dla płynów ustrojowych i tkanek stałych przedstawiono w Tabeli nr 9. Wyznaczono granicę wykrywalności [LOD, stosunek sygnału do szumu (S/N) = 3] i granicę oznaczalności [LOQ, stosunek S/N = 10]. Wartości LOQ i LOD wynosiły 9,0 i 27,2 ng/ml dla płynów ustrojowych i odpowiednio 15,0 i 46,0 ng/g dla tkanek stałych. Z uwagi na to, że w badaniach nie dysponowałam próbkami tkanek ludzkich nie zawierającymi substancji psychoaktywnych, nie było możliwe przedstawienie zwykłej dokładności i precyzji, jednakże dokonałam oceny powtarzalności śróddziennej i powtarzalności codziennej dla każdej matrycy. Powtarzalność śróddzienna i codzienna wyniosła 6,4 - 22%, za wyjątkiem pomiaru mózgu w ciągu dnia (względne odchylenie standardowe = 40%). W Tabeli nr 10 przedstawiono również oznaczone stężenia pochodnej katynonu we wszystkich analizowanych materiałach biologicznych. Wśród pięciu badanych próbek zaobserwowano najwyższe stężenie α -propyloaminopentiofenonu w wątrobie (5,9 - 6,0 $\mu\text{g/g}$), podczas gdy najniższe stwierdzono w mózgu (2,1 - 2,3 $\mu\text{g/g}$). Wyniki przedstawiono w Tabeli nr 11. Dokonałam również oceny efektów matrycowych i wskaźnika odzysku dla każdego rodzaju materiału biologicznego, a wyniki przedstawiłam w Tabeli 11. Największy wpływ matrycy zaobserwowano w próbce mózgu, natomiast najwyższy odzysk stwierdzono w próbkach wątroby, chociaż wszystkie dane mieściły się w dopuszczalnym zakresie.

Tabela nr 9 Równanie krzywej kalibracji oraz współczynniki korelacji dla α -propyloaminopentiofenonu w pośmiertnym materiale biologicznym

Rodzaj materiału biologicznego	Równanie krzywej	Współczynnik korelacji (r)
Krew	$y = 0.3264 x + 0.0223$	0.998
Płyn z gałki ocznej	$y = 0.0997 x + 0.2684$	0.996
Wątroba	$y = 0.1147 x + 0.0954$	0.997
Nerka	$y = 0.2244 x + 0.1090$	0.995
Mózg	$y = 0.8992 x + 0.2151$	0.995

Tabela nr 10 Wyznaczona śróddzienna i codzienna powtarzalność dla oznaczenia ilościowego α -propyloaminopentiofenonu w poszczególnych próbkach materiału biologicznego

Rodzaj próbki	Powtarzalność śróddzienna ($n = 5$)		Powtarzalność codzienna ($n = 5$)	
	Stężenie ^a ($\mu\text{g/mL}$ lub g)	Powtarzalność (% RSD)	Powtarzalność ^a ($\mu\text{g/mL}$ lub g)	Powtarzalność (% RSD)
Krew	3.2 \pm 0.68	21	3.1 \pm 0.23	7.4
Płyn z gałki ocznej	4.4 \pm 0.52	12	4.2 \pm 0.90	21
Wątroba	5.9 \pm 0.38	6.4	6.0 \pm 0.66	11
Nerka	5.4 \pm 0.92	17	5.4 \pm 1.20	22
Mózg	2.3 \pm 0.50	22	2.1 \pm 0.85	40

RSD relative standard deviation – względne odchylenie standardowe

^a \pm standard deviation (SD) – odchylenie standardowe

Tabela nr 11 Efekty matrycowe oraz wskaźniki odzysku dla oznaczenia stężenia α -propyloaminopentiofenonu w poszczególnych próbkach materiału biologicznego

Rodzaj materiału biologicznego	Efekty matrycowe \pm SD (%) ($n = 3$)	Odzysk \pm SD (%) ($n = 3$)
Krew	74.1 \pm 4.6	75.5 \pm 5.0
Płyn z gałki ocznej	70.3 \pm 5.8	71.3 \pm 3.6
Wątroba	84.8 \pm 3.2	82.6 \pm 3.2
Nerka	80.3 \pm 4.7	72.8 \pm 1.6
Mózg	68.8 \pm 6.4	64.3 \pm 3.4

VI. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej zrealizowano następujące cele:

- Opracowano efektywną procedurę ekstrakcji typu ciecz – ciecz związków z grupy syntetycznych pochodnych katynonu z matrycy proszkowej.
- Po raz pierwszy zidentyfikowano, scharakteryzowano i opisano w literaturze właściwości fizykochemiczne dwóch, nowych na rynku pseudonarkotykowym substancji psychoaktywnych z grupy pochodnych katynonu tj.
 - ✓ α -PHP (1-fenyl-2-(1-pirolidyno)-1-heksanon) oraz
 - ✓ 4f-PV9 (1-(4-fluorofenyl)-2-(pyrolidyn-1-yl)oktan-1-on) .

W prowadzonych badaniach wykorzystano techniki HPLC-MS, HPLC-DAD, GC-MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MSⁿ, TGA i DSC. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w czasopiśmie toksykologicznym *Forensic Toxicology* (MNiSW 35, IF 3,74) w artykule pt. „*Identification and characterization of new designer drug 4-fluoro-PV9 and α -PHP in the seized materials*”.

- Zidentyfikowano i scharakteryzowano w materiale rzeczowym nową substancję psychoaktywną z grupy pochodnych katynonu – α -propyloaminopentiofenon oraz oznaczono ją ilościowo w pośmiertnym materiale biologicznym w przypadku zatrucia śmiertelnego z wykorzystaniem między innymi techniki HPLC-MS. Oznaczone stężenia, przekraczały znacznie opisywane w literaturze światowej stężenia toksyczne, oznaczane w przypadkach zatruc śmiertelnych pochodnymi katynonu. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w czasopiśmie toksykologicznym *Forensic Toxicology* (MNiSW 35, IF 3,74) w artykule pt. *Fatal case of poisoning with a new cathinone derivative – α -propylaminopentiophenone (N-PP)*, jako pierwszy opisany w literaturze przypadek zgonu wynikającego z przedawkowania tego związku.
- Utworzono bibliotekę danych spektroskopowych i widm masowych dotyczącą 43 najnowszych pochodnych katynonu dostępnych na światowym rynku pseudonarkotykowym, która wykorzystana może być w analizie toksykologicznej w laboratoriach sądowych i kryminalistycznych.

VIII. Bibliografia

- [1] Katz, D.P., Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Deruiter, J., Clark, C.R., Suppiramaniam, V., and M. Dhanasekaran. 2014. Synthetic cathinones: “A khat and mouse game”. *Toxicol. Lett.* 229:349–356.
- [2] Valente, M.J., Guedes de Pinho, P., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., and M. Carvalho. 2014. Khat and synthetic cathinones: a review. *Arch. Toxicol.* 88:15–45.
- [3] Favretto, D., Pascali, J., and F. Tagliaro. 2013. New challenges and innovation in forensic toxicology: focus on the “New Psychoactive Substances”. *J. Chromatogr. A.* 1287:84–95.
- [4] Weaver, M.F., Hopper, J.A., and E.W. Gunderson. 2015. Designer drugs 2015: assessment and management. *Addict. Sci. Clin. Pract.* 10:8.
- [5] Vardakou, I., Pistos, C., and C. Spiliopoulou. 2011. Drugs for youth via Internet and the example of mephedrone. *Toxicol. Lett.* 201:191–195.
- [6] Zawilska, J.B., and J. Wojcieszak. 2013. Designer cathinones-an emerging class of novel recreational drugs. *Forensic. Sci. Int.* 231:42–53.
- [7] Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29.07.2005 r. (Dz. U. z2012r. poz.124 oraz z 2015r. poz. 28) wraz z nowelizacją z dnia 24.04.2015 r.
- [8] Rozporządzenie Ministra Zdrowia w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie wykazu nowych substancji psychoaktywnych na podstawie art. 44b ust. 2 ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii (Dz. U. z 2016 r. poz. 224 i 437)
- [9] Brenneisen, R., Fisch, H.U., Koelbing, U., Geisshüsler, S., and P. Kalix. 1990. Amphetamine-like effects in humans of the khat alkaloid cathinone. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30: 825–828.
- [10] Feyissa, A.M., and J.P. Kelly. 2008. A review of the neuropharmacological properties of khat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 32:1147–1166.
- [1] Patel, N.B., 2015. “Natural Amphetamine” Khat: A Cultural Tradition or a Drug of Abuse?. *Int. Rev. Neurobiol.* 120:235–255.
- [12] Valente, M.J., Guedes de Pinho, P., de Lourdes Bastos, M., Carvalho, F., and M. Carvalho. 2014. Khat and synthetic cathinones: a review. *Arch. Toxicol.* 88:15–45.
- [13] Simmler, L.D., Buser, T.A., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L.H., Huwyler, J., Chaboz, S., Hoener, M.C., and M.E. Liechti. 2013. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 168:458–470.

- [14] Baumann MH, Ayestas MA Jr, Partilla JS, Sink JR, Shulgin AT, Daley PF, Brandt SD, Rothman RB, Ruoho RAE, Cozzi NV (2012) The designer methcathinone analogs, mephedrone and methylone, are substrates for monoamine transporters in brain tissue *Neuropsychopharmacology* 37: 1192–1203
- [15] Baumann MH, Partilla JS, Lehner KR, Thorndike EB, Hoffman AF, Holy M, Rothman RB, Goldberg SR, Lupica CR, Sitte HH, Brandt SD, Tella SR, Cozzi NV, Schindler CW (2013) Powerful cocaine-like actions of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV), a principal constituent of psychoactive ‘bath salts’ products. *Neuropsychopharmacology* 38: 552–562
- [16] López-Arnau R, Martínez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J (2012) Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone. *Br J Pharmacol* 167: 407–420
- [17] Martínez-Clemente J, Escubedo E, Pubill D, Camarasa J (2012) Interaction of mephedrone with dopamine and serotonin targets in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol* 22: 231–236
- [18] Meyer MR, Wilhelm J, Peters FT, Maurer HH (2010) Beta-keto amphetamines: studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone, butylone, and methylone in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 397: 1225–1233
- [19] Gibbons S, Zloh M (2010) An analysis of the “legal high” mephedrone. *Bioorg Med Chem* 20: 4135–4139
- [20] Dargan PI, Sedefov R, Gallegos A, Wood DM (2011) The pharmacology and toxicology of the synthetic cathinone mephedrone (4-methylmethcathinone). *Drug Test Anal* 3: 454–463
- [21] Liechti M (2015) Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Med Wkly* 145: w14043. doi:10.4414/smw.2015.14043
- [22] Uralets V, Rana S, Morgan S, Ross W (2014) Testing for designer stimulants: metabolic profiles of 16 synthetic cathinones excreted free in human urine. *J Anal Toxicol* 38: 233–241
- [23] Lusthof KJ, Oosting R, Maes A, Verschraagen M, Dijkhuizen A, Sprong AGA (2011) A case of extreme agitation and death after the use of mephedrone in The Netherlands. *Forensic Sci Int* 206: e93–e95
- [24] Shima N, Kakehashi H, Matsuta S, Kamata H, Nakano S, Sasaki K, Kamata T, Nishioka H, Zaitso K, Sato T, Miki A, Katagi M, Tsuchihashi H (2015) Urinary excretion and metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug 1-phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)octan-1-one (PV9) in humans. *Forensic Toxicol* 33: 279–294
- [25] Debruyne, D., Loilier, M., Cesbron, A., Le Boisselier, R., and J. Bourguine. 2014.

Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones. *Subst. Abuse Rehabil.* 5:37-52.

[26] Uchiyama, N., Matsuda, S., Kawamura, M., Shimokawa, Y., Kikura-Hanajiri, R., Aritake, K., Urade, Y., and Y. Goda. 2014. Characterization of four new designer drugs, 5-chloro-NNEI, NNEI indazole analog, α -PHPP and α -POP, with 11 newly distributed designer drugs in illegal products. *Forensic. Sci. Int.* 243: 1–13.

[27] Uchiyama, N., Shimokawa, Y., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., and T. Hakamatsuka. 2014. Chemical analysis of a benzofuran derivative, 2-(2-ethylaminopropyl)benzofuran (2-EAPB), eight synthetic cannabinoids, five cathinone derivatives, and five other designer drugs newly detected in illegal products. *Forensic. Toxicol.* 32: 266–281.

[28] Uchiyama, N., Matsuda, S., Kawamura, M., Kikura-Hanajiri, R., and Y. Goda. 2013. Identification of two new-type designer drugs, piperazine derivative MT-45 (I-C6) and synthetic peptide Noopept (GVS-111), with synthetic cannabinoid A-834735, cathinone derivative 4-methoxy- α -PVP, and phenethylamine derivative 4-methylbuphedrine from illegal products. *Forensic. Toxicol.* 32: 9–18.

[29] Doi, T., Asada, A., Takeda, A., Tagami, T., Katagi, M., Matsuta, S., Kamata, H., Kawaguchi, M., Satsuki, Y., Sawabe, Y., Obana, H. 2016. Identification and characterization of α -PVT, α -PBT, and their bromothienyl analogs found in illicit drug products. *Forensic Toxicol* 34: 76-93.

[30] Liu, C., Jia, W., Li, T., Hua, Z., Qian, Z. 2016. Identification and analytical characterization of nine synthetic cathinone derivatives *N*- ethylhexedrone, 4-Cl-pentadrone, 4-Cl-EAPP, propylone, *N*-ethylnorpentylone, 6-MeO-bk-MDMA, α -PiHP, 4-Cl- α -PHP and 4-F- α -PHP. *Drug Test Anal.* doi:10:1002/dta.2136

[31] Błażewicz, A., Bednarek, E., Sitowski, J., Popławska, M., Stypułkowska, K., Bocian, W., Kozerski, L. 2017. Identification and structural characterization of four novel synthetic cathinones: α -methylaminohexanophenone (hexedrone, HEX), 4-bromoethcathinone (4-BEC), 4-chloro- α -pyrrolidinopropiophenone (4-Cl-PPP), and 4-bromo- α -pyrrolidinopentiophenone (4-Br-PVP) after their seizures. *Forensic Toxicol.* 35: 317 – 332.

[32] Apirakkan, O., Frinculescu, A., Shine, T., Parkin, M.C., Cillibrizi, A., Frascione, N., Abbate, V. 2017. Analytical characterization of three cathinone derivatives, 4-MPD, 4 F-PHP and bk-EPDP, purchased as bulk powder from online vendors. *Drug Test Anal* doi:10.1002/dta.2218

[33] Kudo K, Usumoto Y, Usui K, Hayashida M, Kurisaki E, Saka K, Tsuji A, Ikeda N (2013) Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC–MS. *Forensic Toxicol* 32:

- [34] Namera A, Kawamura M, Nakamoto A, Saito T, Nagao M (2015) Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones. *Forensic Toxicol* 33: 175–194
- [35] Zuba D (2012) Identification of cathinones and other active components of “legal highs” by mass spectrometric methods. *Trends Anal Chem* 32: 15–30
- [36] Kohyama E, Chikumoto T, Kitaichi K, Horiuchi T, Ito T (2016) Differentiation of the isomers of *N*-alkylated cathinones by GC-EI-MS-MS and LC-PDA. *Anal Sci* 32: 831-837
- [37] Zweipfenning PG, Wilderink AH, Horsthuis P, Franke JP, de Zeeuw RA (1994) Toxicological analysis of whole blood samples by means of bond-elut certify columns and gas chromatography with nitrogen—phosphorus detection. *J Chromatogr A* 674: 87–95
- [38] Westphal F, Junge T, Klein B, Fritschi G, Girreser U (2011) Spectroscopic characterization of 3,4-methylenedioxy-pyrrolidinobutyrophenone: a new designer drug with α -pyrrolidinophenone structure. *Forensic Sci Int* 209: 126–132
- [39] Westphal F, Junge T, Girreser U, Greibl W, Doering C (2012) Mass, NMR and IR spectroscopic characterization of pentedrone and pentylone and identification of their isocathinone by-products. *Forensic Sci Int* 217: 157–167
- [40] Kohyama E, Chikumoto T, Kitaichi K, Horiuchi T, Ito T (2016) Differentiation of the isomers of *N*-alkylated cathinones by GC-EI-MS-MS and LC-PDA. *Anal Sci* 32: 831-837
- [41] Westphal F, Junge T, Girreser U, Greibl W, Doering C (2012) Mass, NMR and IR spectroscopic characterization of pentedrone and pentylone and identification of their isocathinone by-products. *Forensic Sci Int* 217: 157–167
- [42] Gambaro V, Casagni E, Dell’Acqua L, Roda G, Tamborini L, Visconti GL, Demartin F (2015) Identification and characterization of a new designer drug thiothinone in seized products. *Forensic Toxicol* 34: 174-178
- [43] Ibáñez M, Sancho JV, Bijlsma L, van Nuijs ALN, Covaci A, Hernández F (2014) Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances. *Trends Anal Chem* 57: 107–117
- [44] www.caymanchem.com/forensics
- [45] Hasegawa K, Suzuki O, Wurita A, Minakata K, Yamagishi I, Nozawa H, Gonmori K, Watanabe K (2014) Postmortem distribution of α -pyrrolidinovalerophenone and its metabolite in body fluids and solid tissues in a fatal poisoning case measured by LC–MS–MS with the standard addition method. *Forensic Toxicol* 32:225–234

[46] Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, Gonmori K, Nozawa H, Yamagishi I, Watanabe K, Suzuki O (2015) Postmortem distribution of PV9, a new cathinone derivative, in human solid tissues in a fatal poisoning case. *Forensic Toxicol* 33:141-147

IX. Dorobek naukowy

Publikacje

1. **Milena Majchrzak**, Rafał Celiński, Teresa Kowalska, Mieczysław Sajewicz „Fatal case of poisoning with a new cathinone derivative: α -propylaminopentiophenone (N-PP)”, *Forensic Toxicology* (IF 3,74, MNiSW 35), 2018, pp: 1-9
2. **Milena Majchrzak**, Rafał Celiński, Teresa Kowalska, Mieczysław Sajewicz „The newest cathinone derivatives as designer drugs : an analytical and toxicological review”, *Forensic Toxicology* (IF 3,74, MNiSW 35), 2017, Vol. 36, Issue 1, p: 33-50
3. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Rafał Celiński, Piotr Kuś, Mieczysław Sajewicz, „*Identification and characterization of new designer drug 4-fluoro-PV9 and α -PHP in the seized materials*”, *Forensic Toxicology* (IF 3,74, MNiSW 35), 2016, 34, 115:124
4. Marcin Rojkiewicz, **Milena Majchrzak**, Rafał Celiński, Piotr Kuś, Mieczysław Sajewicz “Identification and physicochemical characterization of 4-fluorobutyrfentanyl (1-((4-fluorophenyl)(1-phenethylpiperidin-4-yl)amino)butan-1-one, 4-FBF) in seized materials and post-mortem biological samples”, *Drug Testing and Analysis* (IF 2,86, MNiSW 25), 2017, 9, 405:414

Rozdziały w książkach:

1. **Milena Majchrzak** i Rafał Celiński, Chapter 11 „*Preparation of Biological Material for Toxicological Analysis*”, *Chromatographic Techniques in the Forensic Analysis of Designer Drugs*, 2018, CRC Press Taylor & Francis Group.
2. **Milena Majchrzak** i Rafał Celiński, Chapter 14 „*Cathinone Derivatives and Their Analysis*”, *Chromatographic Techniques in the Forensic Analysis of Designer Drugs*, 2018, CRC Press Taylor & Francis Group.

Udział w konferencjach

Wystąpienia ustne

1. **Milena Majchrzak**, Rafał Celiński, Teresa Kowalska, Mieczysław Sajewicz The 40th Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Szczyrk, 23-26.05.2017r, *“Fatal case of poisoning with a new cathinone derivative, α -propyloaminopentiophenone – chromatographic and spectroscopic analysis of postmortem material”*
2. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Mieczysław Sajewicz, Rafał Celiński The XXXIXth Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Szczyrk, 01-03.06.2016 *“New psychoactive substances (NPS) contained in “designer drugs” – chromatographic and spectroscopic analysis”*
3. **Milena Majchrzak**, Joanna Margasińska – Olejak, Paulina Wachholz, Jadwiga Nędra XXXV Konferencja Toksykologów Sądowych, Szczecin, 09-11.05.2018 *„Pochodne katynonu oraz analogi opioidów – „dopalacze” roku 2017 – opis 6 przypadków zatruc śmiertelnych”*
4. **Milena Majchrzak**, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz XXXIV Konferencja Toksykologów Sądowych, Kraków, 10-12.05.2017, *Opis przypadku złożonego zatrucia śmiertelnego nowym opioidem – U-47700 oraz pochodną katynonu - α -propyloaminopentiofenonem*
5. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Mieczysław Sajewicz, Rafał Celiński XXXIII Konferencja Toksykologów Sądowych, Prusim, 11-13.05.2016 *„Przypadek zatrucia śmiertelnego nową pochodną katynonu - α -propyloaminopentiofenonem”*
6. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Mieczysław Sajewicz, Rafał Celiński III Ogólnopolska Konferencja „Pomiędzy Naukami-Zjazd Chemików i Fizyków, Chorzów, 16.09.2016 *„Środki ułatwiające wykorzystanie seksualne tzw. „pigułki gwałtu” w praktyce kazuistycznej toksykologów sądowych”*
7. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Mieczysław Sajewicz, Rafał Celiński XXXII Konferencja Toksykologów Sądowych, Bronisławów, 6-8.05.2015 *„Powrót PMMA – przypadki zatruc śmiertelnych na Śląsku”*

Postery

1. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Anna Mazurkiewicz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz, 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Sczyrk, 10-13.05.2015 „*Novel derivatives of cathinone contained in designer drugs-chromatographic and spectroscopic methods for identification*”
2. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Anna Mazurkiewicz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz The XXXVIIIth Symposium Chromatographic Methods of Investigating the Organic Compounds, Sczyrk, 27-29.05.2015 „*Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of two new psychoactive substances contained in “designer drugs”*”
3. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz IV Ogólnopolska Konferencja Pomiedzy Naukami Zjazd Fizyków i Chemików, Chorzów, 18.09.2015, „*Przypadki zatruc śmiertelnych PMMA na terenie Śląska – chromatograficzna i spektroskopowa analiza pośmiertnego materiału sekcyjnego*” – wyróżnienie za najlepszy poster
4. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław, 13.12.2014 „*Chromatograficzne metody identyfikacji i oznaczania ilościowego substancji psychoaktywnych zawartych w tzw. „dopalaczach”*”
5. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz XI Międzynarodowa Konferencja “Chromatografia Jonowa i Techniki pokrewne 2016”, Zabrze, 20-21.04.2016, “*Chromatographic and spectroscopic identification of novel psychoactive substances (NPS) from the cathinone derivatives group*”
6. **Milena Majchrzak**, Marcin Rojkiewicz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz I Ogólnopolska Konferencja Naukowa KRIMED, Lublin, 20.11.2015r, „*Nowe pochodne katynonu – 4-fluoro- PV9 i α -PHP na polskim rynku tzw. dopalaczy – charakterystyka fizykochemiczna*”
7. **Milena Majchrzak**, Paulina Wachholz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz XI Seminarium Naukowe „Aktualne Problemy Chemii Analitycznej”, Katowice, 12.05.2017, *Nowe „dopalacze” z grupy pochodnych katynonu – identyfikacja chromatograficzna i spektroskopowa w materiale rzeczowym*
8. **Milena Majchrzak**, Paulina Wachholz, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz VI Ogólnopolska Konferencja Pomiedzy Naukami, Katowice, 15.09.2017, *Przypadki zatruc śmiertelnych nowym dopalaczem z grupy opioidów – U-47700*
9. **Milena Majchrzak**, Rafał Celiński, Mieczysław Sajewicz XXIII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Kraków, 19-22.09.2017, *Trzy przypadki zatruc śmiertelnych nową substancją psychoaktywną „dopalaczem” z grupy analogów opioidów – „U-47700”*