

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE JAKO NÁSTROJ
ODHALOVÁNÍ „ŠPINA VÝCH PENĚZ”**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Michal Petreň

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2011

SOUHRN

Na téma kvalifikační práce „Hmotnostní spektrometrie jako nástroj odhalování špinavých peněz“ byla v teoretické části zpracována literární rešerše. Na vybraných analytických metodách byl demonstrován jejich význam pro forenzní chemii, např. při analýze automobilových laků nebo výbušnin. Hluběji bylo pojednáno o hmotnostní spektrometrii, její instrumentaci a uplatnění ve forenzní praxi, zejména pak v oblasti analýzy drog na kontaminovaných bankovkách. Kromě kombinací separačních metod GC a LC s MS byly zmíněny i techniky hmotnostní spektrometrie umožňující přímou analýzu povrchu bankovky, např. DART/MS, DESI/MS, TD/MS. Experimentální část práce byla zaměřena na analýzu kontaminovaných bankovek zvolenými modelovými látkami metodou hmotnostní spektrometrie s pomocí dvou iontových zdrojů, elektrospreje (ESI) a modifikací desorpčního elektrospreje tzv. desorpčním nanoelektrosprejem (nanoDESI). Za modelové látky byly zvoleny kofein v kávě a kokain. Primárním cílem bylo ověřit, zda lze použité ionizační techniky aplikovat v této oblasti analýzy. Experimenty potvrdily, že jak technika ESI, tak i nanoDESI jsou pro analýzu kontaminovaných bankovek vhodné. Technika ESI poskytuje obraz o celkové kontaminaci bankovky, zatímco nanoDESI je spíše vhodný pro analýzu konkrétní stopy na daném povrchu (nejen bankovky), než pro komplexní proměřování celého studovaného povrchu.

SUMMARY

The importance of analytical methods in forensic chemistry is demonstrated using selected examples presented in the theoretical part, e.g. analysis of car paints or explosives. The main attention was paid to mass spectrometry and its use in detection of drug contamination of banknotes. Except GC/MS, LC/MS, GC/MS/MS and LC/MS/MS hyphenated techniques DART/MS, DESI/MS, TD/MS has been described in literature. They allow direct surface analysis of banknotes. In the presented work, analysis of banknotes contaminated by caffeine or cocaine were performed using electrospray and desorption nanoelectrospray. Both techniques are appropriate for the analysis of contaminated banknotes. ESI can offer overview of contamination of whole banknote, nanoDESI can identify localized spots on surface of banknote.

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

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

V Olomouci dne

.....
Michal Petreň

Děkuji prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, připomínky a cenné rady. Velký dík patří také Mgr. Lucii Hartmanové za ochotu a čas, který mi věnovala při experimentech a konzultacích.

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Forenzní chemie	2
2.2	Vybrané aplikace analytických metod ve forenzní chemii.....	2
2.2.1	Automobilové laky	3
2.2.2	Výbušniny.....	4
2.3	Hmotnostní spektrometrie jako nástroj odhalování „špinavých peněz”	6
2.3.1	Instrumentace.....	6
2.3.1.1	Iontové zdroje.....	7
2.3.1.2	Hmotnostní analyzátory	11
2.3.1.3	Detektory.....	13
2.3.2	Hmotnostní spektrum	13
2.3.3	Využití MS ve forenzní chemii	14
2.3.3.1	Analýza drog na bankovkách	15
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Chemikálie a přístrojové vybavení	23
3.2	Pracovní postup	23
3.3	Experimentální podmínky	25
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	26
4.1	Analýza kofeinu.....	26
4.2	Analýza kokainu	29
5.	ZÁVĚR	31
6.	CITACE	32
7.	SEZNAM ZKRATEK	34

1. ÚVOD

Základním kamenem při odhalování trestné činnosti, ať už jde o krádež, distribuci drog, znásilnění či vraždu se stala myšlenka zakladatele francouzské kriminalistiky dr. Edmonda Locarda, který tvrdil, že při kontaktu dvou objektů zanechají na sobě navzájem materiální stopu. Dále jde jen o to důkazy nalézt a podrobit je zkoumání na základě nejnovějších poznatků přírodních věd.^{1,2}

Jednou z nejnebezpečnějších a nejvíce postihovaných trestných činností je výroba, pašování a distribuce ilegálních drog, jako je např. kokain, heroin, extáze, LSD a další. Dá se říci, že ilegální drogy stojí na vrcholu pyramidy kriminální činnosti, neboť je dokázáno, že mnoho zločinů bylo spácháno pod vlivem některé z nich. Proto je důležité zamezit dealerům drog v jejich jednání a tím dopomoci k eliminaci páchaní trestné činnosti.

Tento úkol pomáhá vyřešit forezní, neboli kriminalistická, či soudní chemie, která nabízí v této době řadu metod, jež dovedou identifikovat a stanovit i nepatrné množství drogy přítomné na organickém či anorganickém materiálu. Tím forezní chemie velmi ulehčuje práci kriminalistům a při soudním řízení jsou výsledky analýz použity jako nevyvratitelný důkaz, mající velký vliv na rozhodnutí soudu.

Zdaleka nejpopulárnější metodou pro analýzu drog, potažmo organických látek, je v této době metoda zažívající obrovský vzestup v instrumentální analýze nazývaná hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS). Využití má jak samostatná metoda MS, tak i její kombinace s jinými instrumentálními metodami, jakou je nejčastěji plynová (Gas Chromatography - GC) a kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography - LC). Možnost bližší charakterizace směsi látek, nabízí tandemová hmotnostní spektrometrie, případně hmotnostní spektrometrie n-tého stupně (MSⁿ).³

Cílem této práce je seznámení se s forezní chemií, jako součástí forezní vědy, přičemž budou ve stručnosti uvedeny některé aplikace analytických metod ve forezní praxi. Zvláštní část bude věnována instrumentální metodě - hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS), jejímu principu, instrumentaci, interpretaci dat a významném postavení při získávání forezních důkazů, zejména k identifikaci a stanovení drog na kontaminovaných bankovkách. Na teoretickou část práce navazuje praktické ověření možností desorpčního nanoelektrospreje při hmotnostně spektrometrické analýze kontaminovaných bankovek.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Forenzní chemie

Označení forenzní chemie je převzato z anglického výrazu forensic chemistry, což můžeme chápat i jako chemii soudní nebo kriminalistickou. Jako nedílná součást multidisciplinární forenzní vědy je nepostradatelná k získávání důkazů, které uplatňují vyšetřovatelé u soudu a tyto důkazy pak mohou přispět k dosažení spravedlnosti.

Forenzní chemik jako pracovník forenzní laboratoře využívá poznatků a metod z oblasti biochemie, fyzikální, analytické, organické a anorganické chemie ke zpracování stop z místa činu. Analýza vzorku je pro něj velikou výzvou, neboť vzorky nebývají obvykle čisté chemické látky, ale směsi chemických sloučenin, a tak je volba optimální metody pro dosažení spolehlivých výsledků velmi významná.⁴ Důležitost výběru metody spočívá bezesporu také v určitých omezeních, nejčastěji ekonomických, materiálních, časových či personálních. Ovšem neopomenutelným předpokladem k úspěšné analýze je správný odběr vzorku, protože chyby způsobené odběrem vzorku bývají často neodstranitelné.

První forenzní laboratoř byla založena otcem kriminalistiky Edmondem Locardem v roce 1910 se dvěma přístroji – mikroskopem a spektrometrem. Tyto dva přístroje jsou považovány za základní pilíře forenzních metod. Postupem času byly vyvinuty novější metody, ulehčující zdlouhavou analýzu, mezi které patří spektrální metody - infračervená spektrometrie a rentgen. Dalšími sofistikovanými metodami, které přibýly, byly separační metody, zejména plynová chromatografie (GC) a hmotnostní spektrometrie (MS), nebo nukleární magnetická rezonance (NMR) či skenovací elektronová mikroskopie (SEM), která si také pomalu nachází své místo mezi používanými metodami forenzní laboratoře.⁴

2.2 Vybrané aplikace analytických metod ve forenzní chemii

Analytické metody využívané v kriminalistice se mohou dělit dle druhu analyzované látky do dvou základních skupin, a to na metody využívané k analýze organických a metody využívané k analýze anorganických látek. Organická analýza pomáhá identifikovat např. drogy, organické jedy, doping, syntetická vlákna, složky barev, ropné produkty nebo i některé výbušniny. U analýzy anorganické jde většinou o důkaz a identifikaci iontů toxických prvků, analýzu materiálu střel atd. V následujícím textu bude pojednáno o aplikaci vybraných

analytických metod v konkrétních případech, zejména v analýze organických látek. Je to pochopitelné, neboť většina forenzních důkazů je organické respektive biologické povahy, ať už se jedná o tělní tekutiny, barviva, výbušniny či drogy.

2.2.1 Automobilové laky

Prvním názorným příkladem využití analytických metod ve forenzní praxi může být analýza automobilových laků. Ta je většinou potřeba při spáchání trestného činu typu „hit and run“, kdy pachatel ujede z místa činu. Potom bývá nalezený lak automobilu pachatele jediným vodítkem k jeho dopadení.

Automobilové laky se řadí mezi syntetické akrylátové barvy, tedy makromolekulární látky, mající za základní stavební jednotku ester kyseliny akrylové popř. její substituční deriváty. Celkovou kompozici laků tvoří barva (barevný pigment), ředidlo a tužidlo (katalyzátor).⁶

Metod pro identifikaci chemického složení automobilových laků je poměrně mnoho, proto zde budou uvedeny pouze některé. Jednou z metod mající dlouholetou historii je *pyrolytická GC/MS*. U této metody se vzorek nejprve pyrolyticky rozloží při 750°C po dobu 10 minut, jednotlivé složky jsou separovány plynovým chromatografem a po ionizaci detekovány hmotnostním spektrometrem.⁷

Za účelem analýzy automobilových laků se hojně využívá *Ramanova a infračervená (IČ) spektrometrie* s Fourierovou transformací. Tyto dvě metody poskytují navzájem doplňující se informace o složení vzorku. Vzájemná komplementarita metod vyplývá z jejich principů. V IČ spektru se projeví pouze ty vibrace vazeb v molekule, které způsobují změnu dipólového momentu molekuly (spíše polární vazby-př. O-H, C-O, N-H, C-Cl), zatím co v Ramanově spektru ty, které souvisí se změnou polarizovatelnosti molekul (méně polární a nepolární vazby-př. C=C, S-S, C-S). Dokážou tedy identifikovat nejen barevný pigment, ale i ostatní komponenty a příměsi. Získaná spektra lze porovnávat s knihovnou spekter komerčních autolaků, a tím dospět k jednoznačné identifikaci.⁸

LA/ICP/MS neboli *laserová ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaném plazmatu* je ultrastopová analytická metoda, umožňující přímou analýzu pevných povrchů. V prvním kroku dochází k ablaci (uvolnění) části vzorku dodáním energie ve formě pulzního laserového paprsku. Nosným plynem je tento vzorek unášen do dalšího systému, kterým je ICP. V ICP dochází k atomizaci a ionizaci vlivem argonového plazmatu při teplotě 6000 – 10000 K. Vzniklé ionty prvků jsou vedeny do MS, kde jsou separovány a následně detekovány. Ionizační energie argonového plazmatu je 15,8 eV a díky tomu mohou být pomocí ICP stanoveny prvky mající ionizační energii < 16 eV. To jsou kromě F, Ne a He všechny prvky periodického systému. S využitím LA/ICP/MS je tedy možné stanovit stopové množství kovu (od jednotek ppt až po stovky ppb), jež je běžnou součástí automobilových laků.^{9,10}

2.2.2 Výbušniny

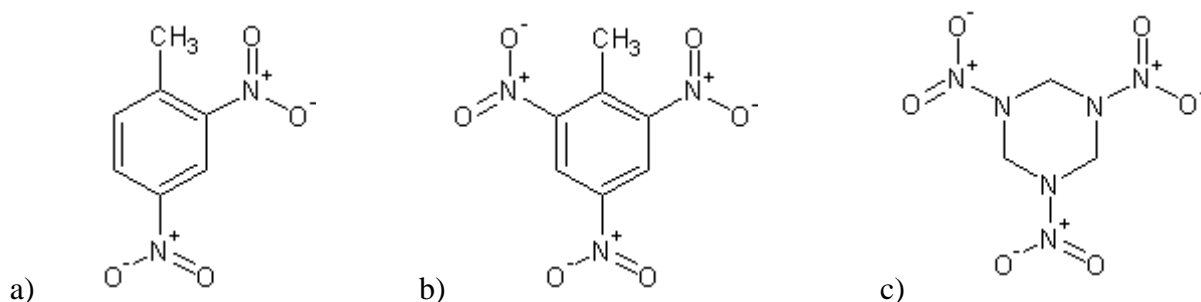
Detekce výbušnin je dalším příkladem využití analytických metod ve forenzní chemii. Výbušniny představují pro společnost velikou hrozbu, a tak metody sloužící k jejich identifikaci prochází neustálým vývojem, přičemž dochází především ke zvýšení rychlosti, citlivosti analýzy a k miniaturizaci měřících zařízení zejména pro screening výbušnin na letištích, celních přechodech či v zaminovaných oblastech.

Převážná většina explozivních látek jsou organické povahy, z nichž k nejnámějším patří 2,4-dinitrotoluen (DNT) (Obr. 1a), 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) (Obr. 1b), hexogen (RDX) (Obr. 1c) nebo pentrit (PETN), a proto se prakticky využívá *plynová chromatografie (GC)* s různými typy detektorů. Detektor elektronového záchyty (ECD) využívá radioaktivního β^- zářič ^{63}Ni , který ionizuje molekuly nosného plynu (např. N_2) za vzniku ionizačního proudu.

Přítomnost analytu se projeví snížením ionizačního proudu (zachycení elektronů ionizačního proudu elektronegativním prvkem analytu - N, O, S, halogeny) a toto snížení je úměrné koncentraci analytu. Detekční limity se pohybují od 1 pg až po 100 pg.

Výbušniny, jako DNT, TNT a RDX obsahují substituované nitroskupiny, schopné chemiluminiscence. Této vlastnosti se využívá u chemiluminiscenčního detektoru. Detektor je vysoce selektivní a lze ho uplatnit i při analýze znečištěných vzorků. Podstatou je vybuzení

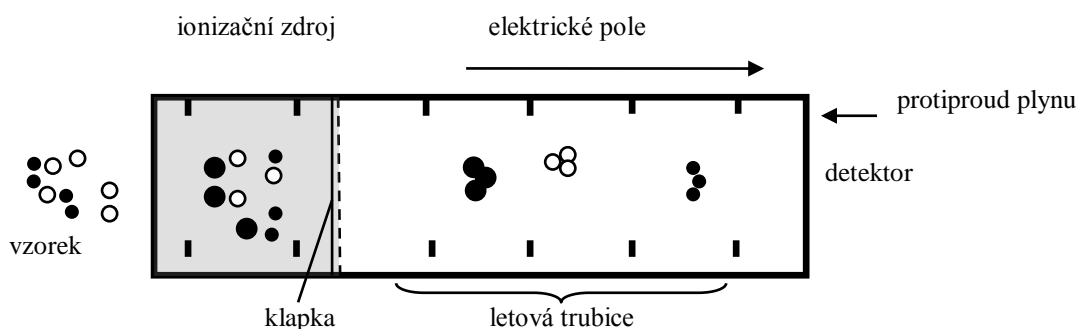
excitovaného stavu molekuly chemickou reakcí a její návrat (relaxace) do základního energetického stavu zářivým procesem.



Obr. 1 – chemické struktury: a) DNT, b) TNT, c) RDX

Pro analýzu takových organických látek, jakými jsou výbušniny, je možné použít *hmotnostní spektrometrii (MS)*, jejíž princip a aplikace jsou podrobněji popsány v kapitole 2.3.

V současnosti je k detekci výbušnin mimo laboratoře asi nejvíce používanou technikou *iontová mobilní spektrometrie (IMS)* (Obr. 2). Metoda založená na podobném principu, jako TOF (Time Of Flight) analyzátor u MS. Základními částmi přístroje je iontový zdroj a letová trubice. Jako ionizační zdroj je nejčastěji používán β^- zářič ^{63}Ni . Novější konstrukční typy využívají např. ^{241}Am , produkující α částice a záření γ . Někdy molekuly analytu nebývají ionizovány přímo, ale ionizace probíhá zprostředkovaně přes reakční medium tzv. chemickou ionizací (viz 2.3.1). Většina molekul výbušnin produkuje po ionizaci záporně nabitě ionty, které jsou elektrickým polem urychleny směrem k detektoru, navíc je pohyb iontů ovlivněn přítomností plynu v letové trubici. Na rozdíl od TOF analyzátoru se v IMS může pracovat za atmosférického tlaku, což má dopad na velikost a cenu zařízení. Další rozdíl oproti TOF je ve způsobu separace jednotlivých iontů. Zatím co v TOF jsou ionty separovány na základě rozdílného poměru hmotnosti ku náboji, v IMS hraje důležitou roli i velikost a tvar, tedy aerodynamické vlastnosti iontů (čím bude, při urychlení na stejnou rychlost, menší odpor vůči pohybu iontů, tím dříve doputují k detektoru).¹¹



Obr. 2 - schéma IMS

2.3 Hmotnostní spektrometrie jako nástroj odhalování „špinavých peněz“

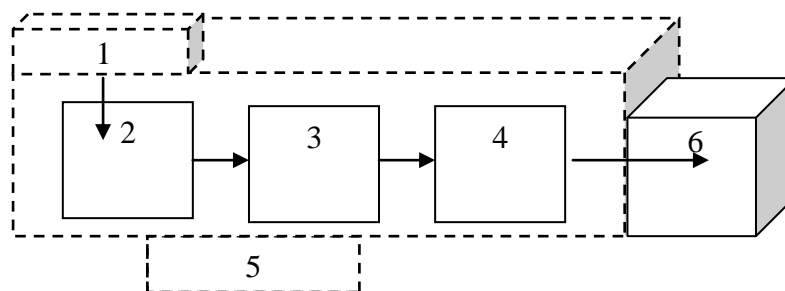
Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS) je fyzikálně chemická instrumentální metoda, separující analyzované látky po převedení do plynné fáze a ionizaci dle jejich poměru hmotnosti a náboje m/z . MS má dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek a její využití spočívá především ve stopové analýze organických sloučenin s důrazem na zjištění struktury daných látek. Pro zvýšení selektivity analýz se MS vhodně kombinuje s kolonovými separačními metodami, přičemž toto spojení umožňuje identifikaci a stanovení složek vzorku ve složitější matrici. Za poslední desetiletí prodělala instrumentace MS rychlý vývoj, díky kterému se stala velmi oblíbenou metodou mající širokou aplikovatelnost především ve formě komerčně dostupných kombinovaných systémů: GC/MS, LC/MS.¹²

2.3.1 Instrumentace

Pomocí sofistikované instrumentace, probíhá celý proces analýzy, který můžeme shrnout do několika základních, po sobě následujících kroků:¹³

- Zavedení vzorku
- Odpaření vzorku
- Ionizace
- Akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru
- Separace iontů hmotnostním analyzátozem
- Detekce iontů

Instrumentální vybavení je uvedeno v blokovém schématu hmotnostního spektrometru (Obr. 3):



Obr. 3 – hmotnostní spektrometr

Vstupem (1) je do hmotnostního spektrometru přiváděn vzorek do iontového zdroje (2). V iontovém zdroji dochází k převedení analytu do ionizovaného stavu a případně k fragmentačním procesům. Hmotnostní analyzátor (3) slouží jako disperzní prvek, který separuje v prostoru či čase směs iontů o různých poměrech m/z přiváděných z iontového zdroje, ionty následně dopadají na detektor (4), který poskytuje analogový signál, úměrný počtu iontů. Celá operace musí probíhat za nízkých tlaků, aby nedocházelo ke kolizím částic. K tomu se využívá vakuový systém (5). Nakonec je vše vyhodnoceno vhodným programovým vybavením počítače (6), který má kromě zpracování dat rovněž funkce řídicí a kontrolní.

V případě kombinovaných systémů jako GC/MS a LC/MS, je důležité zvolit vhodný vstup z kolony do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, neboť analyzovaná látka je přiváděna do iontového zdroje společně s mobilní fází, která může mít nežádoucí vliv na výsledky analýzy. Zpravidla může být vyústění kolony do hmotnostního spektrometru dvojí a to přímé nebo přes vhodné rozhraní, čímž se sníží podíl mobilní fáze.¹³

2.3.1.1 Iontové zdroje

Zde probíhá ionizace vzorku, respektive dochází k ionizaci látek obsažených ve vzorku a k jejich případné fragmentaci. Energetická náročnost ionizace závisí především na typu analyzované látky. U většiny organických látek postačuje k ionizaci energie nepatrně vyšší, než je jejich prahová ionizační energie, která bývá obvykle 7-16 eV.

Dle množství energie dodané při ionizaci se ionizační techniky dělí na měkké a tvrdé. U měkké ionizační techniky je dodávaná energie nízká, a tudíž nelze předpokládat fragmentaci vzniklých iontů. Naproti tomu při tvrdé ionizační technice je dodávaná energie velmi vysoká a očekává se tedy bohatá fragmentace iontů.

Ionizaci je možno provádět jak v plynné, tak i v kondenzované fázi, dle povahy analyzovaných látek.¹³

➤ Ionizace elektronem (Electron Ionization - EI)

Ionizace elektronem je tvrdou ionizační technikou látek v plynné fázi a je nejběžněji používanou v kombinaci GC/MS. Ionizace analyzované látky M je prováděna proudem urychlených elektronů, kdy může dojít obecně k těmto dějům:

odtržení elektronu: $M + e^- \rightarrow M^{\bullet+} + 2e^-$

elektronový záchyt: $M + e^- \rightarrow M^{\bullet+}$

Produkty jednotlivých dějů nazýváme radikalkationt – $M^{\bullet+}$ a radikalaniont – $M^{\bullet-}$. Jako zdroj elektronů je používáno žhaveného rheniového nebo wolframového vlákna, představující katodu. Proud elektronů emitovaných z katody, který následně směřuje k anodě je přímo úměrný velikosti žhavicího proudu. Rozdíl potenciálu mezi katodou a anodou určuje energii emitovaných elektronů. Za standard se považuje energie 70 eV. Díky této vysoké energii lze kromě ionizace očekávat také bohatou fragmentaci.¹²

➤ Chemická ionizace (Chemical Ionization - CI)

Chemická ionizace je příkladem měkké ionizační techniky v plynné fázi a je také vhodná u systému GC/MS. Stejně jako u ionizace elektronem je i zde proud elektronů zdrojem ionizace, tentokrát se jedná o přenos energie elektronů na molekulu nepřímo přes tzv. reakční medium, kterým je plyn (nejčastěji CH_4) nebo páry nízkovroucí kapaliny. U tohoto typu ionizace jsou podmínky v ionizační komoře poměrně odlišné. Ionizace probíhá za relativně vyššího tlaku (50-150 Pa), jenž napomáhá zvýšit pravděpodobnost mezimolekulárních a meziontových interakcí.¹²

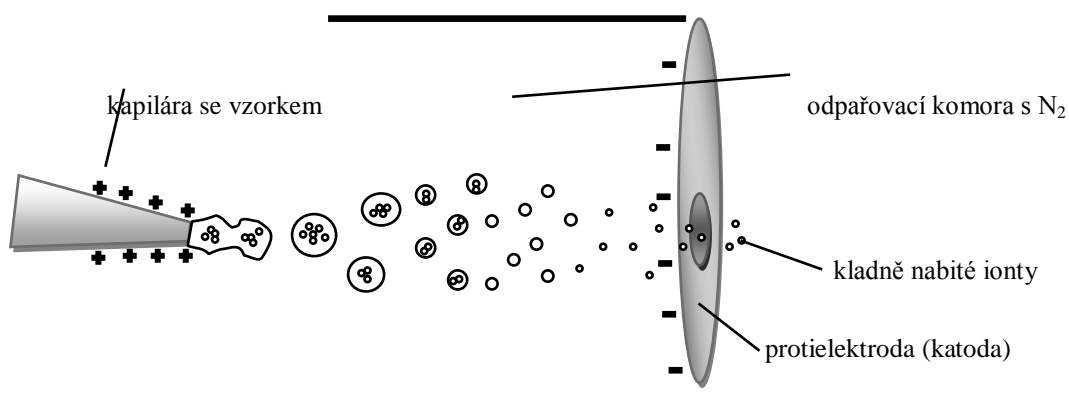
➤ Sprejové ionizační techniky/Ionizace za atmosférického tlaku

Tato skupina se řadí mezi měkké ionizační techniky a mohou být děleny dle kritéria přípravy vzorku do dvou skupin. První skupinou jsou ionizační techniky z kapalně fáze a jsou vhodné zejména pro systémy LC/MS a CE/MS. Konkrétní, nejčastěji používané techniky jsou:

- Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization - ESI)
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization - APCI)

Ionizace elektrosprejem (ESI) (Obr. 4) má podobný průběh jako dnes již málo používaná ionizace termosprejem. Kapalná fáze je rozprašována vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím kapiláry pod vysokým napětím a uzemněnou protielektrodou. Vzniklé kapičky jsou rychle vysoušeny za ohřevu inertním plynem, až dochází k iontovému

vypařování přímo do plynné fáze.¹² Za analýzu biomakromolekul pomocí ESI získal v roce 2002 John B. Fenn Nobelovu cenu.



Obr. 4 - schéma ESI

Chemická ionizace za atmosférického (APCI) je od předchozí metody odlišná tím, že se při ní tvoří z odpařené kapalně fáze díky koronovému výboji, generovanému na hrotu tzv. koronové jehly chemicko-ionizační plazma, ve kterém dochází v důsledku ion-molekulových reakcí k tvorbě iontů, často protonovaných nebo deprotonovaných molekul.¹²

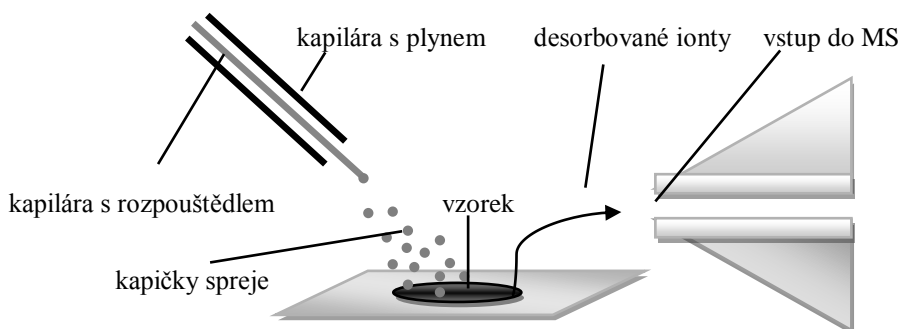
Do druhé skupiny řadíme techniky tzv. analýzy povrchů, u kterých většinou není potřebná příprava vzorku, a tudíž lze studovaný materiál analyzovat přímo (lidská tkáň, části rostlin, bankovky atd.). Příkladem mohou být techniky:

- Desorpční elektrosprej (desorption electrospray ionization - DESI)
- Desorpce ionizace laserem za asistence matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization - MALDI)
- Přímá analýza v reálném čase (direct analysis in realtime - DART)

Desorpční elektrosprej (DESI) (Obr. 5) vychází z techniky ionizace elektrosprejem s tím rozdílem, že obvykle není prováděna jakákoliv příprava vzorku a lze analyzovat vzorky se složitými maticemi. Oproti klasickému elektrospreji je kapilárou přiváděno, zmlžováno a ionizováno pouze rozpouštědlo (obvykle směs voda, methanol v poměru 1:1). Vzorek je umístěn cca 5 mm před špičku DESI pod vhodným úhlem (nejčastěji 50°) ke sprejovací kapiláře a vstupu do MS. Okolo kapiláry proudí inertní plyn (N_2), který napomáhá procesu desorpce/ionizace vzorku. Sprejováním vznikající ionty interagují s povrchem analyzovaného vzorku, načež dochází k desorpci iontů analytů, které jsou následně vedeny do hmotnostního analyzátoru. Desorpci a výtěžnost tvorby iontů ovlivňují geometrické parametry a vlastní

parametry elektrospreje. Existuje rovněž modifikace bez použití sprejovacího plynu a s jinou geometrií (desorpční nanoelektrosprej, nanoDESI).^{14,15}

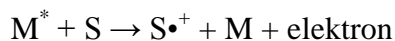
Technika disponuje širokým využitím, ať už se jedná o monitorování výbušnin a drog, analýza farmak, produktů pyrolýzy, prostorové zobrazení vybraných iontů (tzv. MS-imaging) nebo analýzu chirálních látek.



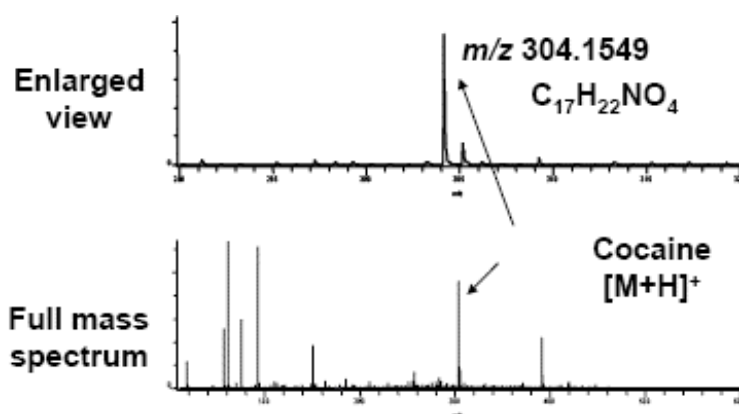
Obr. 5 - schéma DESI

Desorpce ionizace laserem za asistence matrice (MALDI) je označována za pulzní ionizační techniku a často se používá ve spojení s TOF (time of flight) analyzátozem. Nutná je příprava vzorku, který se mísí s vhodnou matricí. Vzorek s matricí na vhodném povrchu (nerezová destička) je ozařován krátkými laserovými pulzy (jednotky až desítky ns), energie laseru způsobí desorpci látek, vede k ionizaci matrice, která zprostředkovane předává náboj analytu. Za analýzu biomakromolekul technikou MALDI byl Nobelovou cenou oceněn K. Tanaka v roce 2002. Technika je vhodná pro analýzu biopolymerů a syntetických polymerů, ale také byla použita např. k detekci mikroorganismů, které by mohly být použity jako biologická zbraň.^{16,17,18}

Přímá analýza v reálném čase (DART) patří mezi populární ionizační techniky současnosti. Mezi hlavní výhody této metody lze zmínit bezkontaktní způsob analýzy daného povrchu, krátkou dobu analýzy (desítky sekund), širokou aplikovatelnost a možnost analýzy složitějších směsí bez předchozí separace. Princip DART techniky spočívá v excitaci reaktivního plynu (He nebo N₂) výbojem, kdy z něj vznikají metastabilní ionty a částice. Ionty plynu jsou zachyceny na protielektrodě a s analytem (S) interagují pouze excitované částice reaktivního plynu (M^{*}). Nejčastější mechanismus vzniku kationtů je tzv. „Peningova ionizace“ probíhající následovně:



Přepínáním polarity vypuzující elektrody lze měnit analýzu kationtů na analýzu aniontů a naopak. Pomocí DART techniky mohou být analyzovány stovky chemických látek, jako peptidy, oligosacharidy, drogy, výbušniny, syntetické látky, metabolity, léčiva, pesticidy aj. Všechny tyto látky lze analyzovat z povrchů, jakými jsou lidská kůže, papírová měna, letenky, ovoce, zelenina, tělní tekutiny nebo oblečení. Technika poskytuje celkem jednoduchá spektra, např. MS spektrum analýzy kokainu na 1 dolarových US bankovkách pomocí DART (Obr. 6). Kokain byl detekován jako kvazimolekulární ion $C_{17}H_{22}NO_4^+$ ($[M+H]^+$) s hodnotou m/z 304,1549.^{19,20,21}



Obr. 6 - MS spektrum kokainu (převzato z cit.²⁰)

2.3.1.2 Hmotnostní analyzátory

Úloha hmotnostních analyzátorů je již zmíněná separace iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Základními konstrukčními typy hmotnostních analyzátorů jsou:

- Magnetický hmotnostní analyzátor (Magnetic mass analyzer - M)
- Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole analyzer - Q)
- Iontová past (Ion-Trap analyzer - IT)
- Průletový analyzátor (Time Of Flight analyzer - TOF)
- Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance - FT-ICR)
- Orbitální past (ORBITRAP)

➤ Magnetický hmotnostní analyzátor (Magnetic mass analyzer - M)

Magnetický hmotnostní analyzátor bývá součástí hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením. Konstrukčně se jedná o elektromagnet, který je složen ze dvou pólových nástavců. Urychlené ionty jsou separovány v magnetickém poli o indukci B, pro dosažení vysokého rozlišení je nutné magnetický sektor kombinovat s elektrickým.¹²

➤ Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole analyzer - Q)

Analyzátor tohoto typu se sestává ze čtyř tyčí, kruhového či hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí. Do prostoru mezi tyčemi jsou přiváděny ionty, jejichž trajektorie pohybu směrem k detektoru je dána změnou stejnosměrného napětí, amplitudy a frekvence radiofrekvenčního pole. Pomocí změn uvedených veličin projdou k detektoru pouze ionty o určité hodnotě m/z .¹²

➤ Iontová past (Ion-Trap analyzer - IT)

Obdoba kvadrupólového analyzátoru, přičemž konstrukčně jde o tři elektrody, z nichž jedna je kruhová a dvě vyklenuté do prostoru kruhu. Pomocí střídavého elektrického pole jsou ionty v prostoru mezi elektrodami zadržovány. K semknutí iontů napomáhá základní plyn, nejčastěji He o nízkém tlaku. Akumulace iontů může trvat mikrosekundy až sekundy, dle množství vzorku. Opět změnou veličin jsou ionty postupně odváděny k detektoru. Novější konstrukce lineární pasti využívá jiného uspořádání elektrod, základem jsou čtyři tyče, mezi kterými jsou ionty akumulovány.¹²

➤ Průletový analyzátor (Time Of Flight analyzer - TOF)

Principiálně nejjednodušší a časově nejméně náročný způsob separace, jehož podstatou je odlišná doba iontů evakuovanou trubicí. Iontům je před vstupem do průletového analyzátoru dodána stejná kinetická energie. Různá doba letu závisí na hmotnosti a velikosti daného iontu.¹²

➤ Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance - FT-ICR)

Cela iontové cyklotronové rezonance je ve své podstatě elektromagnetickou iontovou pastí, umístěnou uvnitř supravodivého magnetu s vysokým statickým magnetickým polem.

Ionty uvnitř této pasti se vlivem magnetického pole začnou pohybovat s cyklotronovými trajektoriemi a cyklotronovou frekvencí nepřímo úměrnou jejich hodnotě m/z . Vložení rychlého napěťového pulzu na excitačních elektrodách způsobí excitovaný pohyb iontů se stejnými hodnotami m/z , přičemž dojde k jejich synchronizaci do oblaků koherentně se pohybujících iontů. Pohybem oblaků excitovaných iontů, jež jsou v rezonanci s excitačním napětím, se indukuje na detekčních elektrodách střídavý proud, který je měřen. Frekvence indukovaného proudu odpovídá cyklotronové frekvenci a intenzita je úměrná počtu iontů. Měřením se získává závislost intenzity signálu na čase, která se pomocí Fourierovy transformace převádí na závislost intenzity na frekvenci, ta se přepočte na standardní spektrum.²²

➤ Orbitální past (ORBITRAP)

Orbitrap představuje nejnovější komerčně vyráběný typ hmotnostního analyzátoru (od r. 2005) využívající Fourierovu transformaci. Analyzátor je tvořen vnější elektrodou s otvorem pro vstup iontů a vnitřní elektrodou vřetenovitého tvaru, na kterou je vkládáno napětí. Ionty, vstupující do pasti se vlivem měničného napětí začnou spirálovitě pohybovat, přičemž obdobně jako v ICR generují proudový signál, který je pomocí Fourierovy transformace převáděn na hmotnostní spektrum.²³

2.3.1.3 Detektory

Základní dělení detektorů je na detektory pro přímá měření a násobičové detektory. První typ detektorů měří elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů a je většinou používán pro určování izotopového zastoupení prvků, např. při určování stárí hornin. Druhý typ využívá efekt násobení elektronů vzniklých při dopadu iontů a jeho využití je zejména u technik GC/MS a LC/MS díky vyšší citlivosti a delší životnosti. Násobičové detektory jsou dále děleny na elektronnásobičové a fotonásobičové, dle druhu detekovaného signálu.

2.3.2 Hmotnostní spektrum

Výsledkem analýzy hmotnostního spektrometru je hmotnostní spektrum, které představuje nejčastěji závislost relativní intenzity iontového proudu na podílu m/z . Nejintenzivnějšímu píku pak náleží ve spektru hodnota iontového proudu 100%.

2.3.3 Využití MS ve forenzní chemii

Metoda MS má velmi širokou aplikovatelnost ve forenzní chemii, především v kombinaci s kolonovými separačními metodami, jako je plynová nebo kapalinová chromatografie. Značné uplatnění mají i navzájem spojené hmotnostní analyzátoři v metodě tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). V kapitole 2.2 byly již uvedeny některé aplikace MS, ať už se jednalo o analýzu výbušnin nebo automobilových laků. Nadále budou ve stručnosti představeny další vybrané aplikace z oblasti analýzy drog.

Technika, která nachází stále významnější postavení při testování drog ve forenzní laboratoři, je LC/MS. Metoda splňuje požadavky pro forenzní toxikologickou analýzu pro svoji vysokou selektivitu, možnost detekce aktivních metabolitů a efektivní screening v nejasných případech. Od jejího zavedení prodělala zásadní vývoj a stala se tak metodou, aplikovatelnou v mnoha analytických případech. Hlavní zásluhu na popularitě má zavedení postupů ionizace za atmosférického tlaku (API). Příchod API/LC/MS posunul všechny předešlé používané ionizační techniky k zastaralým.²⁴

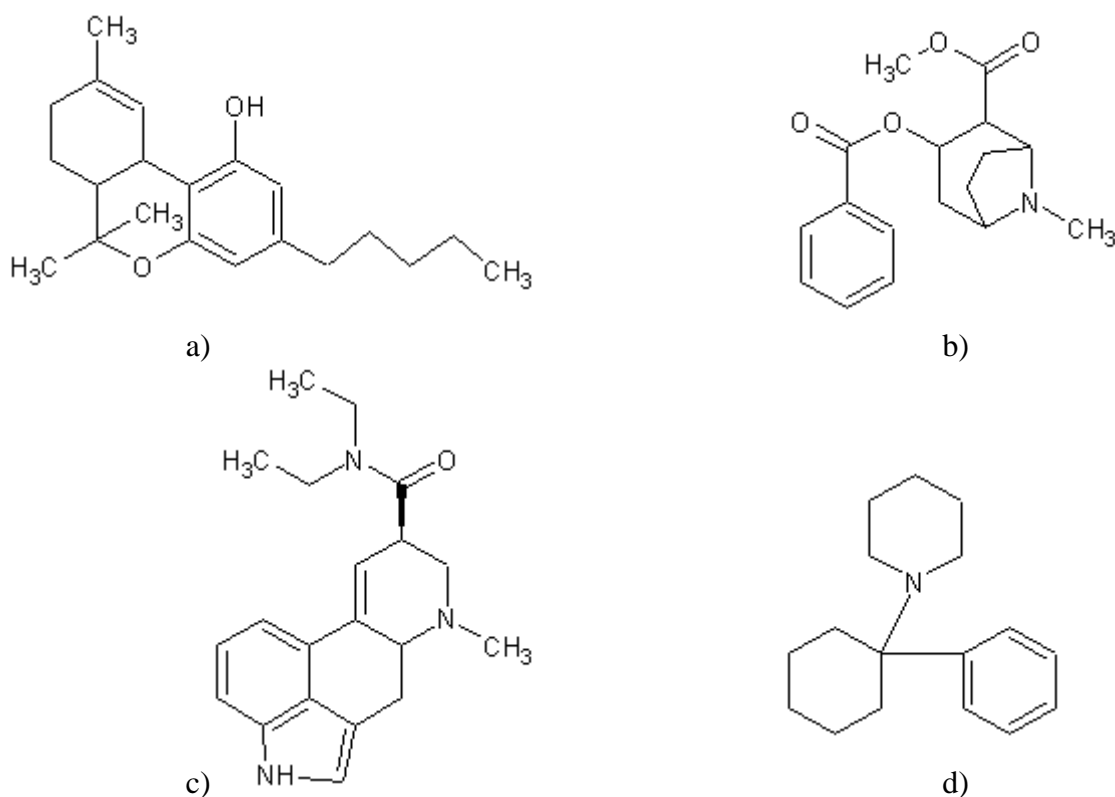
Metoda GC/MS nalézá své uplatnění stejně jako LC/MS ve forenzní toxikologii i dopingové kontrole, při testování drog v tělních tekutinách a vlasech. V prvním případě je GC/MS speciálně v módu chemické ionizace (CI) referenční metodou pro potvrzení pozitivního screeningového testu při testování drog v tělních tekutinách, zejména v moči a krvi. Ukázalo se, že kromě identifikace drog je GC/MS aplikovatelná i pro jejich kvantifikaci za použití vnitřních standardů. U testování vlasů na přítomnost drog je praktickou výhodou delší doba sledování přítomnosti drogy v delším časovém horizontu ve srovnání s testováním moči nebo krve. Analýza moči a krve poskytuje informaci o krátkodobém užívání drogy a neuvažuje rozdíl mezi chronickým užíváním nebo krátkodobou expozicí drogy, zatímco analýza vlasů poskytuje dlouhodobou historii užívání drogy a tento rozdíl uvažuje.²⁴

Techniky DART/MS, ESI/MS a DESI/MS bývají využívány při analýze drog velmi často. Poskytují relativně jednoduchá spektra, která lze dobře interpretovat. Jako příklad lze uvést, že pomocí ESI/MS byly analyzovány kontrolované látky, např. methamfetamin, kokain či heroin.²⁵

2.3.3.1 Analýza drog na bankovkách

Drogy hrají v analýze organických látek důležitou roli především tím, že jejich zneužívání často souvisí s násilným či nenásilným trestným činem, způsobuje zdravotní potíže a narušuje osobní, rodinné a společenské vztahy. V průběhu posledních desetiletí se proto stalo testování drog důležitou částí práce forenzních toxikologů.

Průzkum ve Spojených státech v roce 2005 ukázal, že 19,7 mil. Američanů ve věku nad 12 let užívalo minimálně měsíc před testováním ilegální drogy. Zdaleka nejpoblárnější drogou byla marihuana (Obr. 9) a hašíš (74,1 %). Dalšími oblíbenými ilegálními drogami byl kokain (12,2%) (Obr. 10), halucinogeny jako LSD (Obr. 11), PCP (Obr. 12) a extáze (5,6%) a heroin (0,7%). Z těchto uživatelů bylo 3,6 mil. klasifikováno jako závislých na ilegálních drogách nebo zneužívajících drog pravidelně.²⁶



Obr. 7 - chemické struktury: a) THC, b) kokainu, c) LSD, d) PCP

Testování drog spadá do dvou kategorií, kterými jsou screening (prověřování) a konfirmace (potvrzení). Screeningový test je obvykle prováděn jako první u vzorku, v němž má být substance identifikována. Tento test má za úkol vyloučit velké množství drog, které by

přicházely v úvahu. Zároveň tyto testy identifikují obecné kategorie látek, které mohou vzorku náležet, ale neposkytují o látkách bližší specifické informace. Zvláštní typ screeningového testu, který je hojně používán je tzv. předpokládaný test (z angl. „presumptive test“). Ten je prováděn tehdy, když vyšetřovatel odůvodněně věří, že je konkrétní látka přítomna ve vzorku, tzn., že se přítomnost „předpokládá“. Screeningové testy jsou pouze prvním krokem k jednoznačné identifikaci určité látky. Konfirmační (potvrzovací) test vždy následuje po screeningovém testu, ve snaze určit specifické vlastnosti dané látky přítomné ve studovaném vzorku.²⁶

Po letech se mnoho chemických testů uplatnilo jako screeningový test drog, ale mnohé z nich nebyly nezbytně specifické pro drogy a v mnoha případech mohly poskytovat falešně pozitivní nebo negativní výsledky. Pozitivní chybu poskytují v případě, kdy je prokázána určitá látka ve vzorku, ale ve skutečnosti v něm není obsažena a negativní chybu, pokud je daná látka ve vzorku přítomna, ale nebyla pomocí testu prokázána.

Způsobů, jakými jsou drogy na bankovkách zadržovány, je hned několik. Inkoust tvoří na bankovce „lepkavý“ povrch, na který se snadno zachytí špína, lidský pot, kosmetické přípravky, jakožto i drogy. Druhým způsobem kontaminace je zabudovávání drogy do mezer mezi jednotlivými vlákny bavlny tvořícími bankovku. Při styku kontaminované bankovky s běžným oběživem dochází k šíření kontaminace řetězovým způsobem. Zpravidla pak bývá neskutečně těžké od sebe bankovky kontaminované přímo trestnou činností a nepřímo, např. počítačnými stroji v bankách. Úroveň kontaminace „drogových“ peněz bývá obvykle vyšší, ale nemusí tomu tak být ve všech případech. Množství ilegálních drog na bankovkách jen zřídka přesahuje množství větší, než několik ng, a proto je potřeba citlivých metod, mající vysokou selektivitu pro tyto sloučeniny.²⁷

Jedno je jasné. Odlišit od sebe bankovky z běžného oběhu a bankovky kontaminované v důsledku obchodování s ilegálními drogami není snadný úkol. Velmi často totiž záleží na zkušenostech analytika, který musí umět se získanými daty správně naložit, a tudíž lidský faktor hraje nejen v této analýze svou roli.

A) Hmotnostní spektrometrie kokainu

Kokain je dnes velmi populární ilegální droga, která se klasifikuje mezi psychofarmaka, konkrétně psychedelika. Psychedelika jsou látky vyvolávající přechodné psychotické stavy. Může jít o změny smyslového vnímání, jako snové obrazy, halucinace a

depersonalizace. Společně s těmito stavy dochází ke změně nálady, euforie až deprese a pocity strachu. Po chemické stránce je kokain tropanový alkaloid methyl – [1R – (exo, exo)] – 3 – (benzoyloxy) – 8 – methyl – 8 – azabicyklo [3.2.1] oktan – 2 – karboxylát, izolovatelný z listů jihoamerického stromu koka (*Erythroxyloncoca*).²⁸

V minulosti byl dokonce používán jako lokální anestetikum, ale kvůli jeho silné návykovosti a značné toxicitě se od jeho užívání postupně upustilo. Za počáteční centrální stimulaci a euforii je zodpovědný kokain tím, že v CNS blokuje zpětný přenos katecholaminů do nesynaptických neuronů, a tím dojde ke zvýšení koncentrace těchto neurotransmiterů v synaptických štěrbinách. Lokální anestetické účinky jsou způsobeny omezením dráždivosti volných nervových zakončení periferií a dále bráněním depolarizací buněčných membrán, čímž blokuje vedení vzruchu neuronem.²⁹

Po celém světě je kokain jednou z široce používaných ilegálních látek, rychle nabírající na popularitě. Podle zpráv OSN (Organizace spojených národů) v roce 2007 se odhadovalo kolem 14,3 miliónů lidí užívajících kokain (mezi 15 a 64 lety věku), což odpovídá 0,3% z celkové populace. Užívání kokainu v posledních letech významně vzrostlo, především v Evropě a v zemích Západní Afriky, ale oba kontinenty ve spotřebě kokainu výrazně zaostávají za Severní Amerikou.³⁰

V souvislosti se zneužíváním kokainu lze zachytit jeho stopy na bankovkách.

Hmotnostní spektrometrie zaujímá v této době základní postavení v analýze kokainu na kontaminovaných bankovkách. Mezi nejpoužívanější kombinované metody v analýze kokainu, mající za společný základ hmotnostní spektrometr řadíme GC/MS, LC/, DESI/MS a TD/APCI/MS.

V posledním desetiletí demonstrovalo několik studií kontaminaci oběživa anglických liber (£), eur (€) a amerických dolarů (\$), což způsobilo veliký zájem médií a rozruch ve společnosti. Samotná podstata kontaminace by přitom neměla být zvlášť udivující, neboť logickou úvahou ji lze předpokládat. Peníze jsou totiž základním pojítkem mezi dealery a uživateli, protože jsou při obchodu za drogu vyměňovány. Navíc většina uživatelů kokainu používá samotnou bankovku k čichání této drogy, čímž způsobí přímou kontaminaci měny. Do roku 1994 bylo publikováno pouze několik málo prací, týkající se analytických metod pro stanovení kokainu na bankovkách, ale jejich počet významně vzrostl v letech 1994-2003 a

2005-2007. Rostoucí zájem může být způsoben snahou demonstrovat možnosti nové instrumentace, spolu s popularitou kokainu po celém světě.³¹

Vývoj MS metod pro stanovení kokainu na bankovkách

Z obecného hlediska lze shrnout vývoj MS metod do několika mezníků. Prvním mezníkem ve vývoji analýzy drog na bankovkách je použití plynové (GC) a kapalinové (LC) chromatografie pro stanovení kokainu na papírových penězích. Druhý mezník dramaticky přispěl k redukci potřebného času analýzy díky zavedení screeningových technik, jako např. TD/MS/MS (Thermal Desorption/Tandem Mass Spectrometry). Tato metoda zlepšila produktivitu forenzních laboratoří snížením času analýzy a přípravy vzorku. Za poslední mezník v analýze kokainu je považováno zlepšení přístrojového vybavení. Díky použití chromatografických technik v kombinaci s MS/MS (GC/MS/MS nebo LC/MS/MS) se přispělo ke zvýšení citlivosti, meze detekce, meze stanovitelnosti a dalších parametrů. Tím se tyto techniky staly vhodné pro kvalitativní, nebo kvantitativní analýzu kokainu na bankovkách při stopových množstvích.^{32,33,34,35,36,37}

Možnosti odběru kokainu z bankovek

Metod pro odběr kokainu bylo vyzkoušeno hned několik. Mezi nejpoužívanější metody patří vakuový odběr, přímá termální desorpce (TD), extrakce kapalina/kapalina a extrakce pevnou fází (SPE).

➤ Vakuový odběr

Odběr tímto způsobem probíhá pomocí přenosného vysavače tak, že se analyt zachytí na malém filtru (křemenný, potažený vrstvičkou dikyanoallyl silikonovou gumou)³⁸, umístěném na konci hadice. Vakuové techniky umožňují odběr vzorku přímo na místě potřeby, ale účinnost odstranění kokainu z bankovky je nízká, a tak bývá odběr považován za semi-kvantitativní. Výhodou metody je, že se vyhýbá přímé manipulaci se vzorkem, a tím omezuje možnost kontaminace vzorku během přepravy do laboratoře.

➤ Přímá termální desorpce (Direct Thermal Desorption - TD)

Tato technika je asi 1000 x citlivější, než odběr vakuovým systémem, neboť desorbuje i kokain rozpuštěný v mastnotě prstu, která je hluboko ve vláknech bankovky. Konstrukčně se jedná o dvě kovové desky zahřáté na 285 °C a přenosovou trubici.³⁸ Mezi vyhřáté kovové

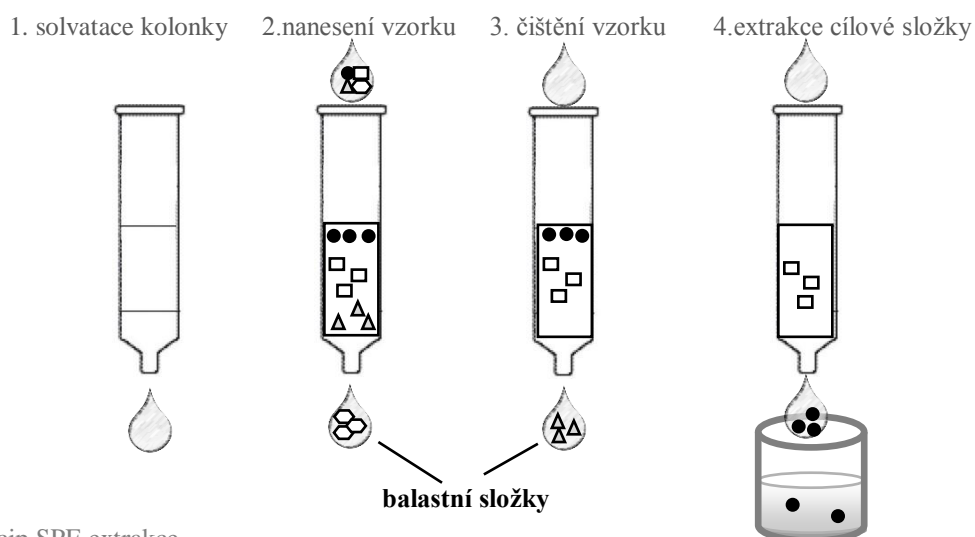
desky se vkládá bankovka po dobu 1s, kdy je materiál zbaven těkavých složek a následně dochází k chemické ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). V plynné fázi jsou přechody prekurzorový ion/produktový ion monitorovány a přítomnost sloučeniny je indikována zvýšením odezvy odpovídající těmto přechodům.

➤ Extrakce kapalina/kapalina

Jedná se o velmi efektivní extrakce za použití organických rozpouštědel nebo zředěných kyselin. Jeden z prvních postupů extrakce kokainu z amerických dolarů využívající organického rozpouštědla byl založen na extrakci chloroformem v centrifuze.³⁹ Jako účinná rozpouštědla se využíval i methanol, acetonitril a ethanol. Stejných postupů bylo použito také při analýze kokainu na eurech, kde se k extrakci používal methanol. Extrakce kokainu metanolem se ukázala jako velmi šetrná k extrahované bankovce.^{35,36}

➤ Extrakce pevnou fází (Solid-PhaseExtraction - SPE)

SPE (Obr. 8) bývá často kombinována s extrakcí kapalina/kapalina za účelem odstranění nežádoucích látek, jako jsou barvy, oleje, tuky nebo kosmetické výrobky. Výhodou oproti extrakci kapalina/kapalina je nízká spotřeba rozpouštědla. Analyt je přečišťován od balastních látek jeho promýváním na pevné fázi, kde se sorbuje. Po přečištění následuje eluování analytu z pevné fáze vhodným rozpouštědlem a takto přečištěný vzorek představuje menší riziko chyby při následujícím stanovení. SPE umožňuje díky smíšenému režimu separací (např. obrácené fáze a ionex) maximální selektivitu pro extrakci kyselin, neutrálních látek i zásad, a tak je vhodná pro cílený screening a potvrzení prakticky všech kategorií drog.⁴⁰



Obr. 8 - princip SPE extrakce

Analytické metody

Analytické metody vhodné pro zjištění kontaminace kokainu na bankovkách, které jsou publikovány, mohou být děleny do dvou základních skupin. Do první skupiny se řadí kolonové separační metody GC, LC ve spojení s MS a do druhé potom metody analyzující bankovky přímo – TD/MS/MS, DART/MS, DESI/MS.

➤ Plynová chromatografie (GasChromatography - GC)

Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) je nejčastěji používanou metodou pro stanovení kokainu na bankovkách. Mimo tuto kombinaci s MS lze kombinovat GC také s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC/MS/MS) a jinými detekčními systémy.

Hmotnostní spektrometry zpravidla využívají při analýze kokainu ionizaci elektronem, ale i chemické ionizace.³⁵ V posledních letech byla pro zvýšení citlivosti měření zavedena tandemová hmotnostní spektrometrie.³⁶ Podle studie Armenty a de la Guardia poskytuje metoda GC/MS/MS LOD (limit detekce) 0,15 ng/bankovku, opakovatelnost, jako relativní směrodatná odchylka pěti nezávislých měření standardu kokainu (1 ng/ml) je 6% a frekvence analýzy 4/h za použití pouze 20,5 ml methanolu na vzorek. Dále studie poskytla při úrovni 100 µg a 10 µg na bankovku výtěžky 101 ± 2 % a 98 ± 3 %. Je tedy patrné, že GC/MS/MS poskytuje citlivou a selektivní metodiku stanovení kokainu na bankovkách.⁴¹

➤ Kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS)

První použití LC/MS pro kvantifikaci kokainu na bankovkách bylo publikováno Jourdanem a Donellym v roce 1995.³³ Autoři použili pro screening kokainu na US dolaru (\$) IMS (iontová mobilní spektrometrie) a v pozitivním případě byl kokain kvantifikován pomocí LC/MS nebo GC/MS za použití standardu.

Metodika založená na LC/MS/MS byla vyvinuta pro analýzu kokainu na irských bankovkách. Pro separaci kokainu od dalších látek přítomných v matici byla použita mobilní fáze, připravená z roztoku octanu amonného (pH 4,5) a methanolu a dvě různé kolony. V této studii bylo výhodnější použít 20 cm monolitickou kolonu, která poskytovala vyšší počet teoretických pater při akceptovatelném průtoku mobilní fáze a měla vyšší celkovou kapacitu, než 10 cm monolitická kolona (umožňuje zvýšit injekční objemy pro stopovou analýzu).

Opakovatelnost, určena prováděnými šesti opakovanými nástřiky 0,1mg/l roztoku standardu, byla 3,7%, zatímco reprodukovatelnost, zkoušena za použití šesti individuálně připravených 0,5mg/l roztoku analytu, byla 4,9 %. LOD a LOQ (mez stanovení) byly 4 pg/bankovka a 14 pg/bankovka. Výtěžnost získaná z výše uvedeného postupu byla 87 ± 8 %. Eluční čas kokainu byl za uvedených podmínek 10 minut.³⁶

Hlavní nevýhodou této metody a obecně metod založených na LC/MS či GC/MS je příprava vzorku a doba analýzy, v porovnání s přímými metodami, jakou je TD/MS/MS.

➤ Termální desorpce v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (TD/MS/MS)

TD/MS/MS je druhou nejpoužívanější metodou pro analýzu kokainu na bankovkách. Technika je při odhalování „špinavých peněz“ velmi rychlá a citlivá, ale často nedochází k rozeznání peněz z obecného oběhu a tzv. „peněz drogových“. TD/MS/MS má tu výhodu, že se vzorek jednoduše připraví buď odběrem vakuovým systémem nebo je kokain přímo desorbován z bankovek do zdroje hmotnostního spektrometru. Uvolněný kokain z filtru vakuového systému poskytuje intenzivní signál protonovaných molekul (m/z 304) a byly sledovány specifické iontové přechody v plynné fázi (m/z 304 na m/z 182 a m/z 304 na m/z 105). Metoda poskytuje vysokou citlivost a krátkou dobu analýzy, takže může být ve 4 minutových intervalech analyzováno až 50 bankovek. LOD této techniky závisí na celkovém množství desorbovaného materiálu, který může ovlivnit ionizaci přítomných látek, ale zpravidla je nižší než 1 ng. Je třeba podotknout, že i když metoda TD/MS/MS umožňuje analýzu velkého množství bankovek v krátkém čase, její hlavní nevýhodou je ne zcela efektivní desorpce, a proto neposkytuje přesný odraz kontaminace bankovek kokainem.⁴⁰

B) Ostatní drogy

I když je v dnešní době mezi dealery a uživateli drog velmi populární právě zmíněný kokain, lze pozorovat kontaminaci bankovek i jinými drogami. Tato skutečnost vyplývá z výše uvedených statistik z roku 2005 (viz 2.3.3.1). Nejedná se ovšem pouze o THC, PCP, LSD, extázi nebo heroin, ale i látky podobné amfetaminům např. ritalin (MPH-methylfenidát) a prokain, což je anestetikum, používané drogovými dealery jako příměs kokainu.

Tyto dvě látky byly analyzovány pomocí techniky DART/MS s hmotnostním analyzátozem AccuTOF (Obr. 9) na 1\$ bankovkách a obě složky byly detekovány jako ionty $[M+H]^+$.²⁰



Obr. 9 - analýza bankovek pomocí DART/MS s AccuTOF (převzato z cit.²⁰)

K odběru vzorku regulované látky z bankovek můžeme použít stejných postupů, jako tomu bylo u analýzy kokainu tj. vakuový odběr, extrakce rozpouštědlem nebo přímá termální desorpce aj. Pokud je použit vakuový odběr, lze zjistit stopy regulovaných látek nejčastěji technikou IMS nebo APCI/MS². Ačkoliv je extrakce kapalina/kapalina pracná a časově náročná, byla použita u analýzy kanadských bankovek. Postup byl založen na máčení bankovek v ethanolu s následnou extrakcí kapalina/kapalina a detekcí GC/MS. SPE extrakce bývá také často používána díky své jednoduchosti, citlivosti a specifitě. Jednotlivé bankovky jsou extrahovány methanolem nebo zředěnou kyselinou chlorovodíkovou s následným přidáním srážedla, SPE extrakcí a GC/MS detekcí.⁴²

Z uvedeného lze vyvodit dva možné způsoby analýzy bankovek pomocí MS, které byly testovány v praktické části kvalifikační práce. Jedná se o přímou analýzu bankovek, resp. látek přítomných na povrchu bankovky desorpcí a analýzu extraktu z bankovek.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Pro veškerá měření sloužil hmotnostní spektrometr s iontovou pastí (LCQ DUO, Thermo Finnigan, San Jose, USA) a dvěma iontovými zdroji, elektrosprejem (ESI) a desorpčním nanoelektrosprejem (nanoDESI^{43,44}).

Byly analyzovány celkem čtyři bankovky o nominální hodnotě 50 Kč z běžného oběhu, přičemž k analýze povrchu bankovek byl jako iontový zdroj použit desorpční nanoelektrosprej (nanoDESI) a k analýze extraktu z bankovek elektrosprej (ESI).

Za modelovou látku byl k analýze zvolen kofein, obsažený v espressu, uvařeném v den měření na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého, a kokain.

Pro přípravu sprejovací kapaliny a extrakčního činidla bylo použito vody kvality pro HPLC (Milli-Q Water Purification System, Millipore, Bedford, USA), methanolu (HPLC gradient grade, Merck, Praha), kyseliny mravenčí p.a. a kyselin octové p.a. (Sigma-Aldrich, Praha).

3.2 Pracovní postup

Nejprve byla připravena sprejovací kapalina pro techniku nanoDESI tvořená okyselenou směsí methanol:voda v poměru 1:1 (v/v). K okyselení byla použita kyselina mravenčí. Sprejovací kapaliny bylo připraveno 5 ml smícháním 2,4 ml destilované vody, 2,5 ml methanolu a 100 µl kyseliny mravenčí.

Pro analýzu extraktu bankovek pomocí ESI bylo připraveno 200 ml extrakčního činidla smícháním 198 ml methanolu a 2 ml kyseliny octové.

Před analýzou vlastních bankovek a jejich extraktů bylo pro ověření přítomnosti analytu nanaseno na zdrsňené sklíčko 5 µl kávy a následně analyzováno pomocí nanoDESI. Stejným způsobem byl analyzován roztok kokainu o hmotnostní koncentraci 10 mg/l.

Dvě ze čtyř bankovek byly kontaminovány uvařenou kávou (Obr. 10) a nechaly se uschnout. Jedna z kontaminovaných bankovek byla použita k extrakci (Obr. 11) a druhá k přímé analýze. Zbylé dvě nekontaminované bankovky sloužily jako slepé pokusy (blank) u jednotlivých způsobů měření.

K extrakci bylo použito dvou Erlenmayerových baňek, do kterých se kontaminovaná bankovka a srovnávací bankovka složily a následně bylo přidáno do každé baňky 100 ml extrakčního činidla. Za průběžného třepání byl extrakt z kontaminované a srovnávací bankovky odebíráán do mikrozkuhavek (eppendorfek) po 1 ml v časových intervalech 10, 20, 30, 60 a 120 minut. Následně byly analyzovány jednotlivé vzorky extraktu s využitím ESI.

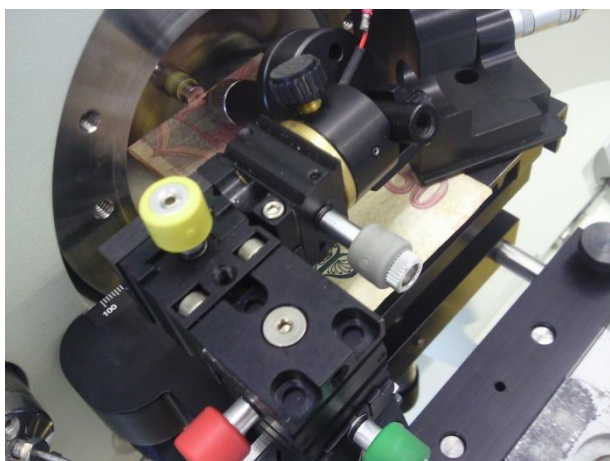


Obr. 10 – kávou kontaminované bankovky.

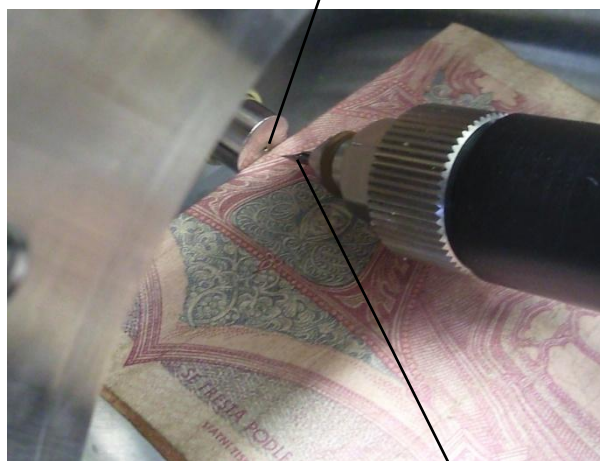


Obr. 11 – extrakce bankovek směsí methanol : kyselina octová.

Přímá analýza bankovek byla prováděna s využitím iontového zdroje nanoDESI. Iontový zdroj obsahuje modifikovanou sprejovací část s kovem pokrytou sprejovací kapilárou (Pico Tipemitter Glass Tip, ID = $2 \pm 1 \mu\text{m}$; New Objectiv, Woburn, USA). Před zahájením vlastní analýzy byla kapilára naplněna sprejovací kapalinou, bankovka připevněna oboustrannou lepící páskou k podložnímu sklíčku a umístěna mezi nanoDESI a vstup do hmotnostního spektrometru.



Obr. 12 – MS analýza bankovky s využitím nanoDESI



Obr. 13 – detail nanoDESI

sprejovací kapilára

K přímé analýze kokainu na bankovkách pomocí nanoDESI byly připraveny roztoky o hmotnostní koncentraci 200, 20 a 10 mg/l kokainu postupným ředěním 2 mg kokainu methanolem. Pro analýzu bylo ke kontaminaci bankovky použito 5 μ l roztoku o koncentraci kokainu 20 a 200 mg/l. Vlastní analýza probíhala stejným způsobem jako u nanoDESI analýzy kofeinu na bankovkách.

3.3 Experimentální podmínky

Ionizace elektrosprejem (ESI) – Jako zamlžovací plyn byl použit N_2 . Napětí na sprejovací kapiláře bylo +5,6 kV. Měření bylo prováděno při teplotě vyhřívané kapiláry 200 °C a napětí 24 V.

Desorpční nanoelektrosprej (nanoDESI) – Hodnoty napětí sprejovací kapiláry 3 kV, teplota a napětí vyhřívané kapiláry bylo stejné, jako v předešlém případě.

V obou případech byla iontová optika nastavena s použitím automatického ladění, která je součástí ovládacího softwaru.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Analýza kofeinu

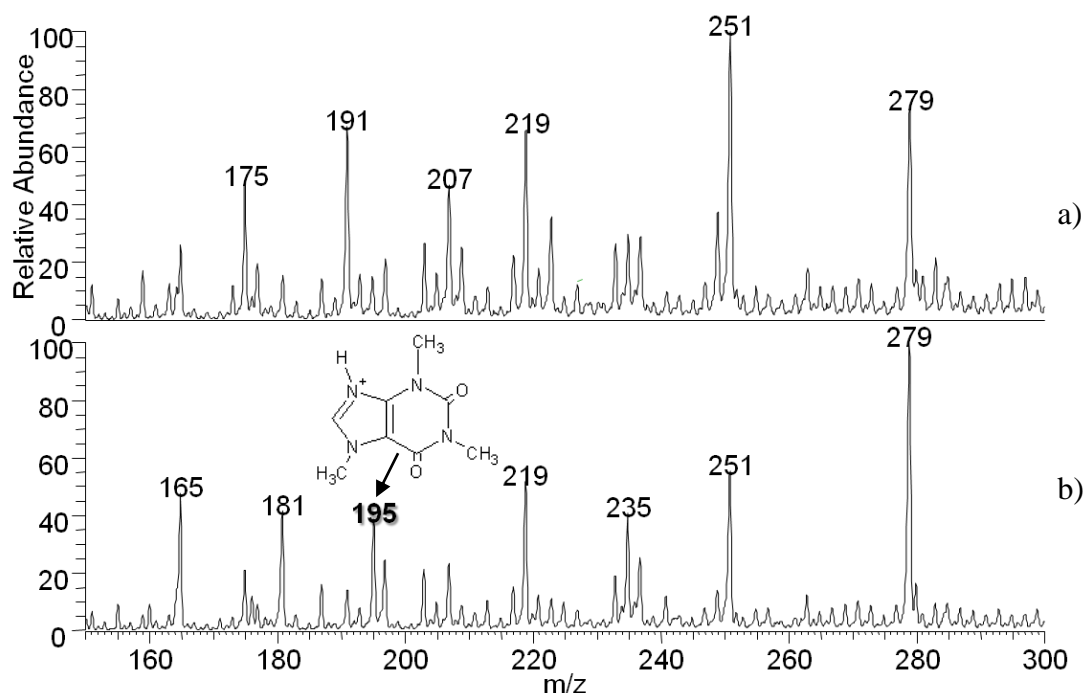
a) ionizace elektrosprejem (ESI)

Při analýze extraktů bankovek byla sledována závislost intenzity signálu iontu $[M+H]^+$ kofeinu o hodnotě m/z 195, na době extrakce (Tab I).

Tabulka I - naměřené hodnoty intenzity signálu iontu m/z 195 v závislosti na době extrakce

doba extrakce (min)	intenzita signálu iontu m/z 195 (průměr z 232 spekter)
10	$3,31 \cdot 10^5$
20	$9,13 \cdot 10^4$
30	$3,31 \cdot 10^5$
60	$1,46 \cdot 10^5$
120	$2,37 \cdot 10^5$

Naměřené hodnoty intenzity signálu iontu m/z 195 v závislosti na době extrakce se příliš neodlišovaly a lze konstatovat, že při době extrakce delší než 10 minut se její výtěžek nemění. I když bylo k extrakci analytu použito velkého objemu rozpouštědla (100 ml), byla pořizená spektra relativně snadno interpretovatelná.



Obr. 14 – ESI/MS spektrum extraktu bankovky po 60 min: a) srovnávací bankovka, b) kontaminovaná bankovka

Jak je patrné z hmotnostních spekter extraktu bankovky (Obr. 14), obsahují tato spektra kromě píky $[M+H]^+$ iontu kofeinu o hodnotě m/z 195 také píky odpovídající ftalátům, jež se používají jako změkčovadla plastických hmot, dalším nečistotám či klastrům rozpouštědla a složkám kávy. Ftaláty se mohly uvolňovat při přípravě vzorků z eppendorfek či pipetovacích špiček. Porovnáním spekter Obr. 14a a 14b mohou být nečistotám a klastrům přiřazeny píky o hodnotě m/z 175, 191, 207, 219, 251 a 279. Naproti tomu lze předpokládat, že intenzivnější píky, které spektrum 14b navíc obsahuje oproti spektru 14a, odpovídají doprovodným látkám pressa. Jsou to zřejmě ionty o hodnotě m/z 165, 181 a možná i 235.

b) desorpční nanoelektrosprej (nanoDESI)

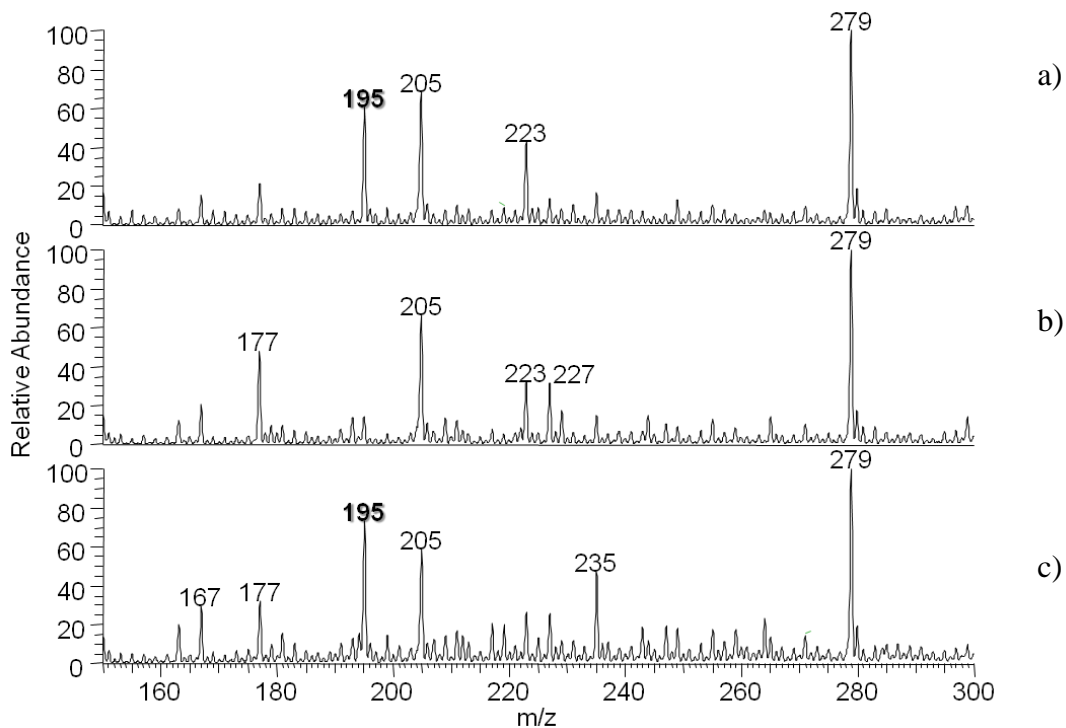
Kontaminovaná bankovka byla analyzována za použití nanoDESI na přítomnost kofeinu z více míst jejího povrchu, přičemž byla sledována intenzita signálu $[M+H]^+$ iontu kofeinu o hodnotě m/z 195. Pro ověření desorpce analytu technikou nanoDESI byl vzorek pressa nejprve desorbován ze zdrsňeného sklíčka (standardně používaný povrch). (Tab. II).

Tabulka II - naměřené hodnoty intenzity signálu iontu m/z 195

analyzovaný povrch	intenzita signálu iontu m/z 195		průměrná intenzita
	1. měření	2. měření	
zdrsňené sklíčko	$9,66 \cdot 10^4$	$6,87 \cdot 10^4$	$8,27 \cdot 10^4$
bankovka-barevná část	$9,45 \cdot 10^2$	$2,26 \cdot 10^2$	$5,86 \cdot 10^2$
bankovka-bílá část	$1,27 \cdot 10^5$	$9,52 \cdot 10^4$	$1,11 \cdot 10^5$

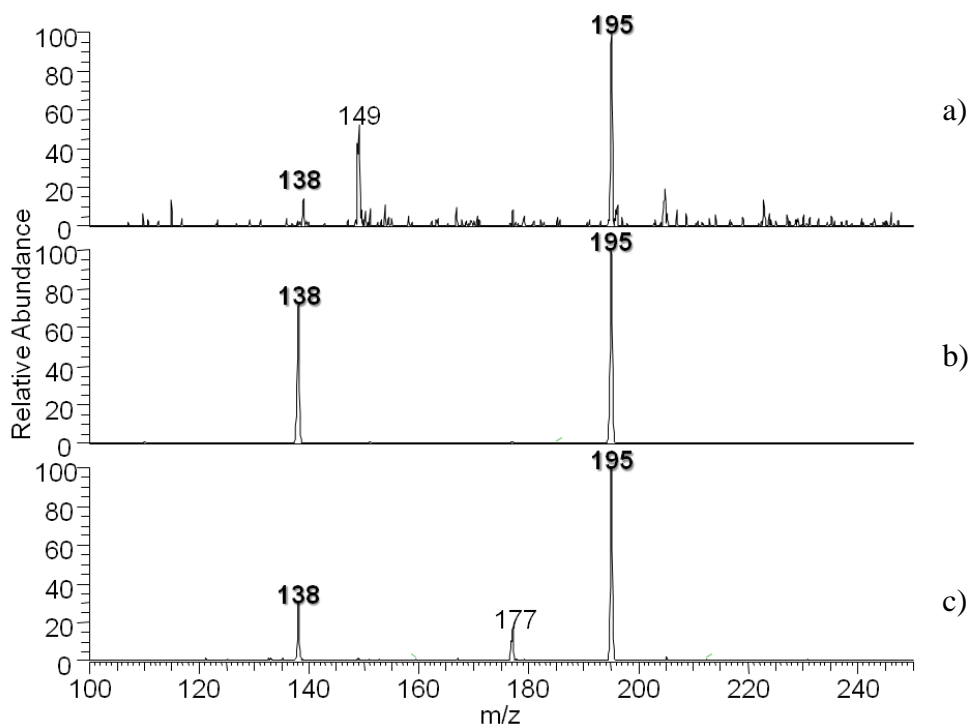
Intenzita signálu iontu kofeinu o m/z 195 byla při desorpci z různých míst bankovky odlišná. Dle výsledků nelze tvrdit, že by desorpce analytu probíhala lépe z bílé části bankovky, než-li z barevné, neboť musí být zohledněna homogenita pokrytí kontaminovanou látkou. Pro objektivní posouzení závislosti desorpce na místě bankovky by musely být provedeny další experimenty.

Jak ionizační technika ESI, tak i nanoDESI mohou být při analýze bankovek využity. S využitím ESI lze analyzovat veškeré látky, které jsou na bankovce či v ní obsaženy. Pro potřebu analýzy pouze části bankovky (neznámou skvrnu na bankovce) je vhodnější využít nanoDESI, a tak prokázat chemické složení lokalizované stopy na povrchu nebo se vyvarovat většímu rušivému vlivu ostatních látek.



Obr. 15 – nanoDESI/MS spektrum: a) káva na skle, b) srovnávací bankovka, c) bankovka s kávou (barevná část)

Pro potvrzení/vyvrácení přítomnosti analytu byla provedena fragmentace mateřského iontu. U kofeinu odpovídal fragment hodnotě m/z 138 (Obr 16).



Obr. 16 – Fragmentační MS spektrum mateřského iontu kofeinu m/z 195: a) nanoDESI káva na skle, b) ESI extrakt z bankovky (60 min), c) nanoDESI bankovka

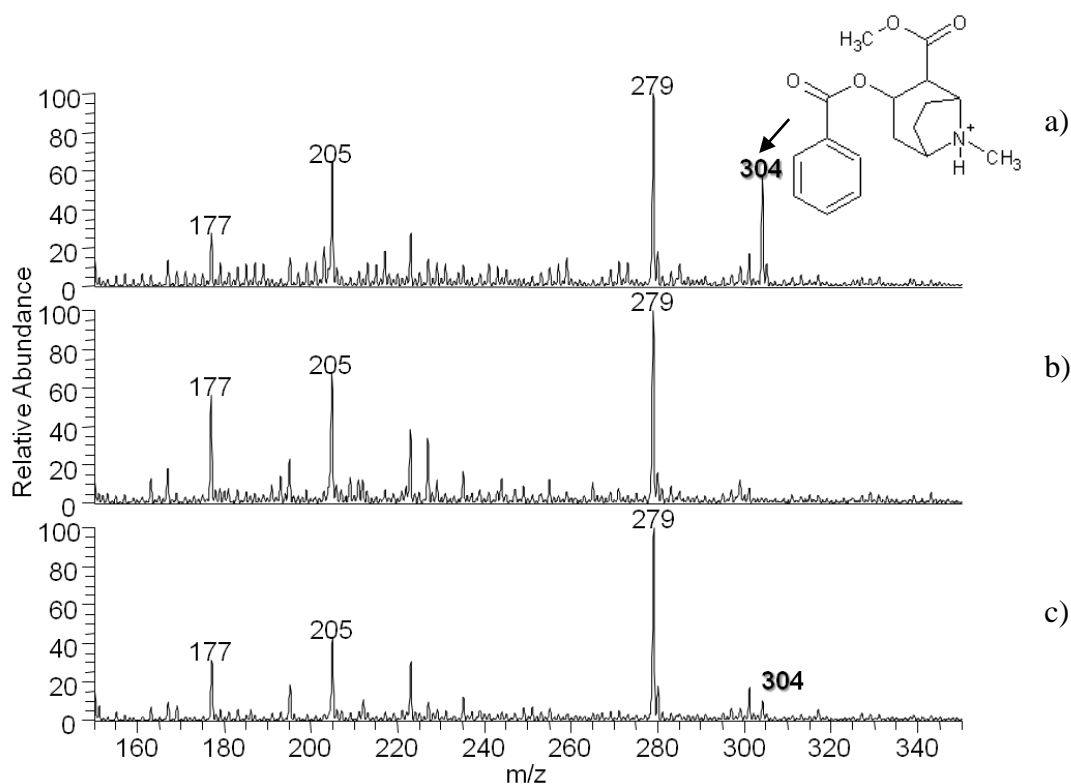
4.2 Analýza kokainu

Obdobně, jako u analýzy kofeinu desorpčním nanoelektrosprejem byla u analýzy kokainu za použití téhož iontového zdroje sledována intenzita signálu protonované molekuly kokainu o hodnotě m/z 304.

Intenzita signálu mateřského iontu m/z 304 byla při analýze bankovky, kontaminované roztokem kokainu o koncentraci 20 mg/l relativně nízká a ve spektru byl pík, odpovídající analytu v oblasti šumu. Proto byla ke kontaminaci použita koncentrace roztoku kokainu 200 mg/l.

Tabulka III - naměřené hodnoty intenzity signálu iontu m/z 304 při nanášených objemech roztoku kokainu 5 μ l

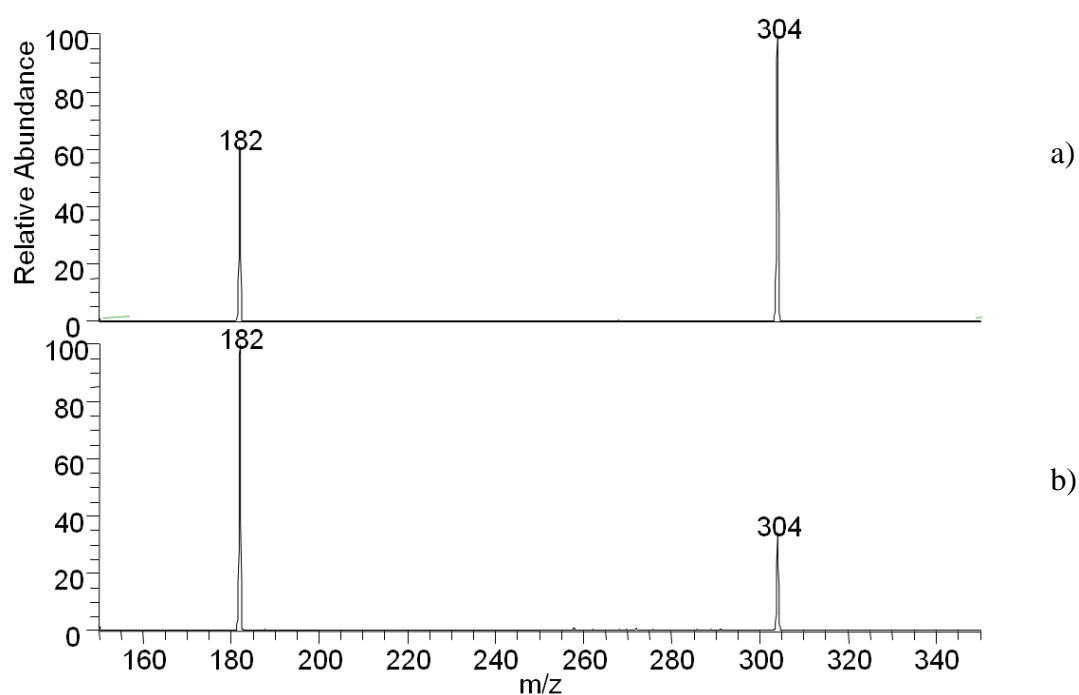
analyzovaný povrch	c_{kokain} (mg/l)	intenzita signálu iontu m/z 304			průměrná intenzita
		1. měření	2. měření	3. měření	
zdrsněné sklíčko	20	$1,82 \cdot 10^5$	$8,79 \cdot 10^4$	$8,80 \cdot 10^4$	$1,19 \cdot 10^5$
bankovka	200	$1,84 \cdot 10^4$	$3,46 \cdot 10^4$	$2,83 \cdot 10^4$	$2,71 \cdot 10^4$



Obr. 17 – nanoDESI/MS spektrum: a) kokain na skle (10mg/l - 5 μ l), b) srovnávací bankovka, c) kontaminovaná bankovka (200 mg/l – 5 μ l)

Z výsledků lze usuzovat, že z povrchu bankovky je analyt hůře desorbován, poskytuje tedy nižší intenzitu signálu, než je tomu při desorpci ze zdrsňeného sklíčka. Je nutné zmínit fakt, že intenzita signálu iontu m/z 304 při analýze bankovky, kontaminované roztokem o koncentraci kokainu 200 mg/l, byla přibližně srovnatelná s intenzitou desorbovaných iontů z povrchu zdrsňeného sklíčka, kde byl nanesen roztok o koncentraci 10 mg/l. Horší desorpce analytu z povrchu bankovky může být zapříčiněna např. sorpcí analytu na vláknech bankovky, její smáčivostí apod.

Potvrzení přítomnosti analytu bylo realizováno změřením fragmentačního spektra mateřského iontu kokainu o m/z 304. Ve spektru bylo možné pozorovat fragment o m/z 182 (Obr 18).



Obr. 18 - spektrum mateřského iontu m/z 304 a jeho fragmentu: a) kokain na skle, b) kokain na bankovce

5. ZÁVĚR

Hmotnostní spektrometrie přináší významné informace při vyšetřování trestných činů. Představuje dnes jeden ze základních nástrojů forenzní chemie a je užitečná při analýze nejrůznějších typů vzorků, např. automobilové laky, výbušniny, drogy. Jedním z možných uplatnění hmotnostní spektrometrie v oblasti analýzy drog je jejich detekce na površích včetně povrchu bankovek. Kromě separačních metod GC a LC ve spojení s MS nacházejí uplatnění techniky hmotnostní spektrometrie umožňující přímou analýzu bankovek, např. DART/MS, DESI/MS, TD/MS.

Do skupiny uvedených desorpčních technik se řadí modifikace desorpčního elektrospreje tzv. desorpční nanoelektrosprej. V případě kontaminace bankovek kofeinem (stopa kávy) se ukázalo, že analýzu lze dobře provést extrakcí kofeinu a následnou přímou analýzu extraktu elektrosprejem, což dovoluje získat přehled o látkách přítomných na bankovce jako celku. V případě sledování stopy na konkrétním místě bankovky je nutné použít desorpční techniku, která cíleně desorbuje a ionizuje látky z omezené (sledované) plochy bankovky. Desorpční nanoelektrosprej se jeví jako jeden z vhodných přístupů. Kromě analýzy kofeinu byly možnosti jeho aplikace potvrzeny pilotními experimenty zaměřenými na zjištění přítomnosti kokainu na bankovce.

NanoDESI oproti ESI nevyžaduje zpracování vzorku a nabízí zaměření analýzy na konkrétní stopu na povrchu (nemusí jít nutně pouze o bankovku a stopu drogy na ní). Naopak ESI ve spojení s vhodnou předpravou vzorku může dosáhnout nižších mezí detekce, např. v důsledku odstranění matričních efektů, a poskytnout informaci o celém vzorku (bankovce), kdy by postupné proměňování povrchu pomocí nanoDESI bylo značně časově náročné.

Na úvodní pokusy lze navázat podrobnější studií vlivu povrchu bankovky na desorpci/ionizaci, studiím vlivu sprejovací kapiláry na zvýšení intenzity signálu případně zhodnocením možností kvantitativní analýzy při použití vnitřního standardu (přídavek známého množství na povrch bankovky).

6. CITACE

1. Sojka M. : Diplomová práce. Univerzita Masarykova, Brno 1 (2006).
2. Chisum W. J., Turvey B. : *Journal of Behavioral Profiling* 1, 1 (2000).
3. Moeller M. R., Fey P. , Sachs H. : *ForensicSci. Int.* 63 , 43 (1993).
4. Ho, Mat H. : *Analytical Methods in Forensic Chemistry*, New York (1990).
5. Bell S. : *Forensic chemistry*, Prentice Hall (2005).
6. Kulhánek J. : Bakalářská práce. Vysoké učení technické, Brno 11 (2008)
7. Wampler T. P., Bishea G. A., Simonsick W. J. : *J. Anal. Appl. Pyrolysis*40-41, 79 (1997)
8. De Gelder J., Vandenabeele P., Govaert F., Moens L. : *J. Raman Spectrosc.* 36, 1059 (2005)
9. Hobbs A. L., Almirall J. R. : *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 1265 (2003)
10. Štulová K. : Bakalářská práce. Univerzita Masarykova, Brno (2010)
11. Šesták J. : Bakalářská práce. Vysoké učení technické, Brno (2009)
12. Štulík K. a kol. : *Analytické separační metody*, Praha (2004).
13. Klouda P. : *Moderní analytické metody*, Ostrava (2003).
14. Takats Z., Wiseman J. M., Cooks R. G. : *Science* 306, 471-3 (2004).
15. Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K. : *Chem. Listy* 101, 524 (2007).
16. Vidová V., Lemr K., Havlíček V. : *Chem. Listy* 102, 957 (2008).
17. Rázgová E. : *VESMÍR* 78, 445 (1999).
18. Stursa P., Junková P., Strejček M., Macek T., Macková M. : *LCaŘ* 126, 412 (2010).
19. Weston D. : *J. Analyst* 135, 661-668 (2010).
20. Paradis : *D. RCMP Gas.* 59, 20 (1997).
21. Cody R.B., Laraméc J.A., Nilles J.M., Durst H.B. : *JEOL News* 40, 8 (2005).
22. Boháč M., Ingendoh A., Fuchser J., Witt M. : *Chem. Listy* 99, 943-951 (2005).
23. Hu Q., Noll R. J., Li H., Makarov A., Hardman M., Cooks G. R. : *J. Mass Spectrom.* 40, 430-443 (2005).
24. JehudaYinon : *Advances in forensic applications of mass spectrometry*, Washington, D.C. (2004).

25. Wells J. M., Roth M. J., Keil A. D., Grossenbacher J. W., Justes D. R., Patterson G. E., Barket Jr. B. J. : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 1419 (2008).
26. David E. Newton : *Forensic chemistry*, New York (2007).
27. Carter J. F., Sleeman R., Parry J. : *ForensicSci. Int.* 132, 106 (2003).
28. Hampl F., Rádl S. , Paleček J. : *Farmakochemie*, Praha (2007).
29. Alberts A., Mullen P. : *Psychoaktivní rostliny, houby a živočichové*, Praha (2002).
30. http://www.unodc.org/pdf/research/wdr07/WDR_2007.pdf , 19.11.2010.
31. Sleeman R., Burton I. F. A., Carter J. F, Roberts D. J., Hulmston P., *Anal. Chem.* 72, 397 (2000).
32. Aaron R., Lewis P. : *CrimeLab. Digest* 14, 1 (1987).
33. Jourdan T. H., Donnelly B. F. : *Proc. Counterdrug Law Enforcement: Applied Technology for Improved Operational Efectiveness International Technology Symposium*, Nashua, NH, USA, (1995).
34. Roberts D. J., Carter J. F., Sleeman R., Burton I. F. A. : *Spectrosc. Eur.* 9, 20 (1997).
35. Esteve-Turrillas F. A., Armenta S., Moros J., Garrigues S., Pastor A., de la Guardia M. : *J. Chromatogr.* 321, 1065 (2005).
36. Bones J., Macka M., Paull B. : *Analyst (Cambridge, U.K.)* 132, 208 (2007).
37. Keil A., Talaty N., Janfelt C., Noll R. J., Gao L., Ouyang Z., Cooks R.G. : *Anal. Chem.* 79, 7734 (2007).
38. Sleeman R., Burton F., Carter J. F., Roberts D. J. : *Analyst* 124, 103 (1999).
39. Song D. M., Zhang S. D., Kohlhof K. : *J. Chromatogr.* 355, 731 (1996).
40. Xu Y. H., Gao Y., Wei H., Du Y., Wang E. : *J. Chromatogr.* 260, 1115 (2006).
41. Armenta S., de la Guardia M. : *TrendsAnal. Chem.* 27, 344 (2008).
42. Sleeman R., Burton F., Carter J., Roberts D., Hulmston P. : *Anal. Chem.* 397, 403 (2000).
43. Hartmanova L., Ranc V., Papouskova B., Havlicek V., Lemr K. : *J. Chromatogr.* 1217, 4223-4228 (2010).
44. Ranc V., Havlicek V., Bednar P., Lemr K. : *Chem. Listy* 101, 524-529 (2007).

7. SEZNAM ZKRATEK

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

CI – chemická ionizace

CNS – centrální nervová soustava

DART – přímá analýza v reálném čase

DESI – desorpční elektrosprej

nanoDESI – desorpční nanoelektrosprej

DNT – 2,4-dinitrotoluen

ECD – detektor elektronového záchytu

EI – ionizace elektronem

ESI – ionizace elektrosprejem

GC – plynová chromatografie

ICP – indukčně vázané plazma

IMS – iontová mobilitní spektrometrie

IT – iontová past

LA – laserová ablace

LC – kapalinová chromatografie

LOD – limit detekce

LOQ – mez stanovení

LSD – diethylamid kyseliny lysergové

M – magnetický hmotnostní analyzátor

MALDI – desorpce ionizace laserem za asistence matrice

MS – hmotnostní spektrometrie

MSⁿ – hmotnostní spektrometrie n-tého stupně

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

OSN – Organizace spojených národů

PCP – fencyklidin

PENT – pentlit

Q – kvadrupólový analyzátor

RDX – hexogen

SPE – extrakce pevnou fází

TD – přímá termální desorpce

THC - tetrahydrokanabinol

TOF – průletový analyzátor

TNT – 2,4,6-trinitrotoluen