

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra analytické chemie**

**STUDIUM IONIZACE OPIÁTŮ  
PRO HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU  
ANALÝZU VZORKU MOČI**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Lucie Borovcová

Studijní obor:

N 1407 analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph. D.

**Olomouc 2012**

## SOUHRN

Diplomová práce se zaměřuje na zhodnocení elektrospreje (ESI) a nanoelektrospreje (nanoESI) pro ionizaci toxikologicky významných látek, opiátů, pro potřeby hmotnostně spektrometrické analýzy bez chromatografické separace.

V úvodu je nastíněn postup při rutinní forenzní analýze. V další části práce jsou popsány principy některých ambientních ionizačních technik např. desorpčního elektrospreje, desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku, desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku aj. Poté jsou rozebrány konkrétní aplikace ambientních technik např. při analýze nelegálních drog, padělaných léčiv, analýze výbušnin i při přímé analýze z kůže. Poslední kapitola teoretické části diplomové práce se zabývá opiáty a jejich analýzou.

V experimentální části byly analyzovány opiáty pomocí ESI a nanoESI. Technika nanoESI nepatří mezi ambientní ionizační techniky, ale také jako u těchto technik může být využita jednodušší příprava vzorku.

Pro ionizaci vybraných opiátů bylo hledáno vhodné experimentální nastavení hmotnostního spektrometru (např. teplota a napětí na vyhřívané kapiláře, ladění iontové optiky) a následně byla naměřena jejich fragmentační spektra. Srovnání ESI a nanoESI při analýzách zasolených vzorků ukázalo výhody druhého z nich, který byl následně použit pro analýzu vzorků moče. Pro zasolené vzorky morfinu a 6 – acetylmorfinu byly naměřeny kalibrační závislosti a určeny meze detekce. Proměřovaly se také vzorky moče s přísadkou opiátu bez extrakce, po extrakci kapalina – kapalina a po extrakci tuhou fází. Vhodnou pro úpravu vzorku se ukázala poslední možnost. Po SPE byla dosažena mez detekce 0,16 mg/l pro 6 – acetylmorfin a ověřeno, že lze úspěšně prokázat přítomnost 0,1 mg/l morfinu.

## SUMMARY

This thesis is focused on evaluation of electrospray (ESI) and nanoelectrospray (nanoESI) in ionization of toxicologically relevant compounds, opiates, using mass spectrometry without chromatographic separation.

The introduction outlines the procedure for a routine forensic analysis. The next chapter describes the principles of ambient ionization techniques such as desorption electrospray ionization, desorption chemical atmospheric pressure ionization, desorption atmospheric pressure photoionization etc. Some applications of ambient techniques such as analysis of illicit drugs, counterfeit drugs, analysis of explosives and the direct analysis of the skin are discussed in the following chapter. The last chapter of a theoretical part of the thesis deals with the opiates and their analysis.

Opiates using ESI and nanoESI were analyzed. NanoESI is not an ambient ionization technique, but similarly it, can be used with only simple sample preparation.

Basic experimental parameters of mass spectrometry have been setup for ionization of selected opiates (e.g. temperature and voltages on the heated capillary, ion optics) and then their fragmentation spectra have been measured. A comparison of ESI and nanoESI in analyzed samples with NaCl addition has shown advantage the second one that was subsequently used for urine samples analysis. The calibration curves were measured and detection limits determined for salted samples of morphine and 6 – acetylmorphine. Urine samples spiked with opiates were measured firstly without extraction, secondly with liquid – liquid extraction and finally using solid phase extraction. The last possibility was evaluated as useful. Using SPE, limit detection achieved for 6 – acetylmorphine was 0,16 mg/l and it was verified that morphine can be detected at concentration level 0,1 mg/l.



*Děkuji svému vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Karlovi Lemrovi, Ph. D. za jeho obětavost, vstřícnost, cenné rady a čas, který věnoval při zpracování mé práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Lucii Hartmanové za odborné rady a kladný přístup při zpracování experimentální části diplomové práce, toto poděkování patří taktéž RNDr. Petru Fryčákovi, Ph. D.*

*Děkuji Doc. RNDr. Peterovi Ondrovi, CSc. za poskytnuté informace o zpracování vzorků pro toxikologické analýzy.*

*Poděkování patří rovněž mé rodině za jejich podporu po celou dobu mého studia.*

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne .....

.....

# OBSAH

1. ÚVOD .....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1. Forezní vědy .....	2
2.2. Hmotnostní spektrometrie s desorpčí a ionizací za ambientních podmínek .....	4
2.2.1. Desorpční elektrosprej – DESI .....	5
2.2.2. Přímá analýza v reálném čase – DART .....	6
2.2.3. Desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku – DAPCI .....	7
2.2.4. Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku – DAPPI .....	9
2.2.5. Nanoelektrosprej – NanoESI .....	10
2.2.6. Desorpční nanoelektrosprej – NanoDESI .....	11
2.3. Ambientní techniky ve forezních vědách .....	12
2.3.1. Analýza nelegálních drog a padělaných léčiv .....	12
2.3.2. Analýza výbušnin .....	22
2.3.3. Analýza potravin a potravinových příměsí .....	24
2.3.4. Analýza inkoustů, barev a pravosti dokumentů .....	26
2.3.5. Analýza kůže .....	26
2.4. Opiáty .....	28
2.4.1. Metabolismus opiátů .....	29
2.4.2. Předběžné metody pro detekci opiátů .....	29
2.4.3. Analýza opiátů .....	30
2.4.4. Analýza opiátů pomocí ambientních technik .....	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
3.1. Přístroje, chemikálie .....	33
3.2. Pracovní postup .....	34
3.2.1. Postup analýz na přístroji <i>LCQ DUO hmotnostní analyzátor</i> .....	34
3.2.2. Postup extrakce kapalina – kapalina .....	34
3.2.3. Postup extrakce tuhou fází .....	35
3.3. Podmínky ionizace opiátů .....	36
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	37
4.1. Volba vhodných podmínek pro ionizaci vybraných opiátů .....	37
4.2. Fragmentační spektra standardů .....	39
4.3. Měření zasolených vzorků technikou ESI a nanoESI .....	42

4.4.	Kalibrační závislost bez použití značených standardů.....	43
4.5.	Kalibrační závislost pro zasolené vzorky.....	44
4.6.	Analýza moči .....	49
4.6.1.	Analýza moči bez extrakce.....	49
4.6.2.	Analýza moči po extrakci kapalina – kapalina .....	49
4.6.3.	Analýza moči po extrakci tuhou fází .....	51
5.	ZÁVĚR.....	57
6.	LITERATURA .....	59
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	61
8.	PŘÍLOHY.....	63
I.	Fragmentační spektra standardů .....	I
A.	Standard morfin .....	I
B.	Značený standard morfin – D3 .....	IV
C.	Standard 6 – acetylmorfin .....	VII
D.	Značený standard 6 – acetylmorfin – D6 .....	IX
II.	Fragmentační spektra 6 – acetylmorfinu a značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 v moči po SPE extrakci .....	XI
III.	Fragmentační spektra morfinu a značeného standardu morfinu – D3 v moči po SPE extrakci .....	XIII



# 1. ÚVOD

Hmotnostní spektrometrie je analytickou technikou nacházející uplatnění v nejrůznějších aplikacích. Její vývoj je provázen zaváděním nových ionizačních postupů. Zajímavou oblastí je aplikace ambientních technik ve forenzních vědách. Ambientní techniky např. desorpční elektrosprej, desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku aj. mají vysoký potenciál při přímých analýzách z povrchů za atmosférického tlaku s minimální úpravou vzorku i při detekci malého množství analytu v komplexní matici. Využívají se např. při analýzách farmaceutických tablet, při detekci výbušnin, při zobrazovacích analýzách v souvislosti s ověřováním dokumentů aj. V neposlední řadě své uplatnění nacházejí při detekci drog a jejich metabolitů. Tyto techniky umožňují analyzovat drogy nejen ve formě rostlinného materiálu, tablet, prášku, ale dovoluují i rychlou identifikaci drogy v biologických tekutinách. Alternativou k těmto technikám může být použití nanoelektrospreje (nanoESI) pro analýzu roztoků rovněž po minimální úpravě vzorku.

Tato práce se zaměřuje na studium ionizace opiátů s využitím elektrospreje a nanoelektrospreje. Na analýze zasolených vzorků byly zhodnoceny uvedené techniky, následně pro vzorky moče byl aplikován nanoESI, s cílem ověřit jeho možnost při screeningu opiátů ve vzorcích moči.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Forenzní vědy

Forenzní – pochází z lat. *forensis* neboli soudní, odvozeného od *forum* – (veřejné prostranství, kde se obvykle hlásaly názory a vykonávaly soudy).<sup>1</sup>

Forenzní vědy (nauky) se uplatňují při vyšetřování a dokazování trestných činů. Zabývají se např. ověřováním identity osob, pravosti listin, identifikací zbraní, jedů, zjišťováním příčin, způsobu a času smrti. Forenzní vědy jsou děleny na jednotlivé obory: daktyloskopie, forenzní antropologie, balistika, forenzní chemie, soudní lékařství, forenzní psychologie, forenzní genetika, písmoznalectví aj. Jednotlivé obory forenzních věd spolu úzce souvisejí a často se kombinují. Například v rámci soudního lékařství se uplatňuje forenzní chemie. Mezi forenzní vědy mohou být zařazeny i další nauky, pomocí kterých lze získat důkazy v trestním řízení např. forenzní fotografie, forenzní geologie, forenzní meteorologie.<sup>1,2</sup>

#### **Forenzní chemie (soudní, detektivní chemie)**

Jedná se o aplikovanou analytickou chemii, která má uplatnění při kriminalistickém vyšetřování a řešení soudních sporů. Využívá se k analýze materiálů sloužících dále jako důkazní prostředky v soudním řízení.

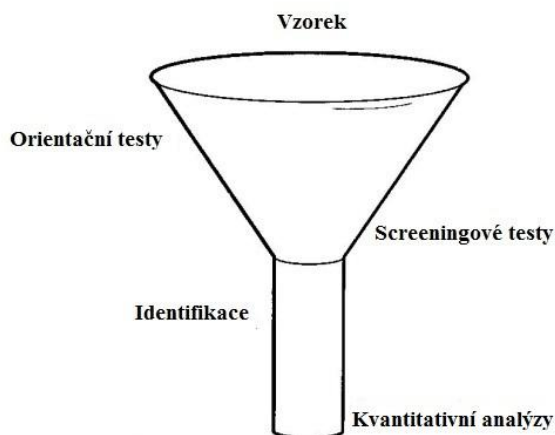
Cílem provedených expertíz je:<sup>2</sup>

- určit chemické složení neznámé látky (neoznačené chemikálie, léku, drogy);
- ověřit chemické složení známé látky a materiálu (např. zda opravdu balení obsahuje udávanou látku a v jaké koncentraci);
- zjistit technické informace (výskyt, dostupnost, použití), chemické a fyzikální vlastnosti (hořlavost, výbušnost, těkavost, reaktivitu), toxikologické údaje (nebezpečné koncentrace, letální dávky), další informace (např. možnost domácí výroby);
- zjistit přítomnost cizorodých látek v některých materiálech, které mohou poškozovat zařízení, přístroje a soustavy (např. mechanické nečistoty v palivu), znehodnocovat průmyslové výrobky (např. voda v brzdové kapalině apod.),

znehodnocovat zemědělské plodiny, potravinářské suroviny, polotovary a výrobky (např. roztok louhu z čistící linky v minerální vodě);

- charakterizovat procesy – pracovní postup (např. způsob zhotovení nátěrů), průběh děje založeného na přenosu materiálu z působícího předmětu (např. otlak předmětu na oděvu, vzdálenost zbraně od zasaženého předmětu v okamžiku výstřelu apod.), způsob vnějšího narušení určité věci (vrh, úder, zásek), čas, kdy zkoumaný děj probíhal, nebo dobu, po kterou trval (chemické reakce, hoření, tepelný rozklad aj.);
- odhalit přítomnost jedů a dalších zdraví ohrožujících látek v tkáních, v tělesných tekutinách lidí i zvířat a jejich přítomnost v životním prostředí (půdě, vodě, ovzduší), v zemědělských plodinách, nápojích, pokrmeh, krmivech atd.

Forenzní chemie nám poskytuje odpovědi na dvě základní otázky. Kvalitativní analýzou získáme odpověď na otázku, o jaký vzorek se jedná, z čeho se skládá, a kvantitativní analýza nám poskytne informace, v jakém množství se účinné látky ve vzorku nacházejí.



**Obr. 1.** Průběh forenzní analýzy.<sup>3</sup>

Nejprve se na začátku forenzních expertíz provedou kvalitativní orientační testy, které zúží seznam potencionálních analytů. Právě tyto orientační testy určují následující analýzy. Rozbor pokračuje screeningovými testy a konečnou identifikací, kterým předchází separace a izolace cílových sloučenin pomocí extrakce a chromatografie. Celá expertíza je zakončena kvantitativní analýzou.<sup>3</sup>

K forenzním analýzám se využívají mnohé instrumentální techniky např. infračervená spektrometrie, plynová chromatografie a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Zajímavou novou alternativou je použití hmotnostní spektrometrie za ambientních podmínek.

## **2.2. Hmotnostní spektrometrie s desorpcí a ionizací za ambientních podmínek**

Výraz „ambient“ nemá v kontextu hmotnostní spektrometrie ustálený český ekvivalent, proto v rámci své diplomové práce používám termín „ambientní“. Hmotnostní spektrometrie pracující za ambientních podmínek neboli „ambient mass spectrometry“ je v dnešní době rychle se rozvíjející oblast analytické chemie, která poskytuje vysokou citlivost analýz a zároveň umožňuje přímé stanovení z povrchů za atmosférického tlaku s minimální úpravou vzorku. Další výhodou těchto technik je detekce malého množství analytu v komplexní matici po minimální nebo žádné úpravě vzorku. U těchto technik dochází k uvolnění analytu z kondenzované fáze (desorpce z povrchu, extrakce z kapaliny) a současné nebo následné ionizaci. To vše probíhá mimo vakuovanou část hmotnostního spektrometru za atmosférických podmínek.<sup>4,5</sup>

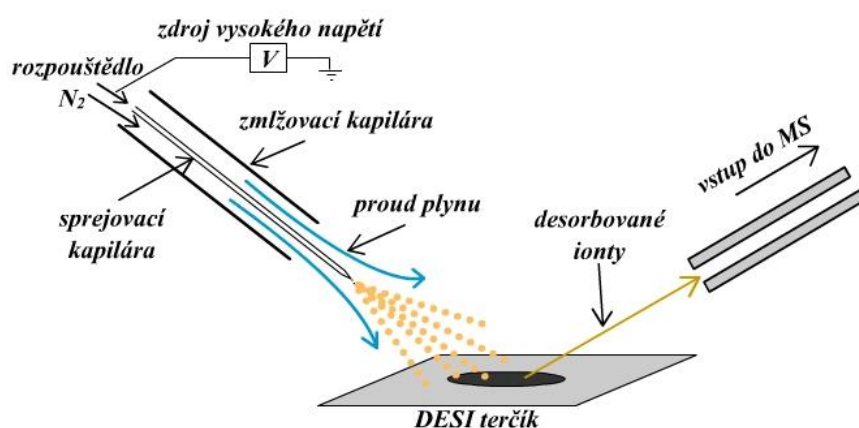
První publikace o ambientních technikách pochází z roku 2004 a je spojena se zavedením desorpčního elektrospreje (DESI).<sup>4</sup> O rok později následuje další ambientní technika DART neboli „přímá analýza v reálném čase“.<sup>5</sup> V posledních letech dochází k rychlému rozvoji nových ambientních technik. Kombinují se různé způsoby desorpce (přenos hybnosti, rozpouštění se do odražejících se kapek a teplotní desorpce) s ionizací pomocí elektrospreje, s chemickou ionizací a fotoionizací za atmosférického tlaku.<sup>4,5</sup> Existuje přes 30 ambientních technik a následně se práce bude věnovat některým z nich.

Pomocí ambientních technik mohou být analyzovány různé typy vzorků např. biologické, farmaceutické, forenzní, vzorky životního prostředí i potravin. V posledních letech se výzkum ambientních technik mimo jiné zaměřuje na jejich využití pro forenzní účely. Byly testovány pro analýzu výbušnin, k určení složení padělaných farmaceutických léčiv, k detekci drog v biologických tekutinách (v moči, v plazmě), dále jako zobrazovací techniky při ověření pravosti dokumentu i k analýze otisku prstů.<sup>6</sup>

## 2.2.1. Desorpční elektrosprej – DESI

Jedná se o relativně novou ionizační techniku, která byla prvně prezentována v roce 2004 Robertem G. Cooksem a jeho spolupracovníky z Purdue university.<sup>4</sup>

Metoda DESI (desorption electrospray ionization) je založena na desorpci a ionizaci látek pomocí sprejovací techniky ESI. Analyzovaný vzorek se nachází v pevném stavu pod vhodným úhlem ke sprejovací kapiláře a ke vstupu hmotnostního spektrometru. Princip desorpčního elektrospreje je znázorněn na obr. 2. Prvně dochází k rozprašování sprejovací kapaliny pomocí vysokého napětí. Nabité kapičky sprejovací kapaliny dopadají na povrch analyzovaného vzorku a dochází k desorpci iontů ze vzorku. Uvolněné ionty jsou vedeny do vakuované části hmotnostního analyzátoru.<sup>7,8</sup>



**Obr. 2.** Princip desorpčního elektrospreje.

Technika desorpčního elektrospreje umožňuje analyzovat širokou škálu sloučenin z různých povrchů. Pomocí DESI jsou analyzovány polární i iontové látky s širokým rozsahem molekulových hmotností až po proteiny. Své uplatnění DESI nachází při monitorování výbušnin, drog, léků, při analýzách z kůže, při zobrazování hmotnostní spektrometrií aj.<sup>7,8</sup>

### ***Mechanismus ionizace DESI***<sup>8,9</sup>

Při ionizaci se neuplatňuje jen jeden mechanismus. Mezi mechanismy považované za hlavní, patří ionizace nabitou kapkou a ionizace pomocí přenosu náboje. Který mechanismus převládá, závisí na více faktorech např. na složení sprejovací kapaliny, druhu analyzované látky, geometrii přístroje.

### *Ionizace nabitou kapkou*

Ze sprejovací kapiláry dopadají na povrch vzorku nabitě kapky. Kapky „sbírají“ molekuly analytu z povrchu a analogickým procesem jako u elektrospreje dochází k nabití analytu a uvolnění iontů do plynné fáze. Tyto nabitě molekuly analytu putují přes vstup do vakuované části hmotnostního spektrometru.

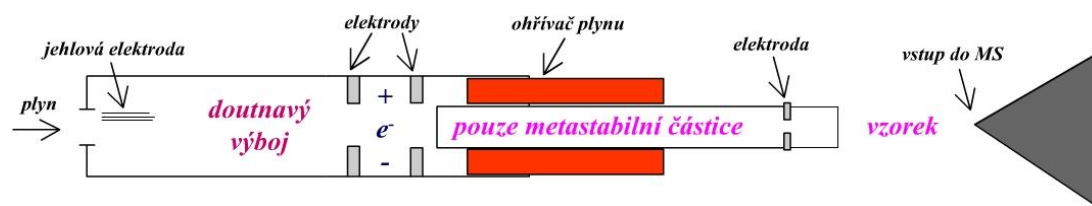
### *Ionizace pomocí přenosu náboje*

Mechanismus ionizace je založen na přenosu náboje mezi ionty rozpouštědla a molekulami analytu na povrchu, mezi ionty v plynné fázi a molekulami analytu na povrchu, mezi ionty a molekulami analytu v plynné fázi.

### **2.2.2. Přímá analýza v reálném čase – DART**

Iontový zdroj DART (direct analysis in real time), který byl popsán v roce 2005 Laramem a Codym,<sup>4</sup> umožňuje provádět analýzy plynů, kapalin a pevných látek za atmosférického tlaku.

Vzorek je umístěn v prostoru před vstupem do vakuované části hmotnostního analyzátoru, jak je znázorněno na obr. 3. Do iontového zdroje je přiváděn plyn nejčastěji helium, dusík, neon (průtok plynu 1,5 – 3 l za min.), který dále postupuje do výbojové komory s jehlovou elektrodou. Na elektrodu se vkládá vysoké napětí (3 – 5 kV), v jehož důsledku dojde k doutnavému výboji a k ionizaci plynu, ale také ke vzniku nenabitých metastabilních částic plynu. Poté dochází prostřednictvím série elektrod k odchylení nabitých částic. Následně jen nenabitě metastabilní částice interagují s analyzovanou látkou.<sup>10, 11</sup>



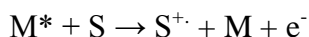
**Obr. 3.** Schéma iontového zdroje DART.

### ***Mechanismy ionizace DART***

Uplatňuje se několik ionizačních mechanismů, které závisí na polaritě a reaktivitě plynu, protonové afinitě a ionizační energii analytu, přítomnosti aditiv a dopantu (amoniaku, chloridu).<sup>11</sup>

### *V pozitivním módu*

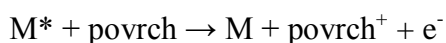
*Penningova ionizace* – při které dochází k přenosu energie z excitovaného plynu ( $M^*$ ) na analyt (S), který má nižší ionizační energii než je excitační energie plynu. Produktem ionizace je kation – radikál a elektron.



Tento mechanismus ionizace je dominantní při použití dusíku či neonu. V případě použití helia dochází k reakci metastabilních atomů helia s vodou z atmosféry za vzniku vodných klastrů, které mohou následně protonizovat molekuly analytu.<sup>10, 11</sup>

### *V negativním módu*

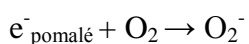
Uplatňují se různé mechanismy, při nichž jsou produkovány elektrony *Penningovou ionizací* nebo pomocí *povrchové Penningové ionizace*.



Dochází ke kolizím elektronů s plynem za atmosférického tlaku.



Po zpomalení elektronů dochází k jejich záchytu kyslíkem. Vzniklý aniont kyslíku reaguje s analytem za tvorby aniontů.



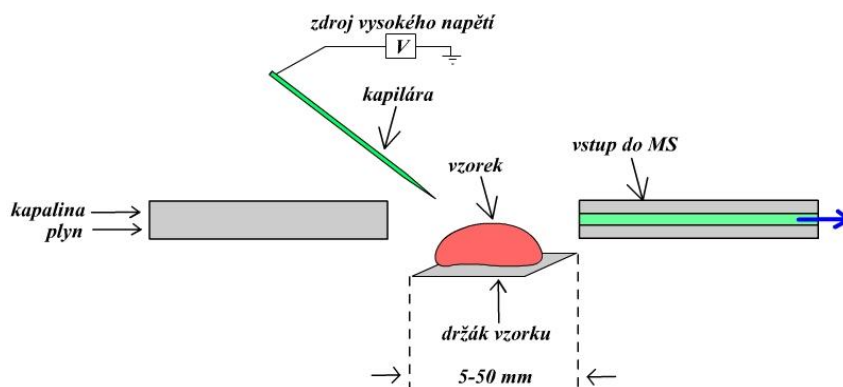
DART poskytuje poměrně jednoduchá spektra, pro která jsou v pozitivním módu charakteristické ionty  $M^+$  a/nebo  $[M+H]^+$  a v negativním módu  $M^-$  nebo  $[M-H]^-$ . DART spektra jsou podobná spektrům získaných DESI analýzou, ale nevyskytují se zde vícenásobně nabití ionty. Tudíž i rozsah analytů z hlediska jejich molekulové hmotnosti, které lze sledovat pomocí DART je menší.<sup>11</sup>

### **2.2.3. Desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku – DAPCI**

Technika desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku (desorption atmospheric pressure chemical ionization) byla popsána v roce 2005 a spojuje výhody desorpční techniky s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Umožňuje rychlou a citlivou detekci stopového množství analytů ve složitých maticích. Před analýzou není

nutná předúprava vzorku. Je vhodná pro polární a méně polární látky pevné povahy včetně prášků.<sup>12</sup>

U DAPCI (obr. 4) proud plynu a zmlžené kapaliny zajišťuje desorpci látek, zdrojem energie pro ionizaci je koronový výboj.

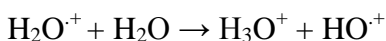
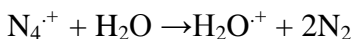
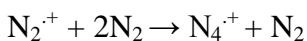
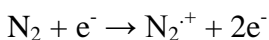


**Obr. 4.** Iontový zdroj DAPCI.

K chemické ionizaci se využívá jako reakční činidlo „okolní vzduch“, který obsahuje okolo 45 – 60% vzdušné vlhkosti a sušící plyn (dusík). V pozitivním módu jsou generovány primární ionty  $\text{H}_3\text{O}^+$  a v negativním módu vznikají  $\text{H}_2\text{O}^-\text{OH}^-$ . Počet vytvořených iontů je srovnatelný s počtem iontů vznikajících při chemické ionizaci za atmosférického tlaku. Primární ionty dopadají přímo na povrch vzorku a vznikající ionty analytu jsou směřovány do vakuované části hmotnostního analyzátoru.<sup>12, 13</sup>

### ***Mechanismus ionizace DAPCI***

#### *Mechanismus tvorby primárních iontů v pozitivním módu*



#### *Mechanismus interakce primárních iontů s analytem na daném povrchu*





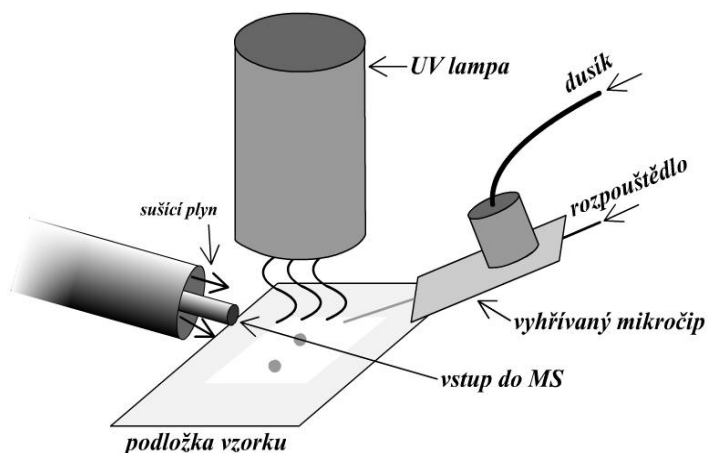
#### 2.2.4. Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku – DAPPI

DAPPI (desorption atmospheric pressure photoionization), další ambientní ionizační technika vhodná k rychlé analýze sloučenin o různé polaritě byla představena v roce 2007 Markusem Haapalou a kolektivem. Ve srovnání s desorpčním elektrosprejem je tato metoda více citlivá pro analýzu méně polárních a neutrálních analytů. Umožňuje přímo sledovat i nepolární sloučeniny.<sup>14</sup>

DAPPI technika (obr. 5) je založena na teplotní desorpci analytů z povrchu a následné fotoionizaci za atmosférického tlaku. Rozpouštědlo s nízkou ionizační energií např. toluen a dusík jsou přiváděny do vyhřívaného mikročipu a následně dochází ke sprejování na povrch, ze kterého jsou uvolňovány molekuly analyzované látky. Z kryptonové výbojky jsou emitovány fotony o energii 10 eV, které ionizují rozpouštědlo. Následně dochází k ionizaci analytů pomocí reakcí v plynné fázi.<sup>14, 15, 16</sup>

Povrchy, na kterých jsou nanесeny vzorky, mohou být z různých materiálů s různou tepelnou vodivostí např. polymethylmetakrylát (PMMA), polytetrafluorethylen (PTFE, teflon), alobal (hliníková folie). Materiály s nízkou tepelnou vodivostí např. PMMA a teflon jsou nejlepší, protože umožňují lokální vytápění plochy vzorku. Bylo zjištěno, že tato skutečnost má zásadní význam pro efektivní desorpci analytu.<sup>14, 17</sup>

Volba sprejovací kapaliny závisí na druhu analyzované látky. Anisol a toluen jsou nejvhodnější sprejovací kapaliny při analýze nepolárních sloučenin např. antracen, benzo[b]pyren v pozitivním módu, protože podporují tvorbu  $M^+$  iontů. Naopak aceton je optimální sprejovací kapalina pro polární látky např. MDMA, testosteron a verapamil. Ve spektru vidíme intenzivní  $[M+H]^+$  pík analytu.<sup>17</sup>

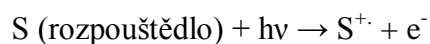


Obr. 5. Iontový zdroj DAPPI.

### *Mechanismy ionizace DAPPI<sup>17</sup>*

Po teplotní desorpci analytů z povrchu dochází k ionizaci v plynné fázi prostřednictvím podobných reakcí jako u APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku).

#### *Fotoionizace sprejovaného rozpouštědla*



*Výměna náboje mezi rozpouštědlem a analytem: jestliže  $IE (M) < IE (S)$*



*Přenos protonu z rozpouštědla na molekulu analytu*

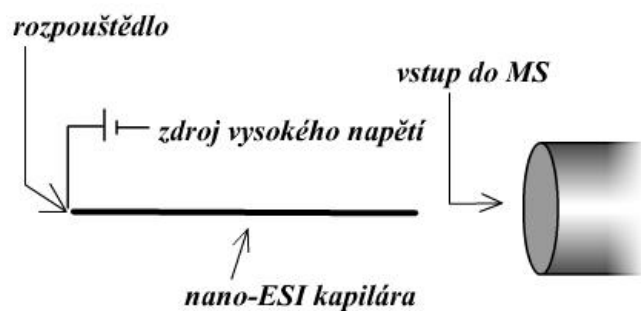


### **2.2.5. Nanoelektrosprej – NanoESI**

Nanoelektrosprej (nanoelectrospray) nepatří mezi ambientní ionizační techniky, ale taktéž jako u ambientních technik nemusí být nutná složitá úprava vzorku. Princip ionizační techniky nanoESI (obr. 6) je podobný technice ESI.

Sprejovací kapilára, na kterou se vkládá sprejovací napětí, je naplněná měřenou látkou (vzorkem). Na konci této kapiláry vznikají nabitě kapky, které se následně začnou zmenšovat v důsledku jejich opakovaného rozpadu. Z těchto malých vysoce nabitých kapek jsou poté uvolňovány ionty, které jsou vedeny do vstupu vakuované části hmotnostního analyzátoru.

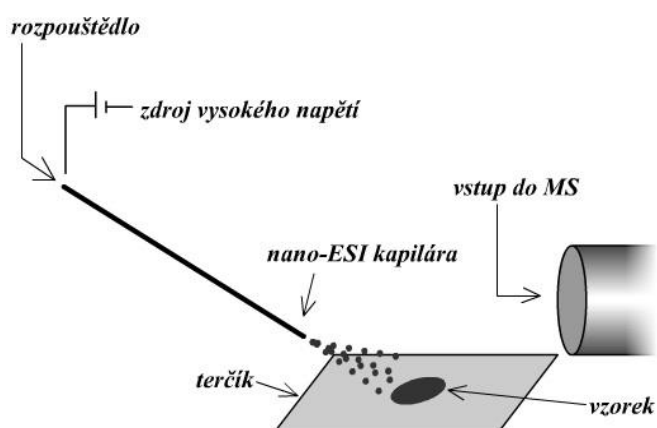
Iontový zdroj nanoESI ve srovnání s elektrosprejem je tolerantnější k zasolení vzorku, jelikož primární nabitě kapky vznikající u nanoESI jsou menší, v důsledku toho se méněkrát uplatňuje Coulombická exploze a dochází tak k menšímu zakoncentrování soli v povrchu kapky. Další výhody nanoESI jsou např. menší spotřeba vzorku, efektivnější ionizace a tím vyšší citlivost a lepší poměr signál/šum.<sup>18, 19</sup>



**Obr. 6.** Iontový zdroj nanoESI.

### 2.2.6. Desorpční nanoelektrosprej – NanoDESI

Jedná se o konstrukční variantu DESI, která byla vyvinuta na našem pracovišti. Princip desorpčního nanoelektrospreje (desorption nanoelectrospray) (obr. 7) nevyhází z elektrospreje (ESI), jak je uvedeno u DESI, ale z nanoelektrospreje (nanoESI) popsaného v předchozí kapitole. Díky této modifikaci, která umožňuje pracovat při nižších průtocích sprejované kapaliny, se snižuje rozmývání analytu a spotřeba vzorku.<sup>20, 21, 22</sup>



**Obr. 7.** Iontový zdroj nanoDESI.

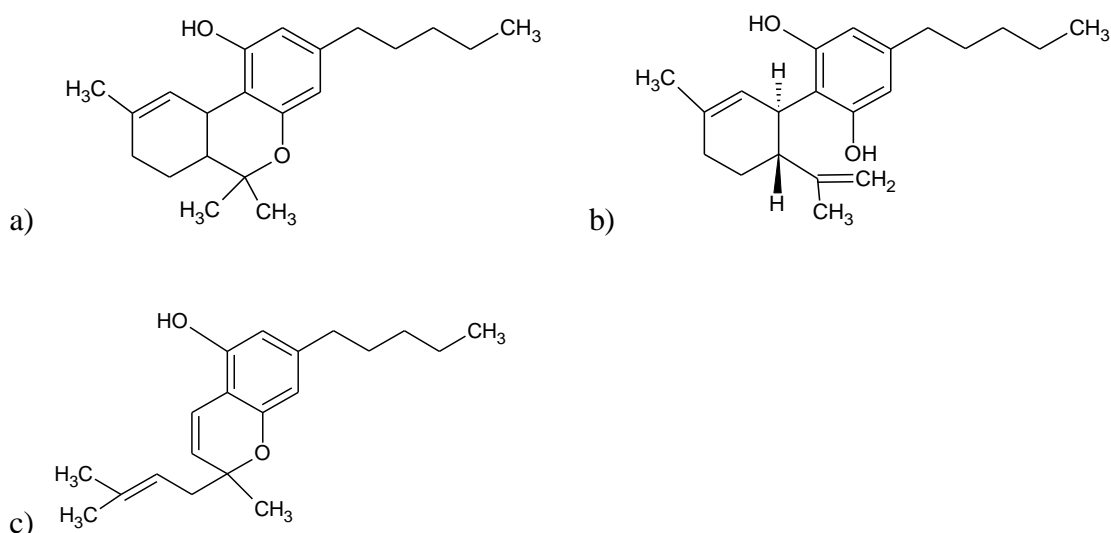
## 2.3. Ambientní techniky ve forenzních vědách

Ambientní techniky nacházejí své uplatnění také ve spojení s forenzní chemií. Využívají se k analýzám toxických látek, chemických bojových látek, k určení chemického složení padělaných farmaceutik, k detekci drog a jejich metabolitů v biologických tekutinách (moč, plazma) narkomanů, k detekci výbušnin na úrovni nanogramů. Ambientní techniky se používají také při zobrazovacích analýzách využívaných při ověřování dokumentů a rovněž při analýzách z otisků prstů či z kůže.<sup>23, 6</sup>

### 2.3.1. Analýza nelegálních drog a padělaných léčiv

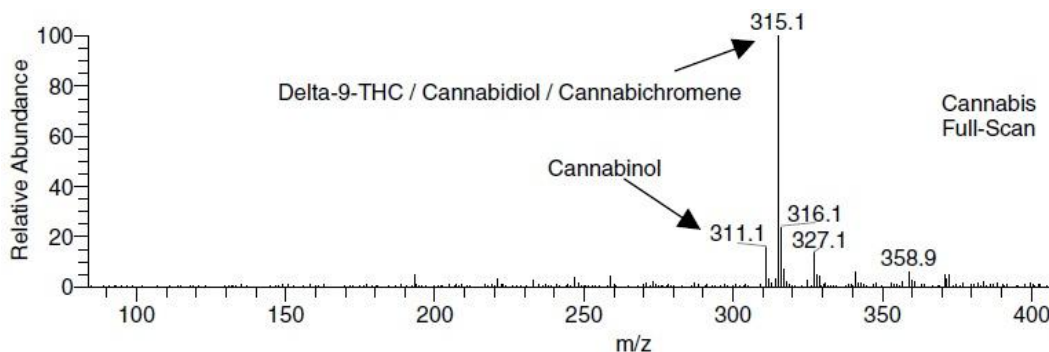
Ambientní hmotnostní spektrometrie umožňuje díky vysoké propustnosti přímou analýzu léčiva (drog) v tabletách, gelech, nebo rostlinných materiálech.<sup>6</sup> Informace získané pomocí ambientních technik mohou často pomoci policii při identifikaci původu, účinků a zdroje drogy. Rychlé a snadné analýzy umožní detekovat účinnou látku, stanovit její koncentraci i identifikovat jiné komponenty (přísady) v droze.<sup>6</sup>

Pomocí desorpčního elektrospreje byl analyzován rostlinný materiál konopí setého. Spektra analyzovaných usušených lístků marihuany poskytovala hlavní molekulární pík při  $m/z$  315. Tento pík může představovat protonovanou molekulu delta – 9 – tetrahydrokanabinolu, kanabidiolu, nebo kanabichromenu.<sup>23</sup> Strukturální vzorce uvedených látek jsou znázorněny na obr. 8.



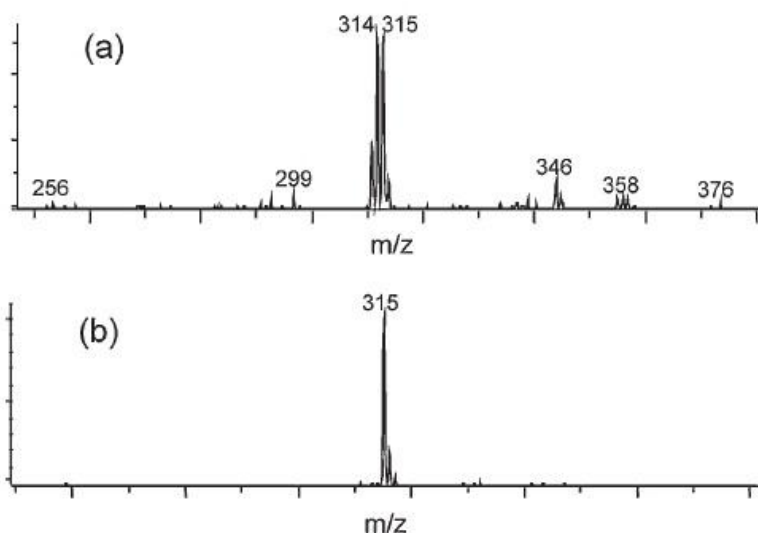
**Obr. 8.** a) delta – 9 – tetrahydrokanabinol, b) kanabidiol, c) kanabichromen

Na základě známé skutečnosti o složení konopí je koncentrace delta – 9 – tetrahydrokanabinolu v lístcích konopí výrazně vyšší a předpokládá se, že pík m/z 315 představuje především tuto halucinogenní složku. Ve spektru (obr. 9) se nacházely i další píky o nižších intenzitách při m/z 311, 327, 341 a 359.<sup>24</sup>

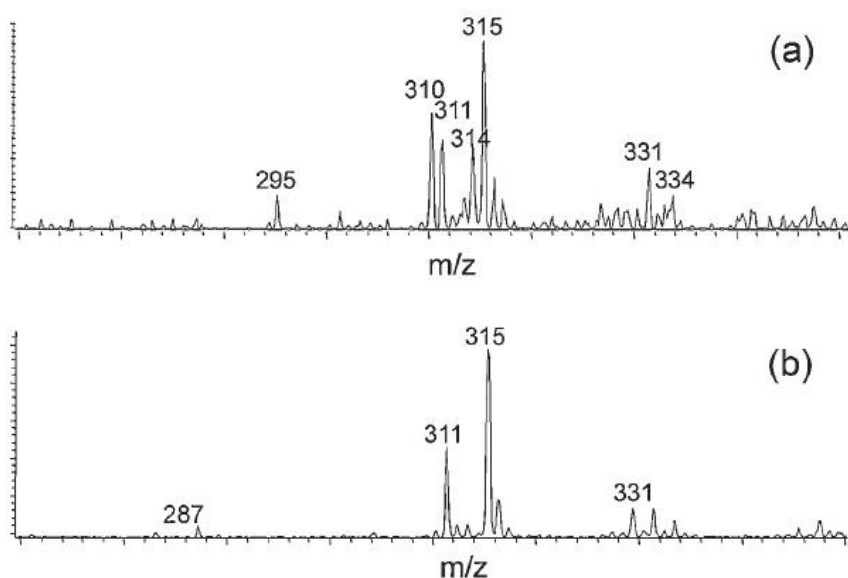


**Obr. 9.** DESI – hmotnostní spektrum lístků konopí (převzato z cit.<sup>24</sup>)

Produkty konopí setého se také analyzovaly technikou DAPPI. K analýzám květů marihuany se použil toluen nebo aceton jako dopant, který se podílí na zprostředkování ionizace analytu. Za použití toluenu byly ve spektru pozorovány píky m/z 314 a 315, zatímco při stejné analýze za použití acetonu spektra poskytovala jen pík při m/z 315 (obr. 10). Pozorované rozdíly souvisí mimo jiné s rozdílnou protonovou afinitou těchto dopantů. DAPPI spektra získána při použití acetonu se podobala DESI spektrům z předchozí publikace.<sup>15</sup> Při analýzách pryskyřice (hašiše) za použití toluenu se vyskytly ve spektru navíc píky m/z 310 a 311 a při použití acetonu jen pík m/z 311 (obr. 11). Byly také provedeny analýzy MS/MS, které potvrdily, že se jedná o kation – radikál (m/z 310) a protonovanou molekulu (m/z 311) kannabinolu.<sup>15</sup>

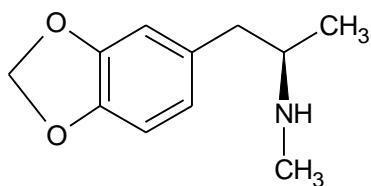


**Obr. 10.** DAPPI spektra suchých lístků marihuany a) toluen, b) aceton. (převzato z cit.<sup>15)</sup>)

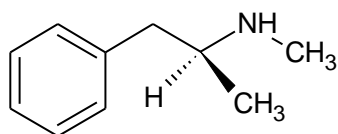


**Obr. 11.** DAPPI spektra hašiše a) toluen, b) aceton. (převzato z cit.<sup>15)</sup>)

Ambientní techniky jsou využívány nejen k přímé analýze z rostlinného materiálu, ale umožňují analyzovat i tablety drog. Ionizační technika DESI byla použita k analýze nelegálních tablet extáze, které obsahují účinnou látku MDMA o relativní molekulové hmotnosti 193. Analýze bylo podrobena 5 tablet, přičemž všechna spektra těchto tablet obsahovala pík  $m/z$  194 představující protonovanou molekulu MDMA (obr.13). Dále píky o nižší intenzitě např. pík při  $m/z$  150 odpovídající protonované molekule MA.<sup>24</sup> Strukturální vzorce MDMA a MA jsou znázorněny na obr.12.



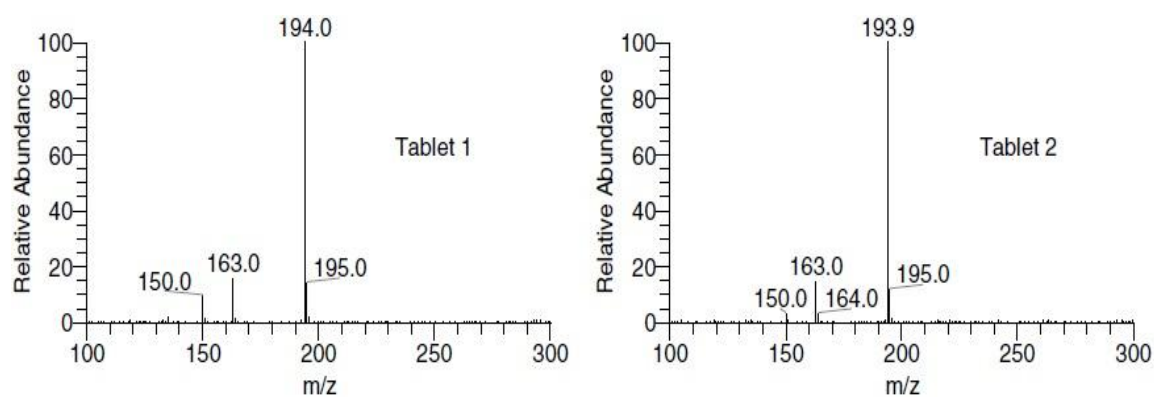
MDMA (3, 4 – methylenedioxy – N – methylamfetamin)



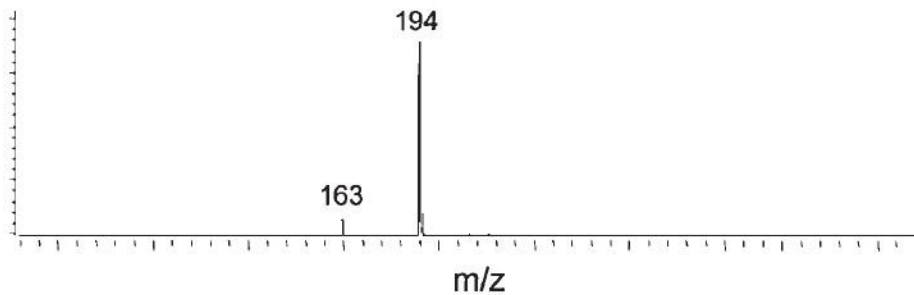
MA: (N – methylamfetamin)

**Obr. 12.** Strukturální vzorce MDMA a MA.

S danými vzorky byly provedeny nezávislé analýzy pomocí infračervené spektrometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie, které získaná data z analýz hmotnostní spektrometrií potvrdila a umožnila kvantifikovat. Zjištěné obsahy hydrochloridu MDMA byly 57 mg v tabletě a hydrochloridu MA 9,5 mg v tabletě.<sup>24</sup> Zabavené tablety extáze byly podobně analyzovány pomocí DAPPI. I v těchto spektrech byl pozorován pík  $m/z$  194 při použití jak toluenu (obr.14) tak acetonu. Spektra jsou téměř shodná s předchozími DESI spektry.<sup>15</sup>

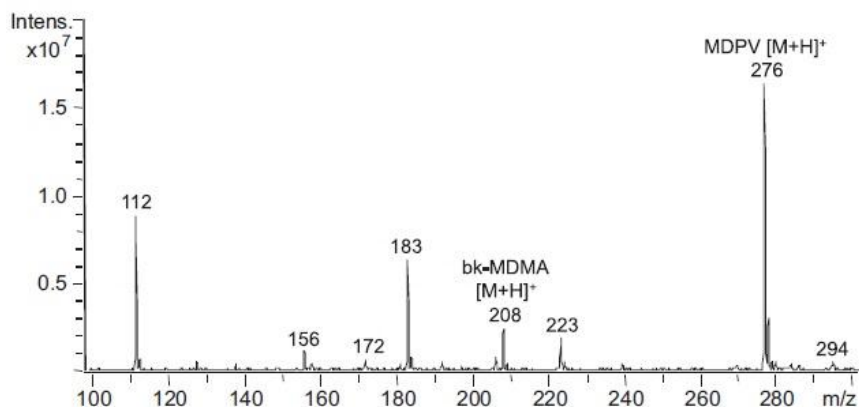


**Obr. 13.** Typická DESI spektra vybraných dvou tablet MDMA. (převzato z cit.<sup>24</sup>)



**Obr. 14.** DAPPI spektrum tablet MDMA při použití toluenu. (převzato z cit.<sup>15</sup>)

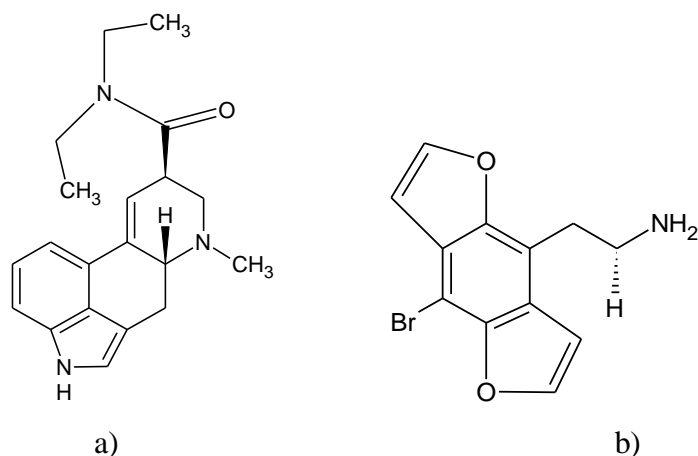
Ionizační techniku DAPPI lze dále použít k analýzám drog v práškové formě. Dříve se práškové drogy typu kokainu, heroinu, amfetaminu analyzovaly po rozpuštění ve vhodném rozpouštědle (obvykle voda/metanol). Kapky roztoku se nanosily na polymerní povrch, který se nechal zaschnout a posléze analyzoval. V novější publikaci bylo popsáno nanášení práškové formy drog na oboustranně lepicí pásky upevněné na skleněném mikroskopickém sklíčku. Nadměrné množství prášku se z pásek odstranilo a následně se sklíčka se vzorky analyzovala DAPPI technikou. Nový způsob vzorkování je rychlejší, jednodušší, bez paměťových efektů. Páska nezpůsobovala v DAPPI spektrech žádné významné píky pozadí. Touto technikou se analyzoval zabavený bílý prášek obsahující beta – keto – MDMA a MDPV (3,4 – methylenedioxypropylvaleron) látky, které jsou řazeny do skupiny „new designer“ drog. V DAPPI spektrech byly pozorovány píky iontů protonovaných molekul při m/z 208 a 276 odpovídající beta – keto – MDMA a MDPV (obr.15).<sup>25</sup>



**Obr. 15.** DAPPI spektrum beta – keto – MDMA a MDPV za použití toluenu. (převzato z cit.<sup>25</sup>)

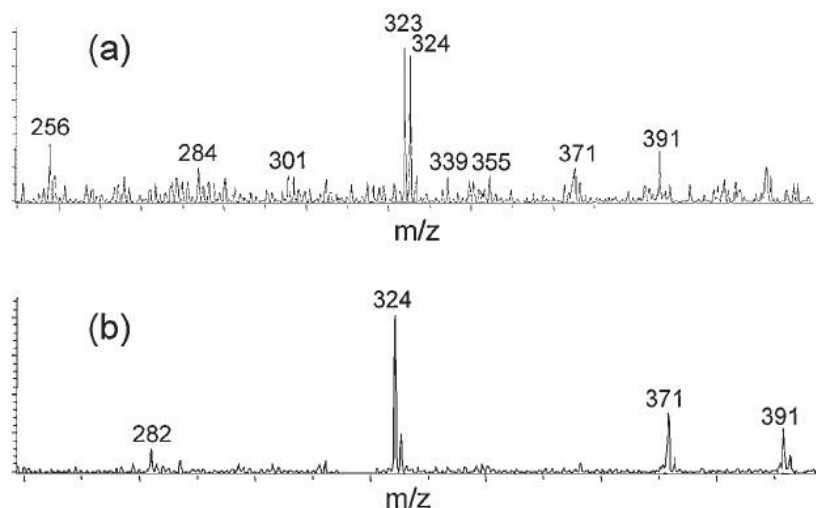


DAPPI technikou byly dále analyzovány savé papíry napuštěné danou drogou např. psychedelickou drogou diethylamid kyseliny lysergové tzv. LSD nebo psychedelickou halucinogenní drogou bromo – DragonFly tzv. ABDF, jejichž strukturní vzorce jsou zobrazeny na obr. 16.



**Obr. 16.** Strukturní vzorce a) LSD, b) ABDF.

DAPPI spektra LSD (obr. 17) při použití toluenu obsahovala pík molekulárního iontu  $m/z$  323 i pík protonované molekuly  $m/z$  324 o téměř shodné intenzitě, zatímco při použití acetonu byl ve spektru pouze pík protonované molekuly  $m/z$  324. Spektra LSD při použití acetonu se podobala dříve publikovaným spektrům LSD pomocí MALDI za atmosférického tlaku.<sup>15</sup>

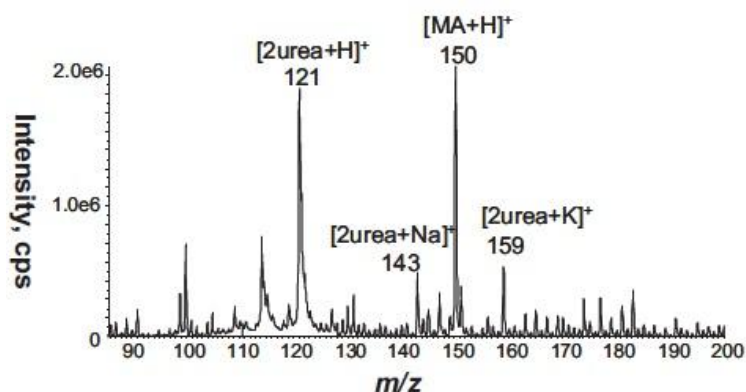


**Obr. 17.** DAPPI spektra savých papírků obsahujících LSD; použité rozpouštědlo a) toluen, b) aceton. (převzato z cit.<sup>15</sup>)

Ambientní techniky jsou vhodné nejen při analýzách drog ve formě rostlinného materiálu, tablet, prášku, ale dovolují i rychlou identifikaci drogy v biologických tekutinách např. v moči. Před samotnou analýzou takového typu vzorku je většinou nutné provést úpravu daného vzorku. Nejčastěji se provádí extrakce. Například byl využit desorpční elektrosprej ke screeningu močí získaných od drogově závislých. Screeningové testy se prováděly na látky typu opiátů, kanabinoidů, amfetaminů a benzodiazepinů. Výsledky získané pomocí techniky DESI byly srovnatelné s výsledky GC analýz. Výhodou DESI techniky byla nejen rychlost jednotlivých analýz, ale také vysoká citlivost, která umožňovala analyzovat vzorky i po 100 násobném zředění. Také selektivitu desorpčního elektrospreje lze optimalizovat podle typu analyzované látky pomocí změny složení sprejovací kapaliny. Např. ke zvýšení signálu polární látky typu benzodiazepinu dochází při použití vodné sprejovací kapaliny. Naopak pro málo polární látky typu kodein, morfin je vhodné zvýšit obsah organických látek ve sprejovací kapalině. Pomocí analýz GC – MS byly získány koncentrace analytů v jednotlivých vzorcích, která se pohybovaly v rozsahu 270 – 22000 ng/ml.<sup>26</sup>

Ambientní techniky jsou efektivní při rychlé identifikaci drog v různých formách i matricích, avšak na druhou stranu kvantifikace pomocí těchto technik je obtížnější, protože vyžaduje použití deuterovaných (značených) standardů, a proto se často ke stanovení množství účinné látky ve vzorku využívají i jiné techniky např. GC - MS.

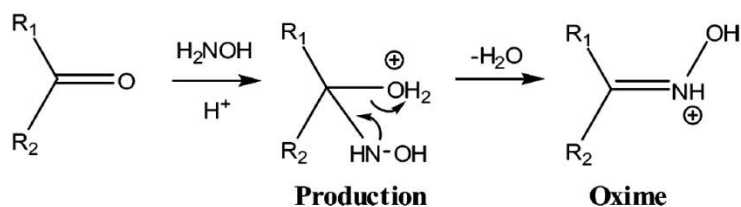
Pomocí DESI se analyzovala moč s přidavkem metamfetaminu o koncentraci 20 µg/ml. Za použití sprejovací kapaliny (metanol : voda : kyselina octová, 1 : 1 : 0,005, v/v) lze snadno metamfetaminy detekovat píkem m/z 150, jak již bylo uvedeno dříve, tento pík odpovídá iontu protonované molekuly metamfetaminu. Ion m/z 150 podléhá fragmentaci na ionty m/z 119 a 91 odpovídající ztrátě CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> a C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. V DESI spektru (obr. 18) se dále objevují píky poukazující na bohaté zastoupení solí a močoviny ve vzorcích moči, m/z 121 [2močovina + H]<sup>+</sup>, m/z 143 [2močovina + Na]<sup>+</sup>, m/z 159 [2močovina + K]<sup>+</sup>. Vysoká intenzita signálu iontu protonované molekuly metamfetaminu byla stabilní po dobu 14 minut, což poukazuje na vysokou toleranci DESI techniky k obsahu soli. Při analýzách moči s přidavkem metamfetaminu o koncentraci 1 µg/ml byl signál potlačen, pravděpodobně v důsledku obsahu močoviny. Při zvýšení obsahu kyseliny octové ve sprejovací kapalině lze opět pík m/z 150 ve spektru pozorovat.<sup>27</sup>



**Obr. 18.** DESI spektrum metamfetaminů v moči (převzato z cit.<sup>27</sup>)

Desorpční elektrosprej se dále použil k rychlému screeningu moči s přidavkem drogy clenbuterol. Před samotnou analýzou se provedla extrakce na pevné fázi (SPE), aby se minimalizoval vliv složité matrice. Linearita se pohybovala v rozsahu 10 – 400 ng/ml a limit detekce pro vzorek moči byl 2 ng/ml. Analýza jednoho vzorku moči s přidavkem clenbuterolu trvala necelé 4 minuty. Pomocí fragmentačních spekter byly získány strukturní informace, které potvrdily přítomnost clenbuterolu.<sup>28</sup>

Kombinace reaktivního desorpčního elektrospreje s tandemovou hmotnostní spektrometrií umožňuje rychlý screening anabolických steroidů v moči. Jedná se o látky, které jsou ve sportu zakázány a kontrolovány při antidopingové kontrole. Princip je založen na přidavku hydroxylaminu jako činidla do sprejovací kapaliny, který při procesu ionizace začne reagovat s karbonylovou skupinou steroidu a vzniku oximů (obr. 19). Tato reakce je velice efektivní pro selektivní ionizaci ketosteroidů. V kombinaci s mikroextrakcí na pevné fázi (SPME) lze dosáhnout limitu detekce 20 ng/ml.<sup>29</sup>



**Obr. 19.** Schematicky zobrazuje vznik oximu. (převzato z cit.<sup>29</sup>)

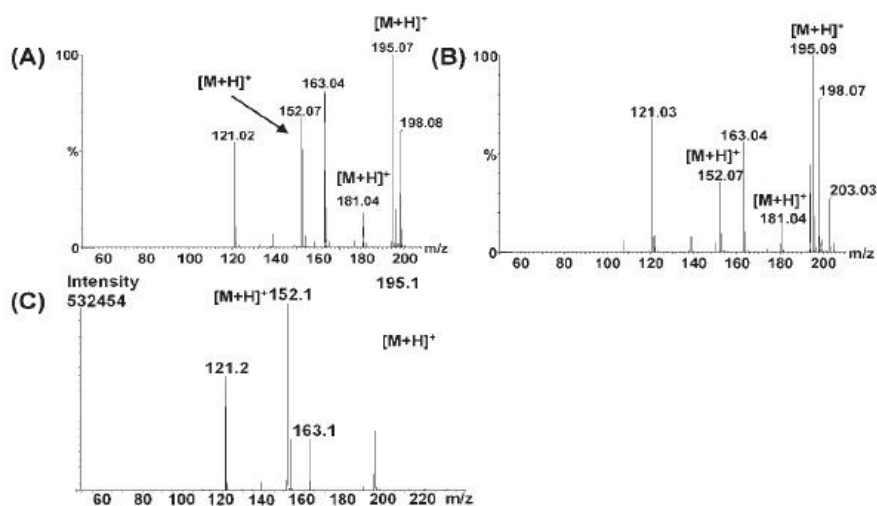
Své uplatnění nacházejí ambientní techniky i při kontrole pravosti léků. Klasické metody, které se k analýze padělaných léků používají, např. kapalinová chromatografie

s hmotnostním spektrometrem, vyžadují časově náročnou přípravu vzorku před samotnou analýzou.<sup>23</sup>

Při analýze tablet artesunátu, léku proti malárii, se zjistilo, že z celkového počtu 52 analyzovaných tablet bylo 43 padělaných. K analýze byla využita technika DART ve spojení s průletovým analyzátozem. Tablety artesunátu se analyzovaly jednak v negativním módu, kde byla detekovaná deprotonovaná molekula při  $m/z$  382, tak v pozitivním módu s přidavkem  $\text{NH}_3$ , kdy vznikal amonný adukt  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ . Výsledky měření se potvrdily kolorimetricky a pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Falešné tablety obsahovaly pouze zlomek účinné složky, dále obsahovaly látky, které nebyly deklarovány a jiné pomocné látky.<sup>23</sup>

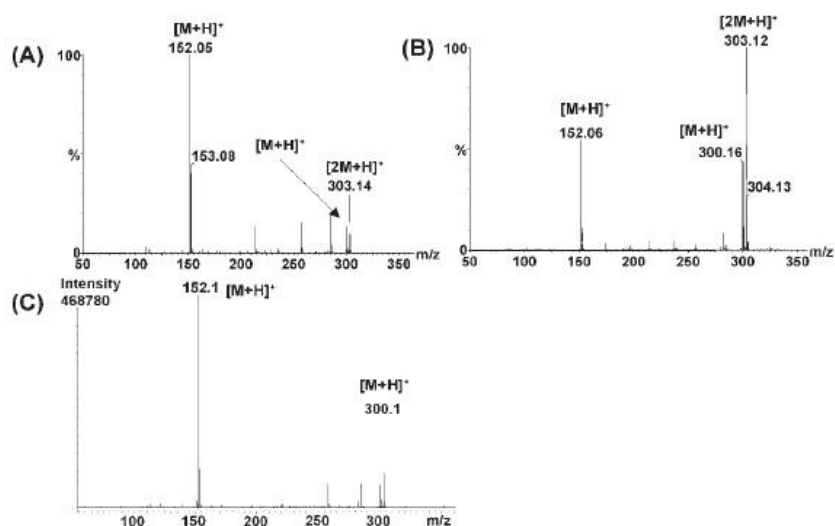
Tablety Anadin extra obsahující 45 mg kofeinu, 200 mg paracetamolu a 300 mg kyseliny acetylsalicylové byly analyzovány pomocí ionizačních technik DAPCI, DESI a DART. Každá obsažená aktivní složka poskytovala ve spektrech DAPCI a DESI pík protonované molekuly (paracetamol  $m/z$  152, kyselina acetylsalicylová  $m/z$  181 a kofein  $m/z$  195). V DART spektru pík protonované molekuly kyseliny acetylsalicylové chyběl. Ion  $m/z$  198 ve spektrech DAPCI a DESI představuje adukt  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  kyseliny acetylsalicylové a pík  $m/z$  203 v DESI spektru adukt  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  kyseliny acetylsalicylové.<sup>7</sup>

Ze spekter uvedených na obr. 20 je zřejmé, že relativní poměr intenzit analytů je při použití různých ionizačních technik rozdílný, což poukazuje na odlišnou selektivitu daných technik.



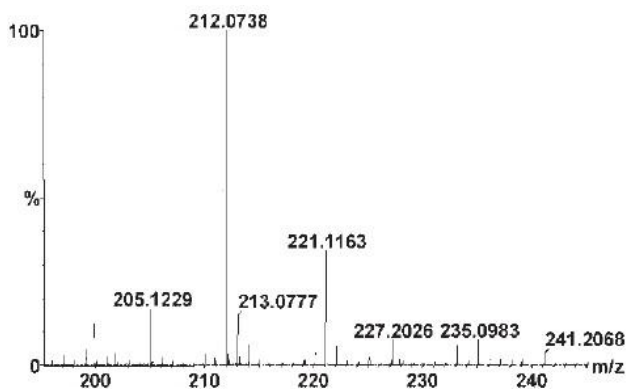
**Obr. 20.** Analýza tablet Anadinu Extra a) DAPCI, b) DESI, c) DART. (převzato z cit.<sup>7</sup>)

Tablety Solpadeine Max s účinnými látkami paracetamol a kodein s obsahem 500 mg a 12,8 mg byly rovněž analyzovány výše uvedenými technikami. Ve spektrech DAPCI a DART se vyskytoval jako hlavní pík protonovaný paracetamol ( $m/z$  152), kdežto ve spektru DESI pík největší intenzity byl při  $m/z$  303 odpovídající protonovanému dimeru paracetamolu (obr. 21).<sup>7</sup>



**Obr. 21.** Spektra tablet Solpadeine Max a) DAPCI, b) DESI, c) DART. (převzato z cit.<sup>7</sup>)

Ambientní ionizační techniky se dále využívaly k rychlé identifikaci metabolitů ibuprofenu v lidské moči. Detekovat metabolity léčiv v moči je náročné vzhledem k nízké koncentraci metabolitů a naopak vysoké koncentraci endogenních látek. Jsou známy tři metabolity hydroxy – ibuprofen, karboxy – ibuprofen a ibuprofenglukuronid. Vzorek lidské moči byl získán po 60 minutách od užití 2 tablet ibuprofenu se 400 mg účinné složky. Vzorek s přídavkem interního standardu ibuprofenu se absorboval na filtrační papír, který se následně analyzoval ionizační technikou DAPCI v negativním módu. Ve spektru (obr. 22) byly pozorovány píky – deprotonované molekuly ibuprofenu ( $m/z$  205) a metabolitů hydroxy – ibuprofenu ( $m/z$  221), karboxy – ibuprofenu ( $m/z$  235). Pík hydroxy – ibuprofenu byl intenzivnější než pík karboxy – ibuprofenu. Třetí metabolit ibuprofenglukuronid detekován nebyl.<sup>7</sup>



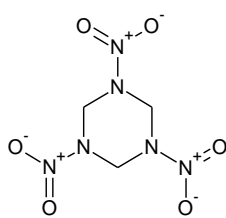
**Obr. 22.** DAPCI spektrum vzorku moči po užití tablet ibuprofenu. (převzato z cit.<sup>7)</sup>)

NanoDESI zkonstruované na naší katedře bylo úspěšně použito v kombinaci s kinetickou metodou ke screeningu chirálních léčiv v různých matricích (krev, farmaceutika). Sledovány byly enantiomery důležitých farmaceutických sloučenin – dihydroxyfenylalanin (DOPA), efedrin, ibuprofen. Princip je založen na tvorbě trimerních klastrů obecně –  $[M(\text{ref})_2(\text{A})\text{-H}]^+$ , kde M – představuje kov (nejčastěji měď), ref – opticky čistou referenční látku, A – analyzovanou látku. Analyzován vzorek Mukoseptonex® E o objemu 10  $\mu\text{l}$  byl nanesen na vzorkovací terčik a ponechán 2 minuty k zaschnutí. Poté se provedla analýza s obsahem selektoru (ref + M) ve směsi  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) ve sprejovací kapiláře, což umožnilo určit poměr enantiomerů efedrinu.<sup>20</sup> Podobně byly analyzovány vzorky krve.<sup>22</sup>

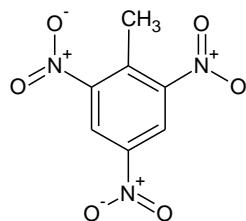
### 2.3.2. Analýza výbušnin

Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s ambientními ionizačními technikami nachází své uplatnění také v oblasti analýzy výbušnin. Pomocí těchto technik lze detekovat stopová množství výbušnin např. TNT a RDX (obr. 23), PETN z různých povrchů např. z kovových povrchů, papíru, cihly, kůže, oblečení.<sup>6, 23</sup>

Pomocí ambientní techniky DAPCI byly analyzovány výbušniny 1, 3, 5 – cyklotrimethyltrinitramin tzv. RDX a 2 – methyl – 1, 3, 5 – trinitrobenzen tzv. TNT.



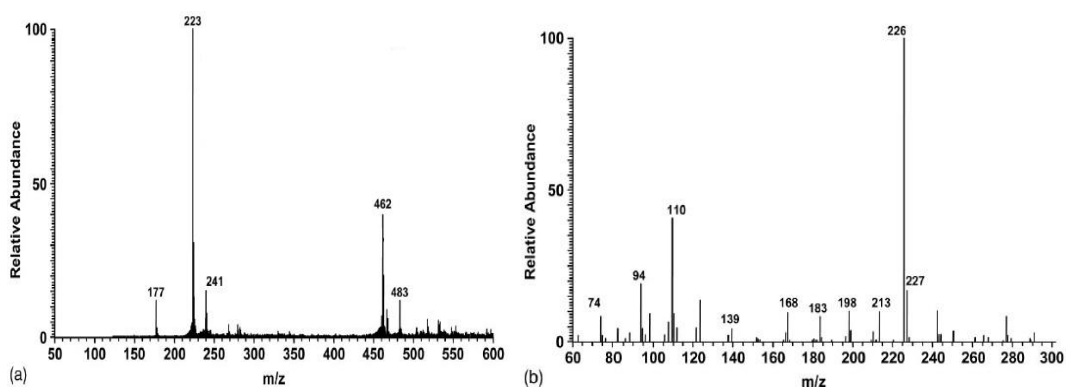
a)



b)

**Obr. 23.** Strukturální vzorce a) RDX, b) TNT.

Látky byly vneseny do čistého oblečení a posléze analyzovány technikou DAPCI. RDX byl detekován v pozitivním módu (obr. 24 a), kdy při hodnotách  $m/z$  223 byl pozorován pík protonované molekuly RDX. V tomto spektru se vyskytoval i pík hlavního fragmentu RDX při  $m/z$  177, který odpovídá ztrátě  $\text{NO}_2$ . Lze dosáhnout detekčního limitu 50 fg ( $S/N = 3$ ) RDX při analýzách z čistého oblečení. Druhá z výbušnin (TNT) byla analyzována v módu negativním (obr. 24 b), protože má nízkou protonovou afinitu. Pík  $m/z$  226 disponoval mnohem vyšší intenzitou než pík  $m/z$  227, pravděpodobně z důvodu upřednostňování deprotonizace. Z fragmentačních spekter je patrné, že pík  $m/z$  227 podléhá bohatší fragmentaci než pík  $m/z$  226. Ve fragmentačním spektru deprotonované molekuly ( $m/z$  226) jsou pozorovány píky 196 a 180 odpovídající ztrátě  $\text{NO}$  a  $\text{NO}_2$ . Ve fragmentačním spektru anion radikálu ( $m/z$  227), píky 197 a 212, odpovídají ztrátě  $\text{NO}$  a  $\text{CH}_3$ .<sup>13</sup> Je zřejmé, že část intenzity iontu  $m/z$  227 představuje izotopický pík 226.



**Obr. 24.** DAPCI spektrum a) RDX, b) TNT naneseného na oblečení. (převzato z cit.<sup>13</sup>)

Další ambientní technika, která se využívá při analýze výbušnin je desorpční elektrosprej. Umožňuje detekovat stopová množství výbušnin z různých povrchů např. papíru,

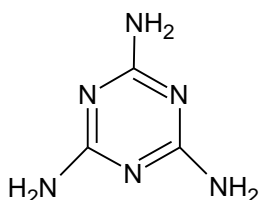
skla, plastu i kůže. Pomocí desorpčního elektrospreje se analyzovala směs čtyř výbušnin – RDX, HMX (cyklotetramethyltetranitramin), PETN (pentaerythrittetranitrát) a TNT (každá z nich v nanogramovém množství). Prováděly se dva způsoby nanesení směsi – a) směs výbušnin byla nanesena na horní vrstvu hustého krému, který se předtím aplikoval na bavlněný podklad, b) směs se prvně rozprostřela na bavlněný podklad a posléze zamaskovala vrstvou krému. V obou experimentech lze výbušninou směs detekovat, ale v druhém případě nebyly výbušniny prokázány ihned, nýbrž až po ztenčení (spotřebaování) vrstvy krému.<sup>23, 30</sup>

Technikou DESI se úspěšně detekovala výbušnina PETN o relativní molekulové hmotnosti 316, která poskytovala v negativním módu spektra obsahující ionty  $[M - H]^-$  a  $[M - NO_3]^-$ .<sup>8</sup>

### 2.3.3. Analýza potravin a potravinových příměsí

Další rychle se rozvíjející oblastí, ve které se uplatňují ambientní techniky hmotnostní spektrometrie, je analýza potravin.

Melamin (obr. 25) neboli 2,4,6 – triamino – 1,3,5 – triazin je organická sloučenina, která ve své struktuře obsahuje 66% dusíku.



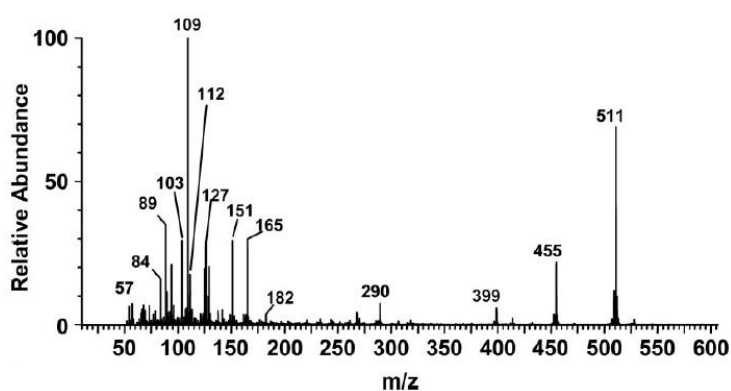
**Obr. 25.** Vzorec Melaminu.

Používá se při výrobě plastů, lepidel, umělých hnojiv atd. Jedná se o látku, která je čas od času nezákonně přidávána do potravin, aby maskovala nedostatečný obsah proteinů. Přítomnost melaminu v potravě může pro lidský i zvířecí organismus představovat riziko onemocnění i smrti. Bezpečné množství melaminu v potravinách stanovené „US Food and Drug Administration“ a EU je 2,5 mg/kg.<sup>31</sup> Ionizační technika DART ve spojení s TOF detektorem byla úspěšně použita k přímé detekci melaminu v zabaveném krmivu pro domácí zvířata. Limit detekce melaminu v těchto krmivech byl stanoven na 1 ppm.<sup>23, 31</sup> Techniku DART ve spojení s TOF – MS lze dále použít při analýze nealkoholických nápojů. Tato metoda umožňuje zjistit obsah umělých sladidel, cukrů a konzervantů bez složité přípravy



vzorku a chromatografické separace. Příkladem je analýza nealkoholického nápoje s obsahem cukrů v negativním módu, ve spektru lze pozorovat pík kyseliny askorbové ( $m/z$  175), hexosy ( $m/z$  179), kyseliny citronové ( $m/z$  191) a pík disacharidu ( $m/z$  341).<sup>32</sup>

V řadě potravinových analýz se využila také ionizační technika DAPCI. Pomocí této techniky byl proveden rychlý screening zkaženého rybího masa, které se ponechalo po dobu 6 hodin při pokojové teplotě okolo 28 °C. Ve spektru (obr. 26) lze sledovat píky protonovaných molekul dvou známých látek charakterizující zkažené maso – putrescin ( $m/z$  89) a kadaverin ( $m/z$  103). Látky byly identifikovány kolizí indukovanou disociací (CID), kde u obou docházelo ke ztrátě amoniaku a methylaminu z původního prekurzoru.<sup>13</sup>



**Obr. 26.** DAPCI spektrum zkaženého rybího masa (převzato z cit.<sup>13</sup>)

Uvedenou ionizační technikou se dále detekovala stopová množství příměsí v rajčatové omáčce. Typickým zakázaným aditivem do omáček je v mnoha zemích sudan I, II, III, IV z důvodů možné karcinogenity. Připravilo se 10  $\mu$ l roztoku směsi sudanů, ve které bylo obsaženo 10 pg sudanu I, IV a 5 pg sudanu II, III. Tato směs vytvořila skvrnu (kapku) okolo 10 mm<sup>2</sup> na povrchu tomatové omáčky (cca 2g). Detekovaly se protonované molekuly jednotlivých sudanů. Intenzity píků odpovídaly množství jednotlivých sudanů ve směsi – píky sudanů I a IV měly dvojnásobně vyšší intenzitu než píky sudanů II a III. Výsledky fragmentačních analýz se shodují s dřívějšími daty získanými pomocí APCI nebo DESI – MS.<sup>13</sup>

Samozřejmě aplikace směsi sudanů na povrch vzorku rajčatové omáčky neodpovídá realitě. V reálném vzorku může být směs aditiv obsažena v rámci celého vzorku nejen na povrchu.

K rychlé detekci stopového množství reziduí pesticidů a herbicidů se použila technika DAPCI – MS. Příkladem je analýza atrazinu o relativní molekulové hmotnosti 215

aplikovaného na povrch nezralé dýně. Ve spektru byl dominantní pík protonovaného atrazinu. Detekce byla potvrzena kolizí indukovanou disociací.<sup>13</sup>

#### **2.3.4. Analýza inkoustů, barev a pravosti dokumentů**

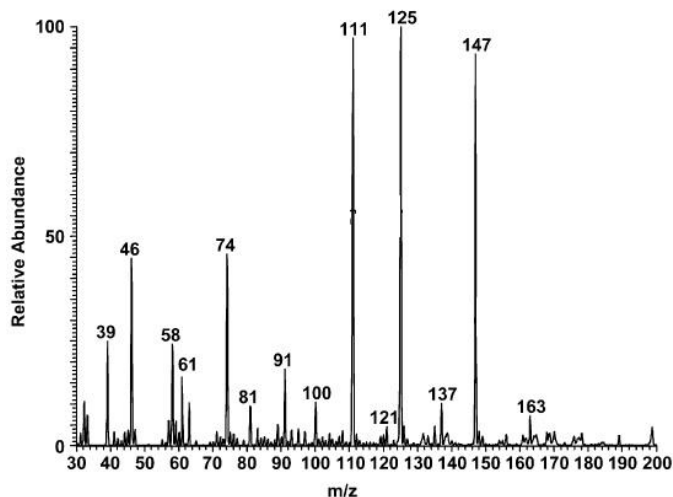
Ověřování pravosti dokumentů je rozhodující při určování skutečností u soudu. Často je vyžadována analýza inkoustů (barev) použitých v dokumentech, což dovoluje identifikovat, zda nedošlo v dokumentu k nějakým změnám. Obvykle se analýzy, týkající se určování pravosti listiny, provádějí na části dokumentu (výřezu). Prvním krokem je extrakce inkoustu (barvy) vhodným organickým rozpouštědlem, následuje separace pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.<sup>6</sup> Metody umožňující zobrazování povrchu dokumentu se jeví jako vhodné alternativy, které jsou nejen rychlejší a s menším rizikem poškození originálního dokumentu, ale také poskytují přesné detaily dokumentu.<sup>6</sup>

Modrá barva obsažená v propisovacích tužkách používána na obyčejném psacím papíru se zkoumala pomocí techniky DESI bez předchozí přípravy vzorku. Automatický posun vzorku dovoluje získat obraz dvourozměrné distribuce látek. Důležitou roli v procesu desorpce z papíru hraje rozpustnost analytu.<sup>33</sup> V jiných případech se získaly stejnou ionizační technikou 2D zobrazení vzorků různých barevných inkoustů nanesených na fotografickém papíru.<sup>34</sup>

Pomocí DART se analyzovalo 43 vzorků různých modrých a černých náplní do propisovacích tužek, černých gelových inkoustů aj. Ve spektru byly pozorovány zejména píky protonovaných molekul. Vzhled spektra je ovlivňován nejen barvivem, ale i pomocnými látkami obsaženými v náplních.<sup>35</sup>

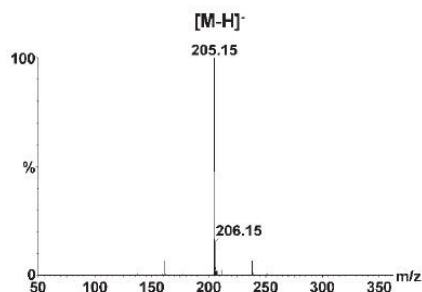
#### **2.3.5. Analýza kůže**

DAPCI technika byla použita k přímé detekci z kůže. Dimethyl – methylfosfonát (DMMP – imitující chemickou bojovou látku) byl nanesen na předloktí zdravého pravidelného kuřáka (5 – 8 cigaret denně). Pokus simuloval zasažení povrchu těla chemickou bojovou látkou. DMMP (obr. 27) se úspěšně potvrdil třemi píky –  $m/z$  125 představující protonovanou molekulu,  $m/z$  111 odpovídající aduktu vody a hlavního fragmentu a  $m/z$  147 byl připsán sodnému aduktu DMMP. Ve spektru byl pozorován i pík protonovaného nikotinu  $m/z$  163.



**Obr. 27.** DAPCI spektrum kůže ruky pravidelného kuřáka. (převzato z cit.<sup>13</sup>)

Tenká vrstvička gelu ibuprofenu se nanasla na lidský prst. Poté se gel jemně vmasíroval do kůže. Pomocí techniky DESI v negativním módu bylo po 20 minutách od aplikace gelu změřeno spektrum (obr. 28), které poskytovalo hlavní pík deprotonovaného ibuprofenu  $m/z$  205. Ve fragmentačních spektrech získaných DAPCI technikou byl při  $m/z$  161 pík odpovídající ztrátě  $\text{CO}_2$  z deprotonované molekuly ibuprofenu.<sup>7</sup>



**Obr. 28.** DESI spektrum gelu Ibuprofenu v negativním módu (převzato z cit.<sup>7</sup>)

Vybrané příklady dokumentují širokou použitelnost ambientních ionizačních technik ve forenzních vědách.

## 2.4. Opiáty

*Opiáty* jsou látky přirozeně se vyskytující v opiu (morfin, kodein) a látky semisyntetické (heroin, hydromorfon, oxykodon). Pojem *opioidy* v sobě zahrnuje navíc i látky syntetické (metadon). Jedná se o drogy s narkotickými účinky k tišení bolesti. Na tyto látky vzniká psychická i fyzická závislost. Způsobují výkyvy nálad (euforie, zklidnění), třes, nespavost atd.

*Opium* představuje gumovou hmotu ze zaschlé šťávy z naříznutých nezralých makovic máku setého (*papaver somniferum album*). Tato šťáva obsahuje směs přibližně 23 alkaloidů. Účinnou látkou většiny přírodních a semisyntetických opiátů jsou alkaloidy morfin, jeho deriváty nebo kodein.<sup>36, 37</sup>

### **Morfium (morfin)**

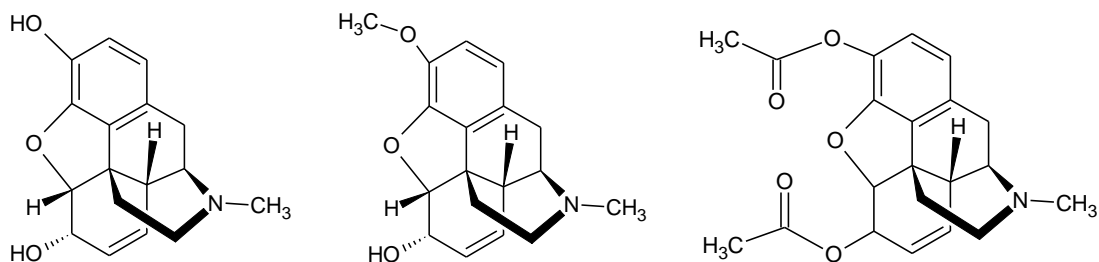
Morfin je hlavní přirozený alkaloid obsažený v opiu, který tvoří přibližně 10% hmotnosti opia. Morfium je spjato s německým lékárníkem F.W.A. Sertünerem, kterému se v roce 1804 podařilo izolovat „organickou bázi“ z opia. Z této báze o dva roky později vyrobil čistou morfinovou bázi. Od roku 1828 se začalo s tovární výrobou morfia. Látka získala název podle řeckého boha snu a spánku Morpheia. Morfium se využívá v lékařství jako silné analgetikum (k tišení bolesti), ale také slouží jako surovina k výrobě dalších opioidů morfinového typu např. kodein, diacetylmorfin (heroin).<sup>36, 37</sup>

### **Kodein (methylnorfin)**

Poprvé byl izolován kolem roku 1832 jako nečistota, která se vyskytovala ve várce při výrobě morfinu. Nejčastěji se získává methylací morfinu, přestože se vyskytuje v opiu i samostatně.

### **Heroin (diacetylmorfin)**

Jedná se o polosyntetický opioid, který se vyrábí acetylací morfinu. Poprvé byl heroin syntetizován v roce 1874. Posléze se začal vyrábět jako znamenitý prostředek k uklidnění. Od roku 1925 se stala výroba heroinu ilegální a byl zařazen k tvrdým drogám. Funguje podobně jako morfin jen s tím rozdílem, že stačí mnohem menší dávka.<sup>36, 37</sup>



**Obr. 29.** Struktury morfinu, kodeinu a heroinu.

### 2.4.1. Metabolismus opiátů

Morfin je metabolizován v játrech glukuronidovou konjugací za vzniku hlavního metabolitu inaktivního morfinu – 3 – glukuronidu. Druhým důležitým metabolitem je aktivní morfin – 6 – glukuronid. Morfin – 3 – glukuronid se vylučuje močí, zatímco druhý aktivní metabolit v krvi zůstává a způsobuje analgetické účinky. Heroin nedisponuje biologickou aktivitou, ale rychle se metabolizuje na 6 – acetylmorfin, který se posléze hydrolyzuje v játrech na morfin. Kodein se jen z části (přibližně 10%) pomalu přeměňuje v játrech na morfin.<sup>38</sup>

### 2.4.2. Předběžné metody pro detekci opiátů

Předběžné testování hraje důležitou roli ve forenzní toxikologii. Jedná se o jednoduchá, robustní zařízení, která obvykle fungují na principu dobře známých barevných reakcí. Úkolem je vzorky selektovat, vybrat jen ty podezřelé, které se podrobují dalšímu vyšetřování. Narcopouch® (ODV Inc., Paris, ME, USA) je sada barevných testů k detekci opiátů, amfetaminů, kokainu, kanabinoidů atd. z pouličních vzorků. Testy jsou založeny na principu barevné reakce s několika činidly např. Marquisových činidlem, Ehrlichovým činidlem, Fast Blue B. Dalším příkladem předběžného testování je sada Herosol® (Mistral Detection Ltd., Jerusalem, Israel), jehož balení obsahu speciální testovací papírek a činidlo k postřiku. Princip této detekce je založen na otření podezřelého povrchu (např. kůže) speciálním papírkem, který je následně postříkán Herosolem. Fialové zbarvení indikuje přítomnost heroinu. K předběžnému testování se také používají imunochemické testy Drug Wipe a Drug Wipe II (Securetec AG, Germany), které umožňují detekovat zneužívané drogy z různých povrchů např. ze zavazadel, cestovního pasu, peněz dokonce i z kůže a jazyku. Mohou být použity k detekci drog ze slin či potu.<sup>39</sup>

Metody předběžného testování jsou používány i k ověřování drog v biologických tekutinách (moč). Většina těchto testů je založena na imunologickém principu schopném detekovat širokou skupinu zneužívaných drog např. benzodiazepiny, amfetaminy, kanabinoidy, kokain, opiáty. Imunologické testy reagují s celým (širokým) spektrem opiátů, nejsou natolik selektivní, aby rozeznaly morfin, jeho glukuronidy, kodein a další semisyntetické opiáty. Výjimkou je CEDIA® 6 – AM test, který je selektivní na 6 – acetylmorfin, jakožto hlavní metabolit heroinu.<sup>39</sup>

Heroin je možno analyzovat v moči cca 48 – 96 hodin po dávce ve formě 6 – monoacetylmorfinu. Několik hodin po požití lze analyzovat volný morfin a cca 24 – 48 hodin po aplikaci ve formě konjugátů. Kodein lze analyzovat po cca 48 – 72 hodinách od požití. Při enzymaticko – imunologické analýze moči mají opiáty mezní hodnota 300 ng/ml.<sup>40</sup>

### 2.4.3. Analýza opiátů

K analýzám heroinu a dalších příbuzných nelegálních opiátů byl využit u řady experimentů systém tenkovrstevné chromatografie (TLC), kde se jako nejlepší jeví systémy chloroform : cyklohexan : diethylamin v poměru (8 : 10 : 3) nebo toluen : diethylamin (85 : 15).<sup>39</sup>

Klasickou metodou používanou při analýze opiátů je plynová chromatografie, ale opiáty jsou často také analyzovány pomocí kapalinové chromatografie i kapilární elektroforézy.<sup>39</sup>

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem umožňuje nejen důkaz přítomnosti cizích substancí v moči, ale také jejich odlišení. Při analýze moči pomocí plynové chromatografie s hmotnostním analyzátozem bylo dosaženo meze detekce opiátů 25 ng/ml.<sup>40</sup>

Metoda GC – MS byla použita ve forenzní toxikologické analýze k detekci 6 – acetylmorfinu v moči jakožto specifickému metabolitu heroinu. Prvně byl 6 – acetylmorfin izolován alkalickou extrakcí tuhou fází (SPE) posléze následovala derivatizace pomocí anhydridu pentafluoropropanového (PFPA) činidla. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí GC – MS, při čemž bylo dosaženo detekčního limitu 2 µg/l. Tento metabolit lze izolovat z moči i pomocí extrakce kapalina – kapalina s následnou derivatizací (propionylací) a detekcí GC – EI – MS s detekčním limitem 0,8 µg/l.<sup>39</sup> Touto

technikou byly analyzovány drogy i v krvi. Morfin lze izolovat z krve i plazmy extrakcí kapalina – kapalina při pH = 9. Vzorek byl poté upraven derivatizačním činidlem PFFA a analyzován GC – EI – MS. V krvi bylo dosaženo detekčního limitu 1 µg/l a v plazmě 0,2 µg/l.<sup>39</sup>

Technikou LC – ESI – MS byly charakterizovány pouliční vzorky heroínu. Chromatografická separace byla provedena na monolitické silikagelové koloně a mobilní fází s gradientem ACN : H<sub>2</sub>O o průtoku 5 ml/min. Jedna analýza trvala přibližně 5 minut. Byly zaznamenány protonované molekulární ionty sedmi složek pouličního heroínu. V první minutě byl eluován morfin (m/z 286), před druhou minutou kodein (m/z 300), následně 6 – acetylmorfin (m/z 328) a papaverin (m/z 340). Po třetí minutě lze v chromatogramu pozorovat pík heroínu (m/z 370), kolem 4 minuty acetylkodeinu (m/z 342) a noskapinu (m/z 413). Jako osmý pík je pík interního standardu. Limit detekce se pohybuje v rozsahu 0,25 – 1 ng množství dávkované na kolonu.<sup>39</sup>

Využívají se různé kombinace kapalinové chromatografie s dalšími technikami k detekci řady metabolitů opiátů také v moči a krvi narkomanů např. RP – HPLC s elektrochemickou nebo UV detekcí po předchozí extrakci vzorku, kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, LC – APCI – MS po předchozí extrakci tuhou fází nebo LC – ESI – MS. Kapalinová chromatografie ve spojení s elektrosprejem a iontovou pastí sloužila k dopingové kontrole lidské moči na olympijských hrách v Aténách v roce 2004. Byly kontrolovány různé látky, mezi něž patřily i morfin a morfinylglukuronid. Díky vyšší polaritě se v čase 2,78 min. prvně eluoval morfinylglukuronid a poté v 5,63 minutě morfin. Z fragmentačních spekter protonovaného morfinylglukuronidu je zřejmé, že v prvním kroku fragmentace dochází ke ztrátě glukuronové kyseliny za vzniku protonovaného morfinu. Podle iontu m/z 201, který byl ve fragmentačním spektru morfinu nejintenzivnější, byla provedena kvantifikace. Limit detekce morfinu a morfinylglukuronidu byl 0,11 µg/l; 0,097 µg/l a limit kvantifikace byl stanoven na 0,36 µg/l u morfinu a 0,32 µg/l u morfinylglukuronidu. Během her nebyl zaznamenán žádný pozitivní případ na tyto látky.<sup>41</sup>

Pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) lze separovat kyselé a neutrální nečistoty z heroínu, které jsou posléze detekovány detektorem diodového pole (DAD) nebo laserem indukovanou fluorescencí (LIF). Technika MEKC se jeví obzvláště vhodná k analýze pouličních drog, protože nevyžaduje náročnou přípravu vzorku a zároveň poskytuje dobrou separaci. Kapilární elektroforézou s UV detektorem byl stanoven morfin

a morfin – 3 – glukuronid v moči. Před analýzou byly vzorky pouze filtrovány, okyseleny na pH 2 – 3 a centrifugovány. Limit detekce morfinu byl 0,2 mg/l a morfinu – 3 – glukuronid 0,5 mg/l. Stejnou metodou za použití jiného detektoru – iontové pasti, lze docílit nižšího limitu detekce 10 µg/l.<sup>39</sup> Po složitější předúpravě vzorků lze detekční limity dále snížit. Analyty ze vzorků moči narkomanů byly prvně extrahovány a separovány pomocí kapilární elektroforézy (CE) za použití β – cyklodextrinu. Následovala UV detekce při 214 nm, při které se dosáhlo detekčního limitu v rozsahu 10 – 20 ng/ml.<sup>39</sup>

#### **2.4.4. Analýza opiátů pomocí ambientních technik**

K přímým analýzám kostek opiátů byla využita i ionizační technika DAPPI. Jako sprejovací kapalina byl použit aceton nebo toluen. V přítomnosti acetonu byly ve spektru pozorovány píky protonovaných molekul morfinu m/z 286, kodeinu m/z 300, thebainu (paramorfinu) m/z 312, noskapinu m/z 414, papaverinu m/z 340 a jiných aktivních složek opia. V případě použití toluenu jako sprejovací kapaliny byl ve spektru pík protonované molekuly i pík kation – radikálu u morfinu, kodeinu a thebainu v ostatních případech jen pík protonované molekuly.<sup>25</sup>

Pomocí technik DESI – MS a DAPPI – MS byly prováděny experimenty, které zkoumaly efekty různých matric (rozpuštědla, moči) při analýzách benzodiazepinů a opioidů. Citlivost detekce drog v rozpuštědle (jako matrici) byla u obou ionizačních technik stejná (limit detekce se pohyboval v rozmezí 0,05 – 6 µg/ml), ale klesla při detekci drog v moči. Větší roli hrál matriční efekt moči u desorpčního elektrospreje, což ukazuje na lepší toleranci DAPPI k matričním efektům. Ionizační technika DAPPI byla také více citlivá při fragmentačních analýzách v moči. Díky vyšší tolerantnosti k matrici a nižším detekčním limitům drog v moči byla metoda DAPPI – MS/MS použita ke screeningu benzodiazepinů a opioidů. Bylo analyzováno pět skutečným vzorků moči získaných ze soudní pitvy. Získané výsledky byly srovnány s validovanou metodou GC – MS. Navzdory dobré tolerantnosti DAPPI techniky k matrici vzorky nešlo analyzovat neupravené. I po přípravě vzorků výsledky získané DAPPI – MS byly o něco horší ve srovnání s výsledky GC – MS nebo LC – MS, které měly vyšší citlivost, lepší selektivitu a opakovatelnost.<sup>42</sup>

Ačkoliv ambientní techniky jsou silný a rychlý nástroj k analýzám, v řadě případů je nutné pro dosažení potřebných výsledků mezní detekce provádět vhodnou úpravu vzorku.



### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Přístroje, chemikálie

K vlastnímu měření vzorků opiátů byl použit *hmotnostní spektrometr LCQ DUO* (Thermo – Finnigan) s iontovým zdrojem ESI a nanoESI.

K přípravě vzorků moči byl využit pH – metr (*Hanna instruments, Microprocessor*), centrifuga (*Hettich Zentrifugen, Schoeller*), váhy (*Mettler Toledo*). Extrakce tuhou fází byla prováděna pomocí přístroje *Supelco Visiprep<sup>TM</sup>* na SPE kolonkách *Waters OASIS MCX Cartridge*. Vzorky byly následně vysušeny na vyhřívaném bloku *EVATERM* za pomoci proudu dusíku.

Použité chemikálie: methanol HPLC grade (Fisher Chemical), amoniak p.a.  $\geq 25\%$  (Sigma Aldrich), octan amonný p.a. (Lachema), kyselina octová p.a. (Penta), chlorid sodný p.a. (Lachema), hydroxid sodný p.a. (Lachema), hydroxid draselný p.a. (Lachema), dihydrogenfosforečnan draselný 99,99% (Merck) a hydrogenfosforečnan draselný 99,99% (Merck), kyselina mravenčí p.a. (Sigma Aldrich), chloroform p.a. (Lach – Ner s.r.o.) a voda (upravená na přístroji (*Direct – Q VV Millipore*)).

Standardy:

*morfin* 99,8% (1mg/ml) v 1 ml methanolu;

*morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid* 99,5% (1mg/ml) v 1 ml metanolu s 0,05% NaOH (w/v);

*6 – acetylmorfin* 99,6% (1mg/ml) v 1 ml acetonitrilu;

*morfin – D3* 99% (100 $\mu$ g/ml) v 1 ml metanolu;

*morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid – D3* 99,7% (100 $\mu$ g/ml) v 1 ml metanolu s 0,05% NaOH (w/v);

*6 – acetylmorfin – D6* 98,7% (1mg/ml) v 1 ml acetonitrilu (vše Chromservis).

Další vzorky morfinu a 6 – acetylmorfinu poskytnuty Ústavem soudního lékařství.

Protonované molekuly sledovaných látek poskytují signál: **m/z 286** = *morfin*, **m/z 289** = *morfin – D3*, **m/z 462** = *morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid*, **m/z 465** = *morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid – D3*, **m/z 328** = *6 – acetylmorfin*, **m/z 334** = *6 – acetylmorfin – D6*.

## 3.2. Pracovní postup

### 3.2.1. Postup analýz na přístroji *LCQ DUO hmotnostní analyzátor*

Roztoky opiátů byly dávkovány mikrostříkačkou Hamilton do iontového zdroje (ESI) hmotnostního spektrometru průtokem 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Vzorky opiátů analyzované pomocí nanoESI byly nabrány do sprejovací kapiláry, která byla umístěna před vyhřívanou kapilárou (vstup do vakuované části hmotnostního spektrometru).

Intenzity iontů byly měřeny jako průměrná hodnota 50 skenů.

### 3.2.2. Postup extrakce kapalina – kapalina

4,9 ml moči se smíchalo s 50  $\mu\text{l}$  standardu (1mg/ml) a s 50  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1). Poté se provedly tři typy extrakcí kapalina – kapalina (viz tab. I.), při kterých bylo vždy vzato k analýze 500  $\mu\text{l}$ .

- A) 500  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku bylo okyseleno pomocí  $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) na  $\text{pH} = 3$ . Následovaly dvě extrakce vždy se 400  $\mu\text{l}$  chloroformu. Oba chloroformové extrakty byly spojeny. Poté se vzorek zalkalizoval pomocí  $\text{NaOH}$  na  $\text{pH}$  přibližně 9 a opět extrahoval dvakrát 400  $\mu\text{l}$  chloroformu, extrakty byly taktéž spojeny. Následně se extrakty vysušily ve vyhřívaném bloku za pomoci proudu dusíku. Odparky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1).
- B) 500  $\mu\text{l}$  vzorku se extrahovalo opět dvakrát 400  $\mu\text{l}$  chloroformu. Chloroformové extrakty byly spojeny. Vzorek zalkalizován pomocí  $\text{NaOH}$  ( $\text{pH} \sim 9$ ) a extrahován dvakrát 400  $\mu\text{l}$  chloroformu (extrakty spojeny). Poté se extrakty vysušily ve vyhřívaném bloku za pomoci proudu dusíku. Odparky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1).
- C) 500  $\mu\text{l}$  vzorku se zalkalizovalo pomocí  $\text{NaOH}$  ( $\text{pH} \sim 9$ ) a extrahovalo dvakrát 400  $\mu\text{l}$  chloroformu (extrakty spojeny). Poté se extrakty vysušily ve vyhřívaném bloku pomoci proudu dusíku. Odparky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1).

	A)	B)	C)
	okyselení	-	-
první extrakce	extrakce	extrakce	-
	alkalizace	alkalizace	Alkalizace
druhá extrakce	extrakce	extrakce	Extrakce

**Tab. I.** Testované postupy extrakcí kapalin – kapalina.

### 3.2.3. Postup extrakce tuhou fází

4,9 ml moči se smíchalo s 50 µl standardu (1mg/ml) a s 50 µl CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O (1 : 1). Poté byly 2 ml tohoto vzorku upraveny pomocí 10 M KOH na hodnotu pH 8 – 9. Po úpravě se vzorek centrifugoval vždy 7 minut při 3000 ot/min.

#### KONDICIONACE

- 2 ml methanolu
- 2 ml 0,1 M fosfátového pufru (9,5 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) upraveného 10 M KOH na hodnotu pH 8 – 9
- Aplikace vzorku, průtok 1 – 2 ml/min.

#### PROMYTÍ

- 2 ml deionizované vody
- 2 ml 0,1 M acetátového pufru pH = 4
- 2 ml methanolu – vysušení sloupce vakuem (2 min.)

#### ELUCE

- 2 ml methanol/amoniak (98 : 2), průtok 1 – 2 ml/min
- Eluát vysušen pod dusíkem při teplotě max. 40°C

SPE byla provedena dvěma postupy. Prvním výše popsaným. Při druhém postupu se vzorek upravil na hodnotu pH 8 – 9 pomocí NH<sub>4</sub>OH a při kondicionaci byl fosfátový pufr nahrazen acetátovým pufrům upraveným NH<sub>4</sub>OH na hodnotu pH 8 – 9.

### 3.3. Podmínky ionizace opiátů

Pro iontový zdroj ESI bylo nastaveno sprejovací napětí 5 kV a průtok vzorku 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Při použití iontového zdroje ESI se pro dané látky naladila iontová optika a následně byly testovány parametry uvedené níže (viz kapitola 4. 1.). Shrnutí ionizačních podmínek tab. II.

	Morfin	Morfin - 3 $\beta$ – D – glukuronid
Průtok zmlžovacího plynu (arb. unit)	50	55
Teplota vyhřívání kapiláry	200°C	175°C
Napětí vstupu vyhřívání kapiláry	9 V	4 V
Offset prstencové elektrody (Tube Lens Offset)	20 V	5 V

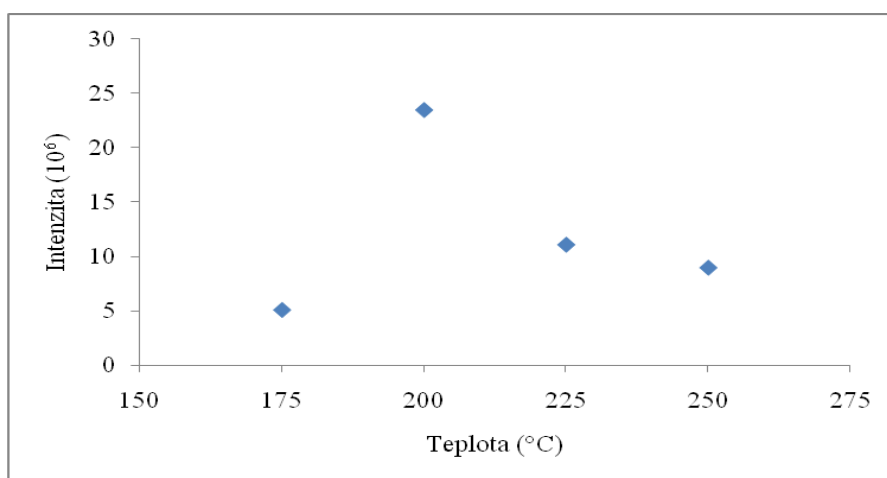
**Tab. II.** Shrnutí ionizačních podmínek ESI analýz.

Pro iontový zdroj nanoESI se sprejovací napětí pohybovalo v rozsahu 2,5 – 3 kV (přičemž většina dat byla naměřena při 3 kV). Napětí a teplota vstupu vyhřívání kapiláry byly nastaveny na 7 V a na 200°C, offset prstencové elektrody na hodnotu 15 V. Zmlžovací plyn se u ionizační techniky nanoESI nepoužívá.

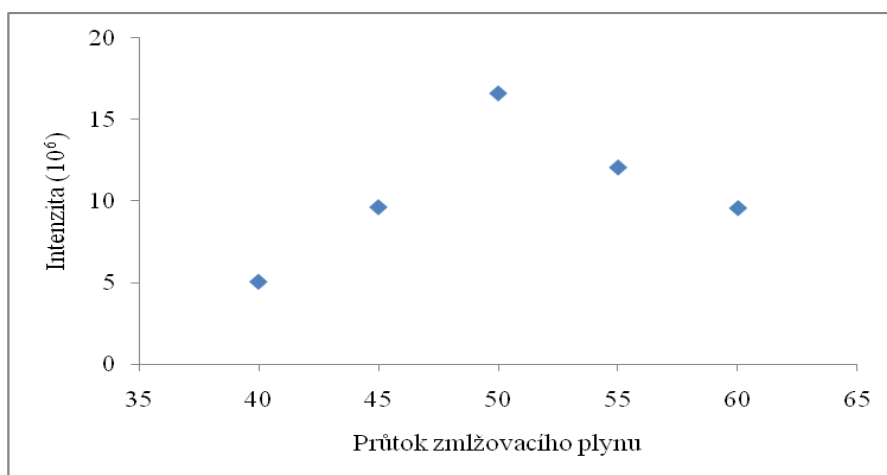
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Volba vhodných podmínek pro ionizaci vybraných opiátů

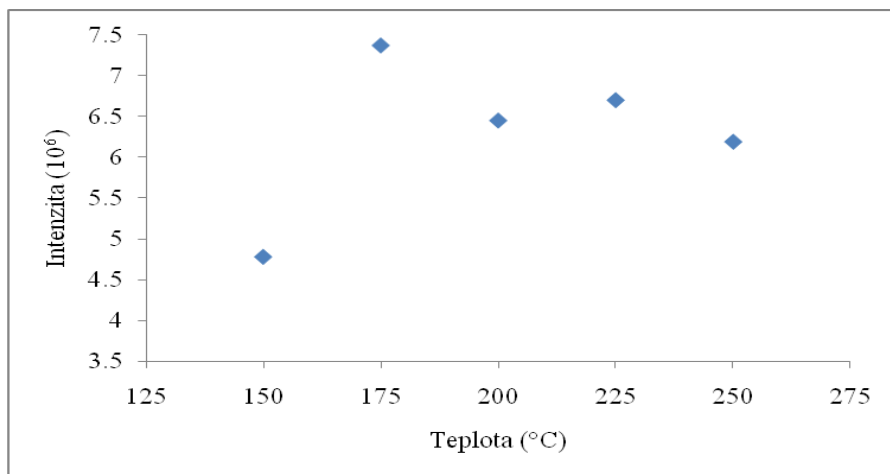
Technikou ESI byl sledován vliv teploty vyhřívané kapiláry v rozsahu 175 – 250°C pro morfin (10 mg/l) a v rozsahu 150 – 250°C pro morfin – 3β – D – glukuronid (10 mg/l). Při zvolené teplotě, kdy pro danou látku byla dosahována nejvyšší odezva, byl zoptimalizován průtok zmlžovacího plynu v rozsahu 40 – 60 arb. unit = arbitrary unit.



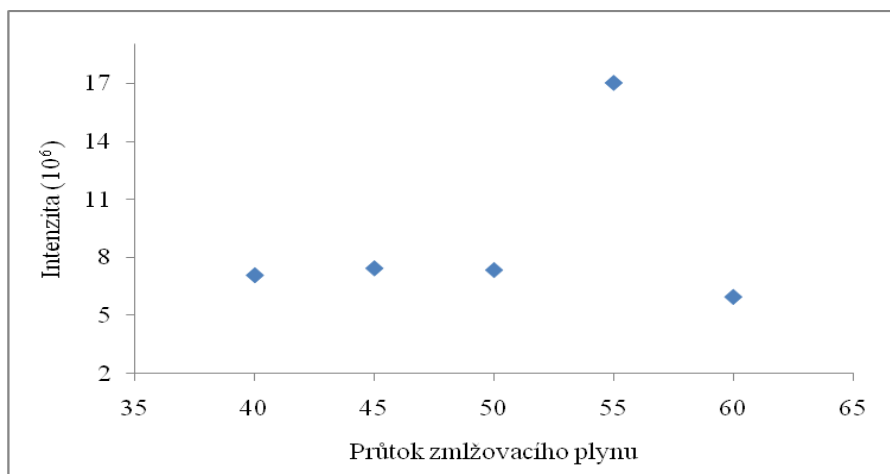
**Graf 1.** Závislost signálu iontu m/z 286 standardu morfinu (10 mg/l) na teplotě vyhřívané kapiláry.



**Graf 2.** Závislost signálu iontu m/z 286 standardu morfinu (10 mg/l) na průtoku zmlžovacího plynu.



**Graf 3.** Závislost signálu iontu m/z 462 standardu morfin – 3β – D – glukuronidu (10 mg/l) na teplotě vyhřívané kapiláry.



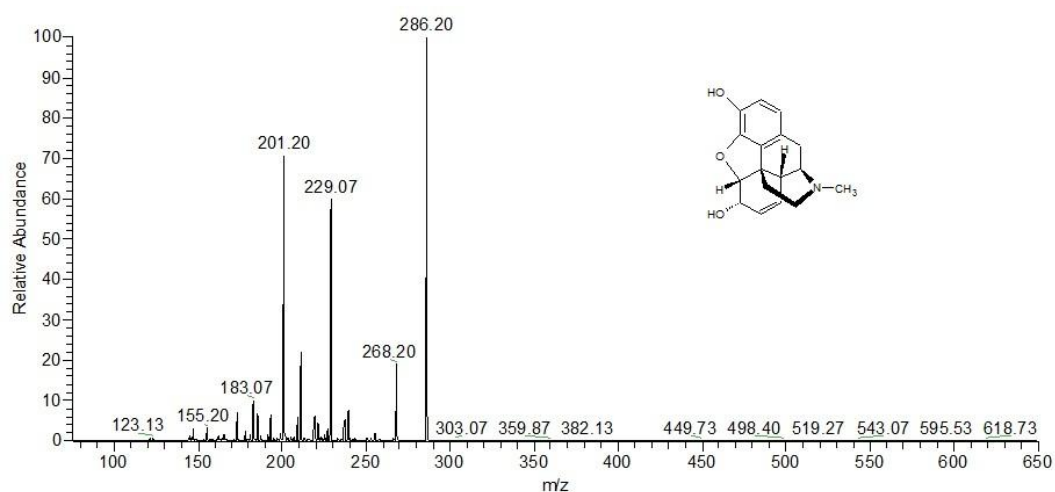
**Graf 4.** Závislost signálu iontu m/z 462 standardu morfin – 3β – D – glukuronidu (10 mg/l) na průtoku zmlžovacího plynu.

Na základě proměření teploty vyhřívané kapiláry a průtoku zmlžovacího plynu byly pro další experimenty vybrány pro dané opiáty tyto podmínky: morfin – 200°C, 50 abr. unit; morfin – 3β – D – glukuronid – 175°C, 55 abr. unit. Je zřejmé, že změna teploty vyhřívané kapiláry ani průtoku zmlžovacího plynu v hledaném intervalu (viz grafy 1 – 4) nehraje při měření zásadní roli. Změny signálu jsou nepatrné.

## 4.2. Fragmentační spektra standardů

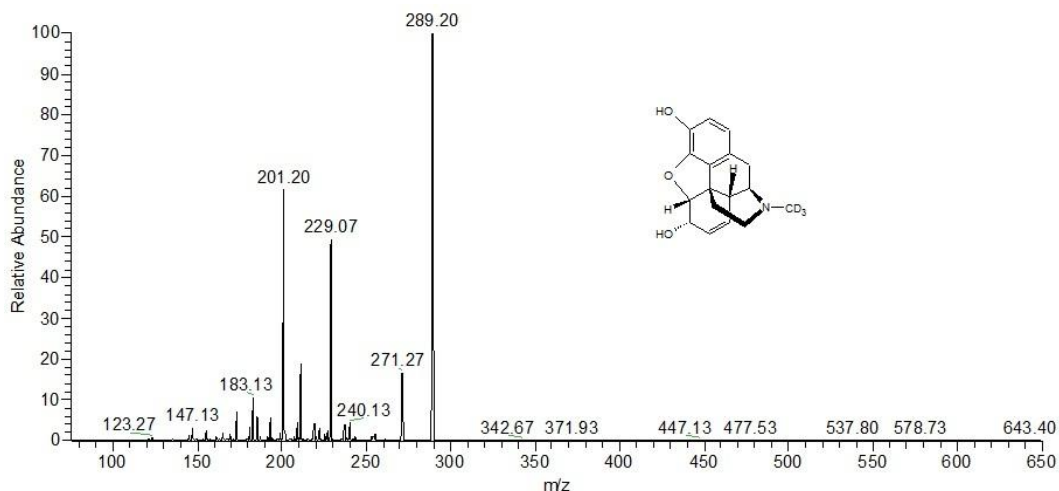
Jednotlivé roztoky opiátů byly zředěny  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) na koncentraci 2,5 mg/l a následně analyzovány pomocí ESI a fragmentovány v iontové pasti (kolizní energie 30%), (viz přílohy I). U značeného 6 – acetylmorfinu – D6 byla ověřena fragmentace standardu i po jeho ionizaci technikou nanoESI. Z výsledků vyplývá, že ionizační technika neovlivňuje fragmentační spektrum.

Protonovanou molekulu standardu morfinu lze pozorovat při  $m/z$  286. V jejím fragmentačním spektru (obr. 30) se nacházejí jako hlavní fragmenty  $m/z$  268,  $m/z$  229 a  $m/z$  201 (viz přílohy I.). První z fragmentů  $m/z$  268 odpovídá ztrátě  $\text{H}_2\text{O}$ . Fragment  $m/z$  229 představuje ztrátu 57 z původní molekuly, což odpovídá  $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ . Diference mezi  $m/z$  229 a posledním z hlavních fragmentů ( $m/z$  201) je 28. Ztráta 28 může odpovídat  $\text{C}_2\text{H}_4$  nebo  $\text{CO}$ .



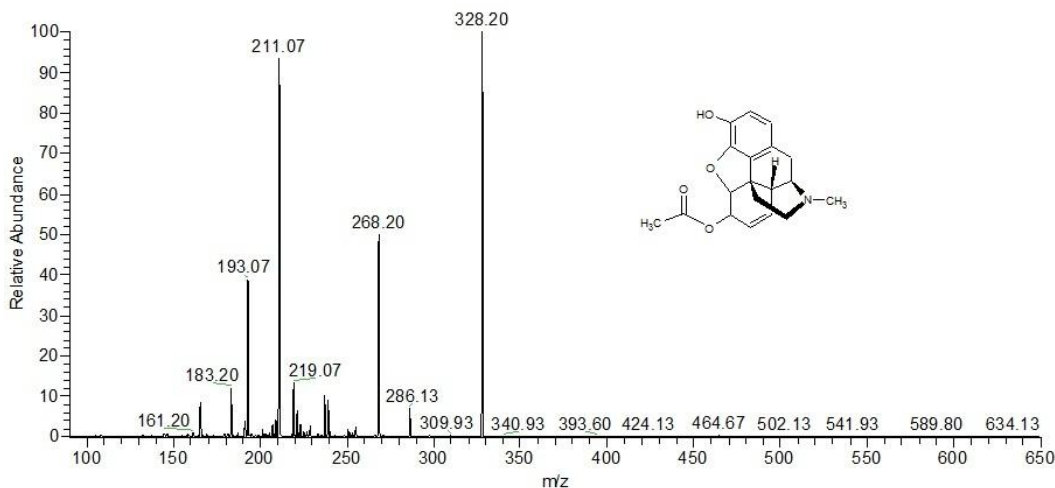
**Obr. 30.** Fragmentační spektrum iontu  $m/z$  286 standardu morfinu.

Protonovaná molekula značeného standardu morfinu se ve spektru vyskytuje při  $m/z$  289. Atomy deuteria jsou v molekule navázány v methylové skupině. Fragmentací  $m/z$  289 (obr. 31) byly získány hlavní fragmenty  $m/z$  271,  $m/z$  229,  $m/z$  201 (viz přílohy I.). Fragment  $m/z$  271 odpovídá opět ztrátě vody, druhý z hlavních fragmentů ( $m/z$  229) představuje úbytek 60 z původní molekuly, což poukazuje na odštěpení skupiny nesoucí deuteria ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{D}_3\text{N}$ ). Diference mezi  $m/z$  229 a  $m/z$  201 je 28. Tento rozdíl může představovat ztrátu  $\text{C}_2\text{H}_4$  nebo  $\text{CO}$ .



**Obr. 31.** Fragmentační spektrum iontu m/z 289 značeného standardu morfinu – D3.

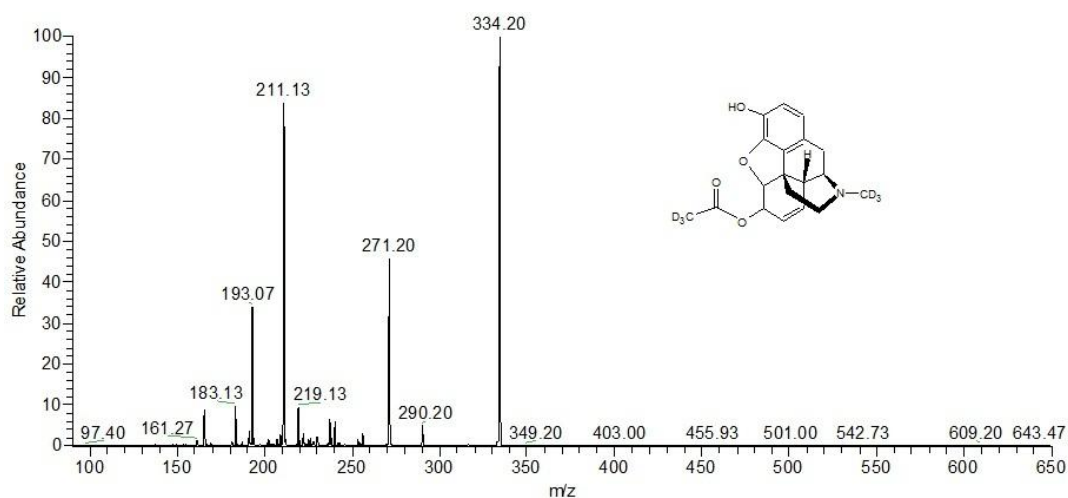
Protonovanou molekulu standardu 6 – acetylmorfinu lze ve spektru pozorovat při m/z 328. Tato protonovaná molekula poskytuje hlavní fragmenty (obr. 32) při m/z 268, m/z 211, m/z 193 (viz přílohy I.). První z hlavních fragmentů m/z 268 představuje ztrátu vody a acetylu. Diference mezi fragmentem m/z 268 a m/z 211 je 57 odpovídající opět ztrátě  $C_3H_7N$ . Rozdíl mezi m/z 211 a m/z 193 poukazuje na ztrátu vody.



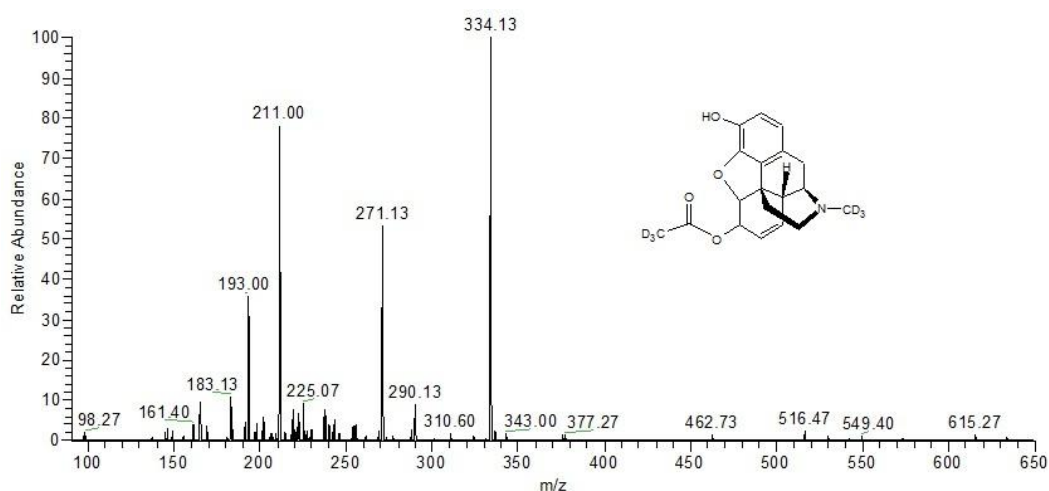
**Obr. 32.** Fragmentační spektrum iontu m/z 328 standardu 6 – acetylmorfinu.



Protonovanou molekulu značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 lze ve spektru spatřit při  $m/z$  334. Atomy deuteria jsou v molekule vázány v acetylové a methylové skupině. Pik  $m/z$  334 poskytuje hlavní fragmenty  $m/z$  271,  $m/z$  211,  $m/z$  193 (obr. 33), fragmentace viz přílohy I. Pro značený standard 6 – acetylmorfin – D6 byla provedena fragmentace jak po ionizaci ESI, tak po ionizaci nanoESI. Fragmentační spektra jsou téměř shodná (obr. 33 a 34). Fragmenty v pořadí  $m/z$  271,  $m/z$  211 a  $m/z$  193 představují ztrátu vody a acetylové skupiny obsahující tři deuteria, následně se odštěpuje  $C_3H_4D_3N$  a opět voda.



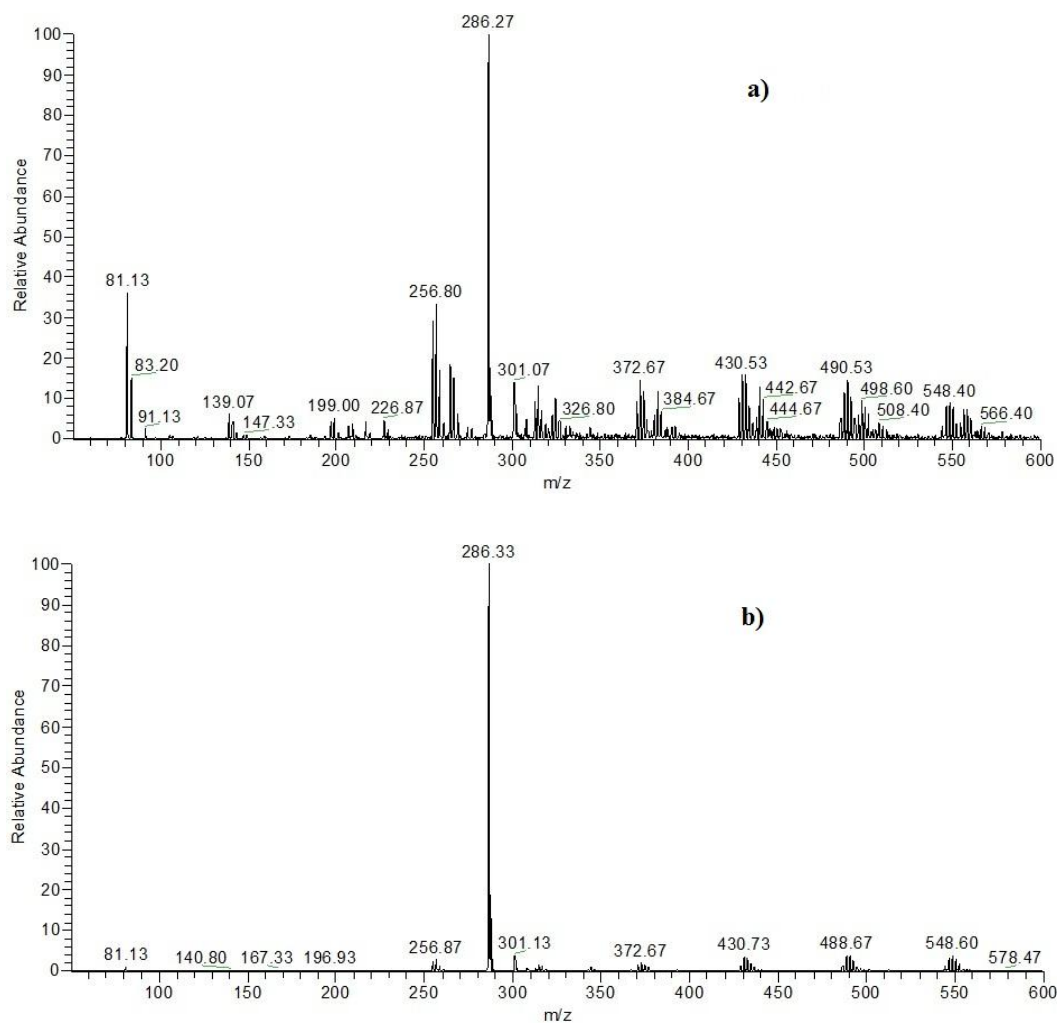
**Obr. 33.** Fragmentační spektrum iontu  $m/z$  334 značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 ionizační technikou ESI.



**Obr. 34.** Fragmentační spektrum iontu  $m/z$  334 značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 ionizační technikou nanoESI.

### 4.3. Měření zasolených vzorků technikou ESI a nanoESI

K roztoku morfinu o koncentraci 10 mg/l byl přidán chlorid sodný tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 10 mol/l. Ve spektru získané technikou ESI (obr. 35 a) lze kromě píku protonované molekuly  $m/z$  286 dále pozorovat zřetelné adukty chloridu sodného. Relativní intenzita těchto aduktů je ve spektrech získaných technikou nanoESI (obr. 35 b) významně nižší. Je zřejmé, že iontový zdroj nanoESI je tolerantnější k zasolení vzorku.



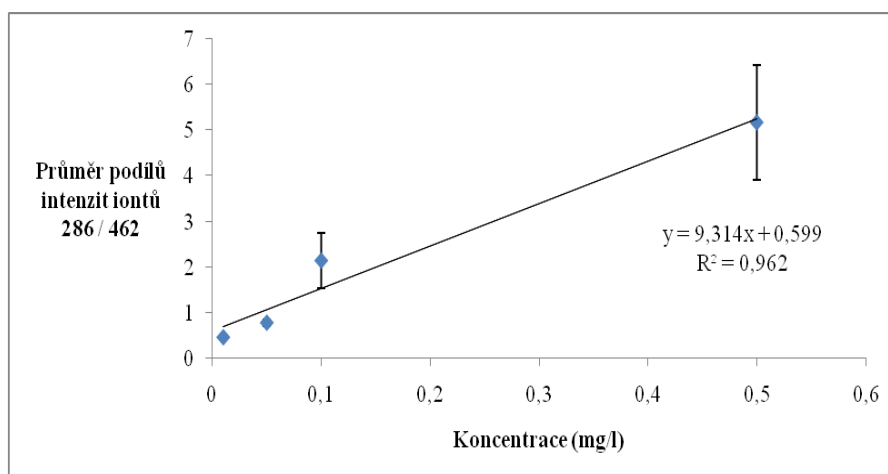
**Obr. 35.** Srovnání iontových zdrojů a) ESI, b) nanoESI při analýze zasolených vzorků.

#### 4.4. Kalibrační závislost bez použití značených standardů

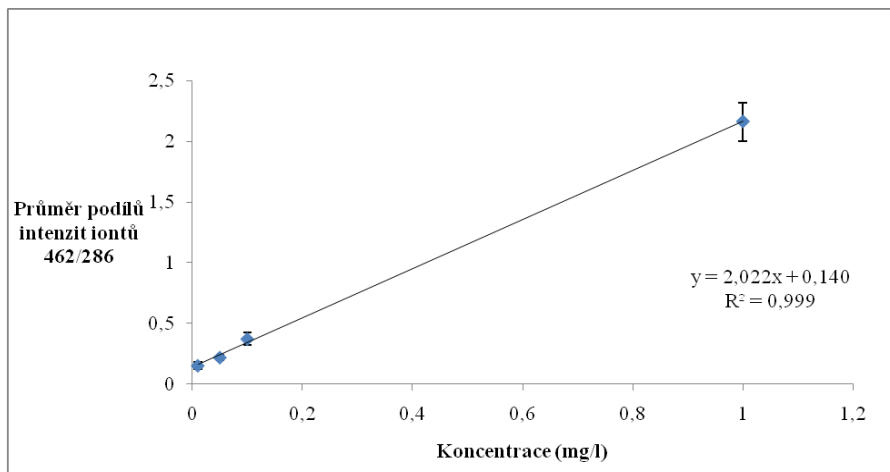
Bylo otestováno použití studovaných opiátů jako vnitřního standardu při stanovení. Kalibrační závislosti byly naměřeny na iontovém zdroji nanoESI pro morfin a morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid v rozsahu koncentrací 0,01 – 1 mg/l jako vnitřní standard byl použit pro morfin jeho glukuronid a naopak (graf 5, 6). Při dané koncentraci se provedly tři měření.

Takový to experiment by umožnil vyhnout se použití značených standardů, ale výsledky ukázaly, že pro kvantitativní analýzu není vhodný. Oproti použití deuterovaných standardů byly pozorovány větší směrodatné odchylky. Použití glukuronidu jako vnitřního standardu by bylo v principu možné u vzorků, které jsou zpracovány způsobem, kdy v měřeném roztoku glukuronid nemůže být přítomen (hydrolyza glukuronidu před extrakcí běžně prováděna v toxikologické laboratoři).

Toto řešení přináší problémy v odlišné efektivitě ionizace uvedených dvou látek nebo možné fragmentaci glukuronidu ve zdroji. Jako vhodné se pro účely stanovení jeví použití deuterovaných standardů i přes jejich vyšší cenu.



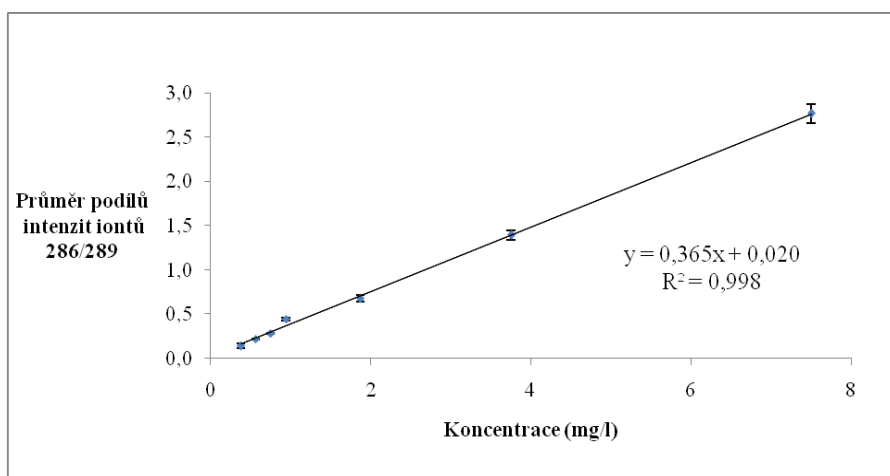
**Graf 5.** Kalibrační závislost pro morfin (m/z 286) bez použití značeného standardu. (Chybové úsečky odpovídají hodnotám směrodatných odchylek).



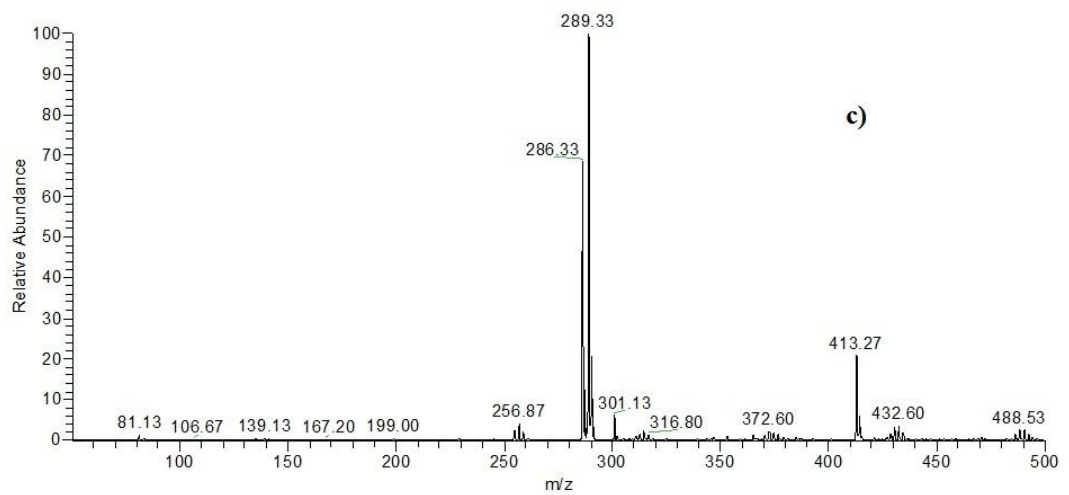
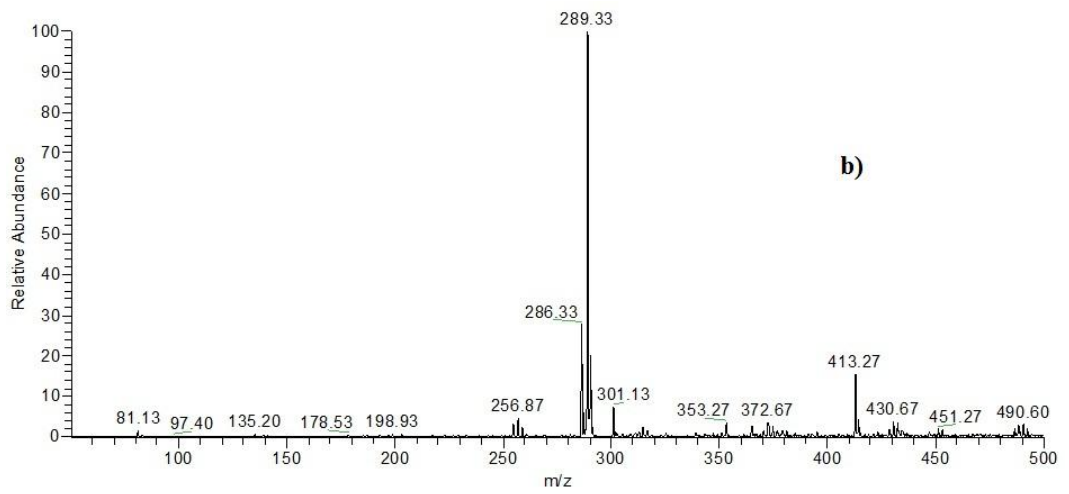
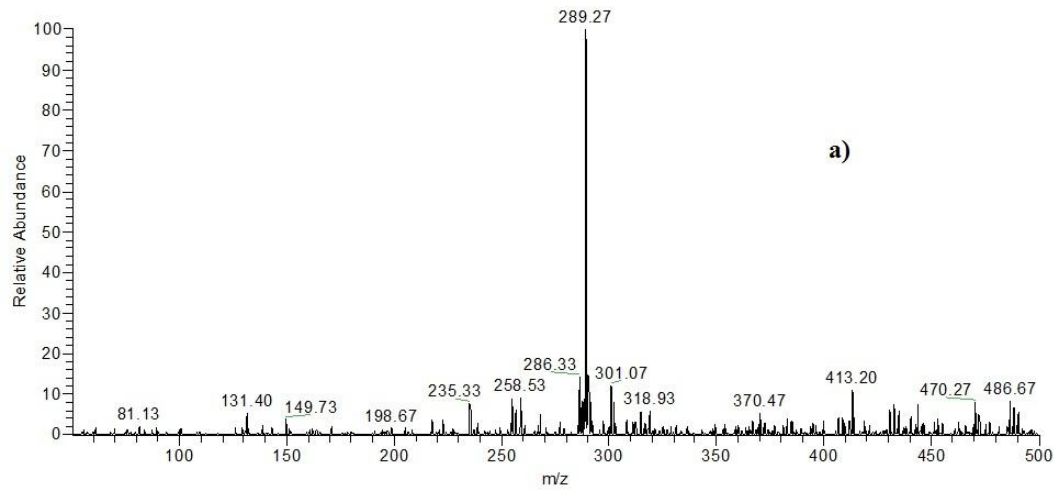
**Graf 6.** Kalibrační závislost pro morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid (m/z 462) bez použití značeného standardu. (Chybové úsečky odpovídají hodnotám směrodatných odchylek).

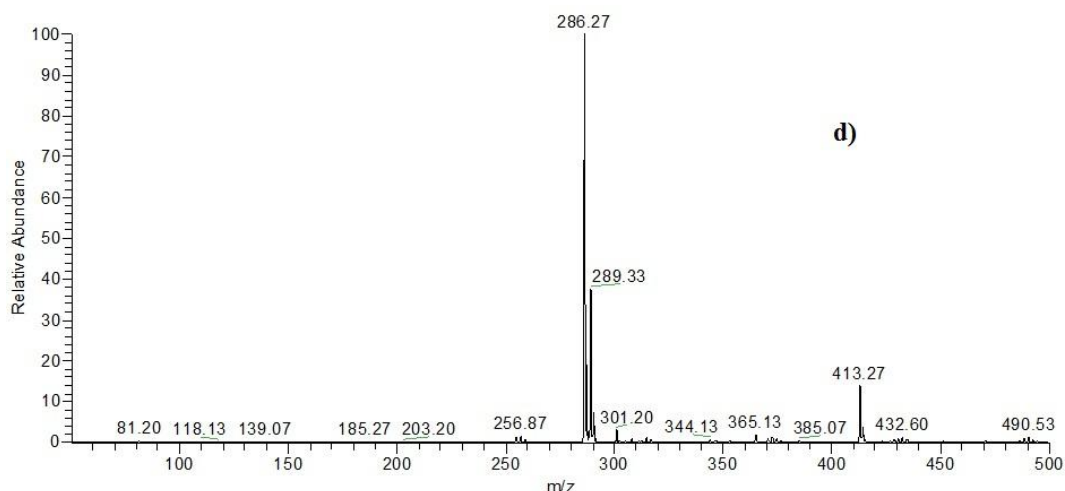
#### 4.5. Kalibrační závislost pro zasolené vzorky

Byly připraveny vzorky morfinu o výsledných koncentracích 0,375 mg/l; 0,56mg/l; 0,75 mg/l; 0,94 mg/l; 1,87 mg/l; 3,75 mg/l; 7,5 mg/l, které obsahovaly vnitřní standard (morfin – D3) o koncentraci 2,5 mg/l. Do těchto vzorků byl přidán chlorid sodný tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 10 mol/l. Tyto vzorky byly změřeny ionizační technikou nanoESI. V grafu 7 je vynesena kalibrační závislost průměr podílů intenzit iontů (m/z 286) / (m/z 289) na koncentraci (mg/l). Na obr. 36 jsou ukázána spektra při koncentracích a) 0,375 mg/l; b) 0,75 mg/l; c) 1,87 mg/l a d) 7,5 mg/l. Při dané jedné koncentraci bylo provedeno vždy pět měření.



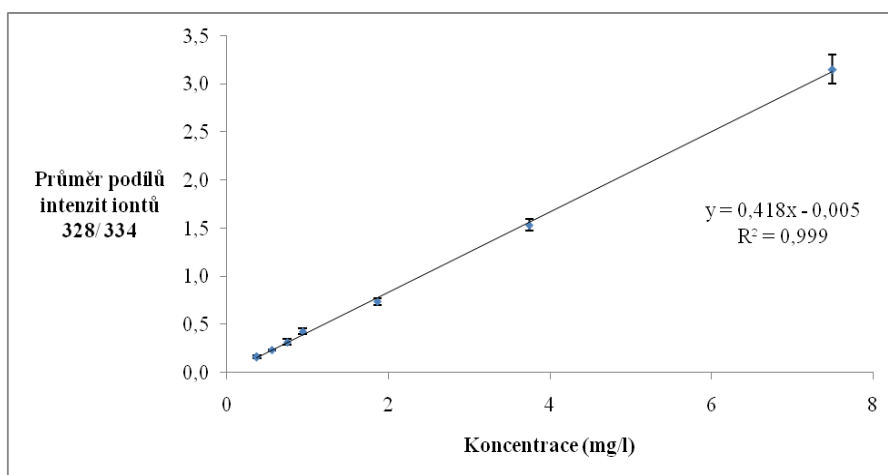
**Graf 7.** Kalibrační závislost pro vzorek zasoleného morfinu v rozsahu koncentrací 0,375 – 7,5 mg/l. (Chybové úsečky odpovídají hodnotám směrodatných odchylek).



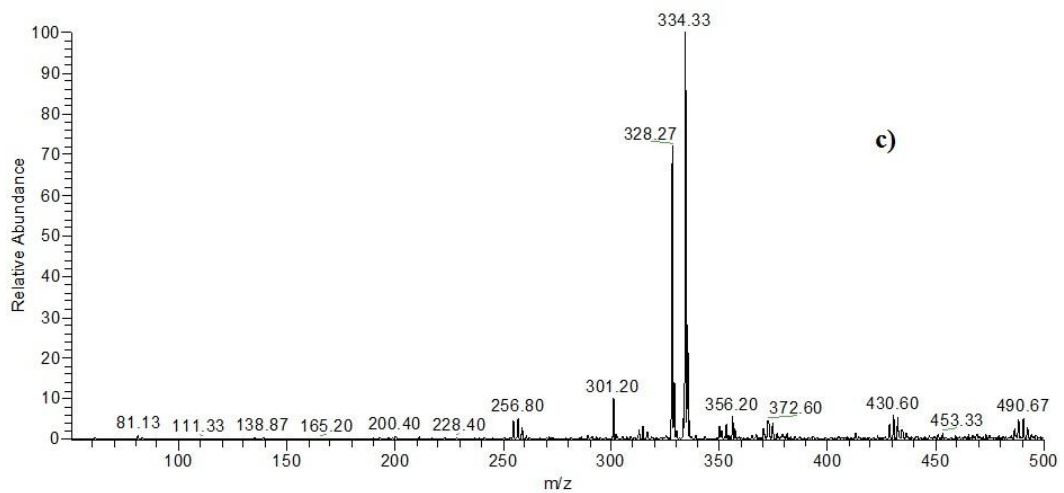
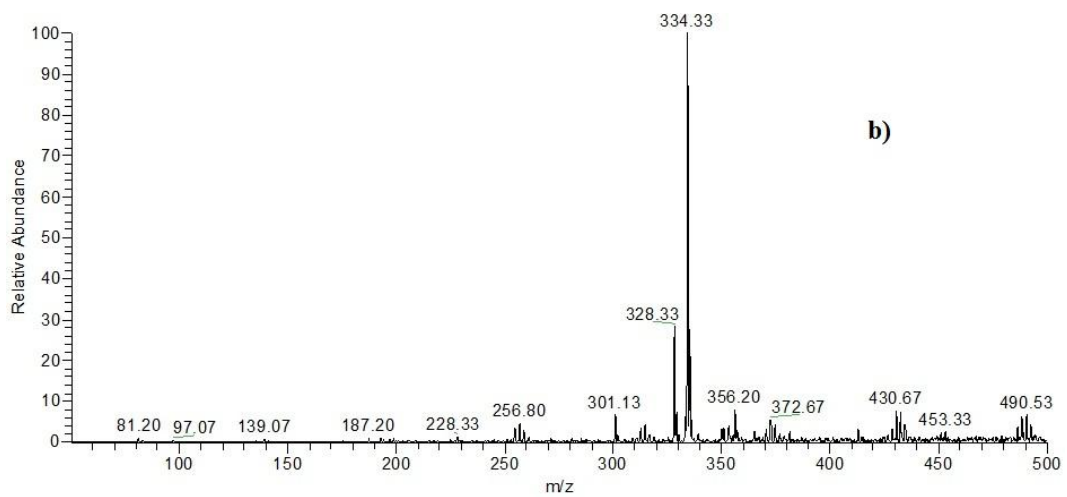
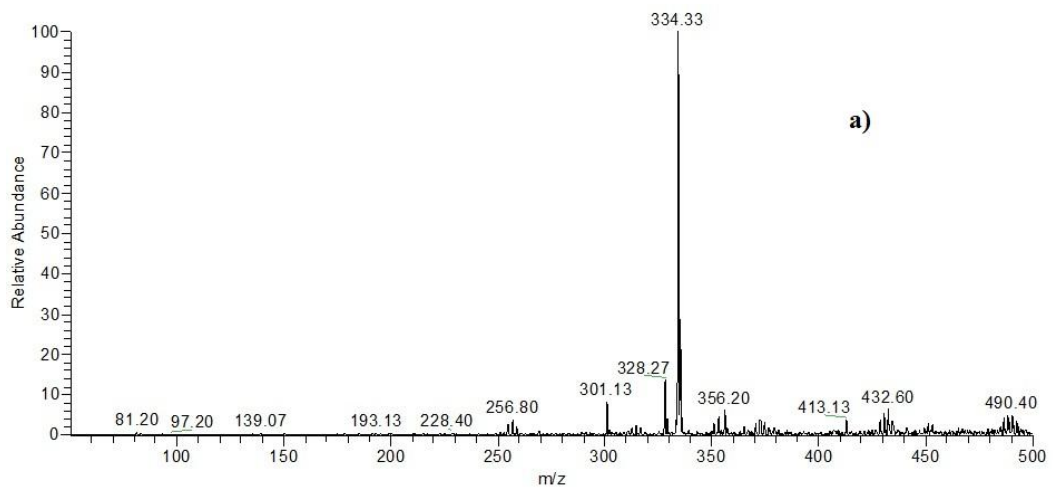


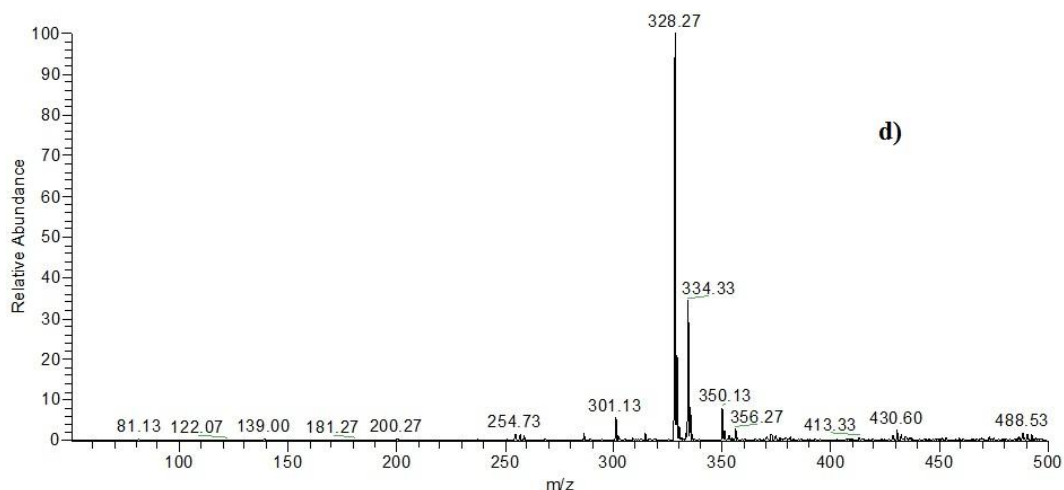
**Obr. 36.** Spektra zasolených vzorků morfinu o koncentracích a) 0,375 mg/l; b) 0,75 mg/l; c) 1,87 mg/l; d) 7,5 mg/l.

Byly připraveny vzorky 6 – acetylmorfinu v rozsahu výsledných koncentrací 0,375 mg/l – 7,5 mg/l, které obsahovaly vnitřní standard (6 – acetylmorfin – D6) o koncentraci 2,5 mg/l. Do těchto vzorků byl přidán chlorid sodný tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 10 mol/l. V grafu 8 je vynesena kalibrační závislost průměr podílu intenzit iontů ( $m/z$  328) / ( $m/z$  334) na koncentraci (mg/l). Na obr. 37 jsou vybrána spektra při koncentracích a) 0,375 mg/l; b) 0,75 mg/l; c) 1,87 mg/l a d) 7,5 mg/l. Při dané jedné koncentraci se provedlo vždy pět měření.



**Graf 8.** Kalibrační závislost pro vzorek zasoleného 6 – acetylmorfinu v rozsahu koncentrací 0,375 – 7,5 mg/l. (Chybové úsečky odpovídají hodnotám směrodatných odchylek).





**Obr. 37.** Spektra zasolených vzorků 6 – acetylmorfinu o koncentracích a) 0,375 mg/l; b) 0,75 mg/l; c) 1,87 mg/l; 7,5 mg/l.

Experimenty ukázaly možnost analyzovat zasolené roztoky opiátů pomocí nanoESI. Technika byla dále použita k analýze moči.

Pro zasolené vzorky morfinu a 6 – acetylmorfinu (z rozsahu prvních pěti kalibračních bodů – koncentrace 0,375 – 1,87 mg/l) byly vypočítány limity detekce ze vztahu:

$$DL = (3,3 * \sigma) / S$$

$\sigma$ .....směrodatná odchylka úseku (stanovena na základě kalibrace)

S.....směrnice kalibrační závislosti

Limit detekce pro morfin v zasoleném vzorku odpovídá 0,42 mg/l.

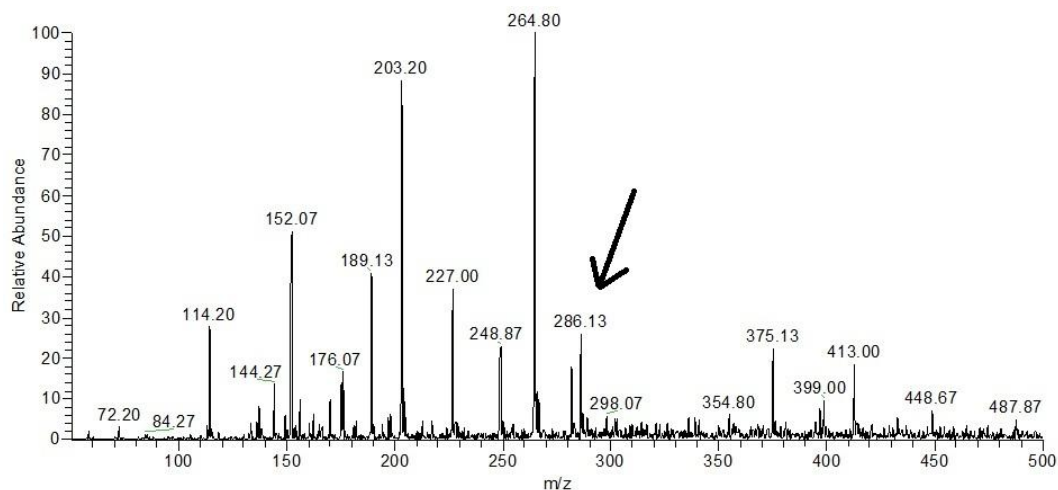
Limit detekce pro 6 – acetylmorfin v zasoleném vzorku odpovídá 0,19 mg/l.



## 4.6. Analýza moči

### 4.6.1. Analýza moči bez extrakce

Prvně se přímo analyzovaly vzorky moči s přidavkem morfinu a okyselení 5% HCOOH pomocí nanoESI o výsledné koncentraci 10 mg/l. Tyto vzorky se pouze filtrovaly přes mikrofiltr a poté přímo analyzovaly. Bylo zjištěno, že nelze morfin v moči analyzovat přímo, protože i při koncentraci 10 mg/l byla intenzita píku m/z 286 nízká (obr. 38), proto byly dále prováděny extrakce. Testovaly se různé přístupy k přečištění vzorku. Tyto postupy vycházejí z extrakce kapalina – kapalina a extrakce tuhou fází běžně používaných v toxikologické laboratoři.



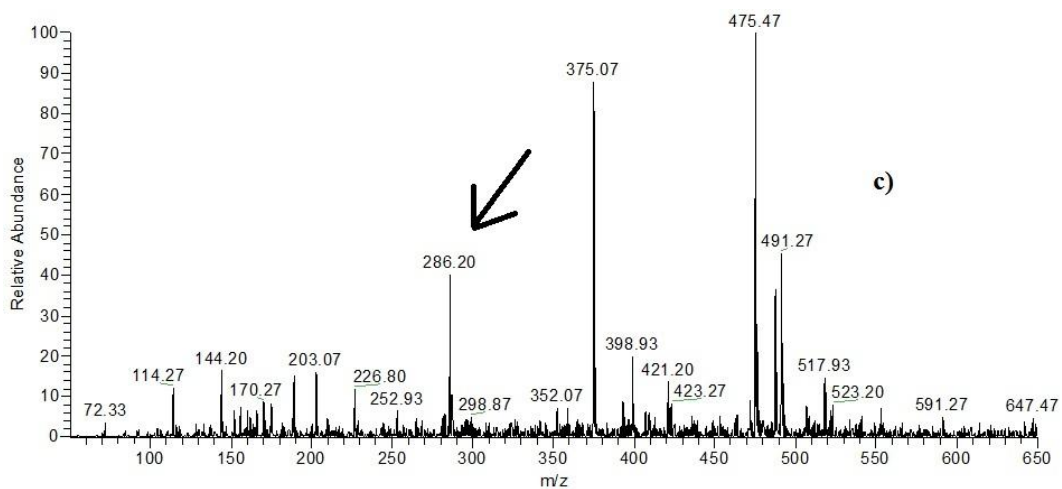
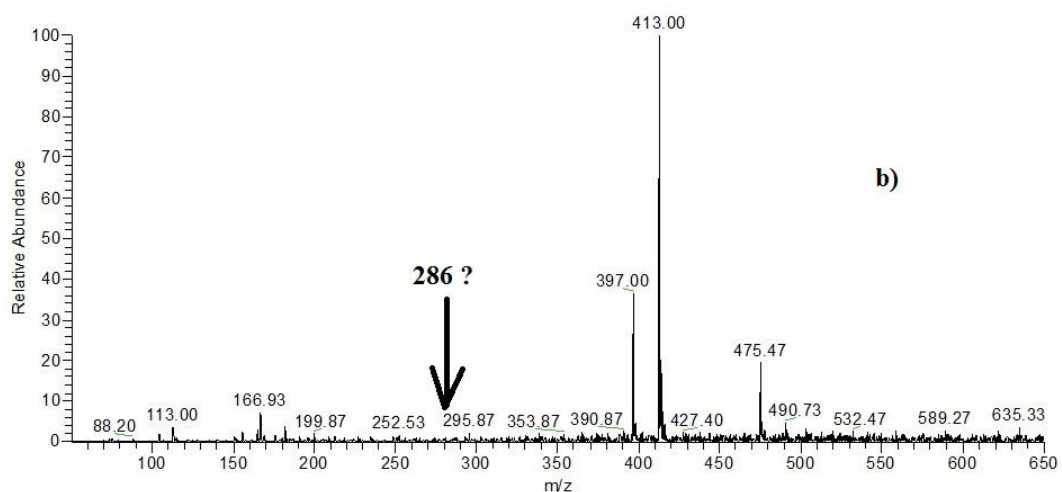
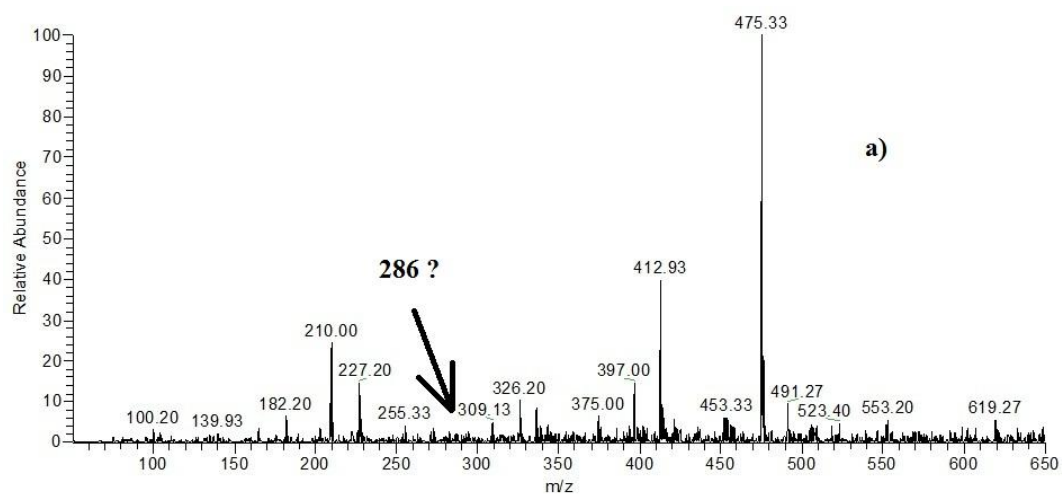
**Obr. 38.** Spektrum moči s morfinem a okyselení o výsledné koncentraci 10 mg/l.

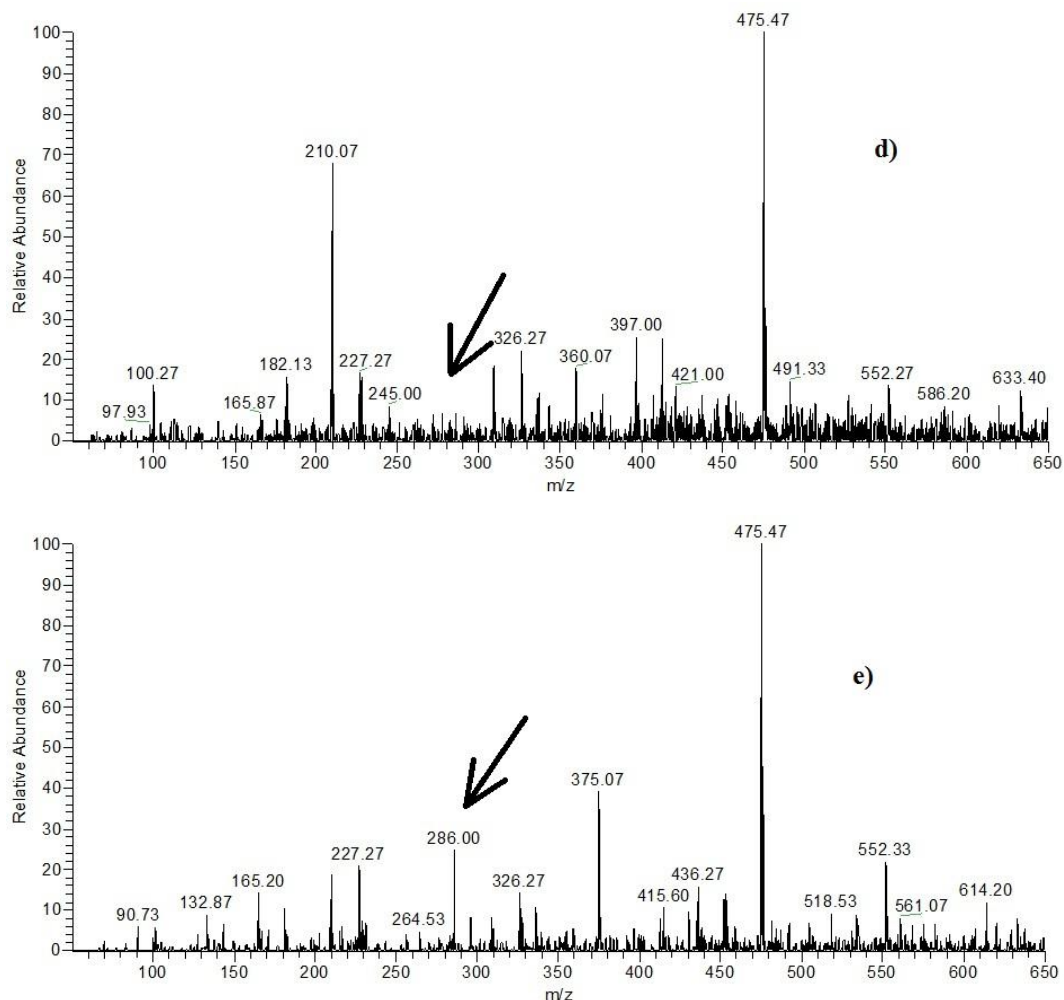
### 4.6.2. Analýza moči po extrakci kapalina – kapalina

Postup provedených extrakcí kapalina – kapalina je popsán viz kapitola 3.2.2. Analyzovalo se 5 získaných vzorků extraktů. Jednotlivá spektra jsou uvedena na obr. 39, z kterých vyplývá, že použití extrakce kapalina – kapalina pro tento typ vzorků (opiátů) není vhodná. Pík protonované molekuly morfinu o nízké intenzitě lze pozorovat jen v případě postupu B) – první extrakt (obr. 39 c) a při postupu C), kdy byl vzorek před extrakcí pouze zalkalizován (obr. 39 e).

Běžný postup používaný pro screening moči na toxikologicky významné látky, kdy se provádí tzv. kyselá a zásaditá extrakce (viz kapitola 3.2.2. – postup A) nebyl pozorován v měřených vzorcích signál morfinu. Při vynechání úpravy moči okyselením (viz kapitola

3.2.2. – postup B, C) je sice signál morfinu ve spektru viditelný, ale není dostatečný pro praktické použití.

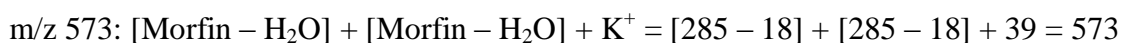
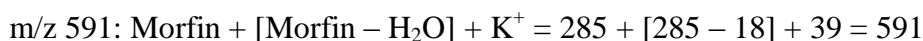




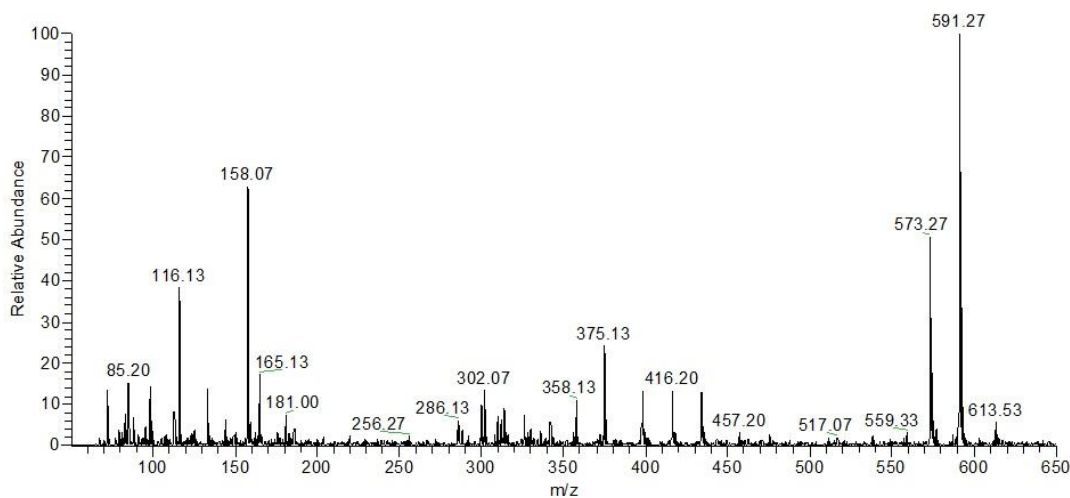
**Obr. 39.** a) Postup A (viz kapitola 3.2.2.) první extrakt  
 b) Postup A (viz kapitola 3.2.2.) druhý extrakt  
 c) Postup B (viz kapitola 3.2.2.) první extrakt  
 d) Postup B (viz kapitola 3.2.2.) druhý extrakt  
 e) Postup C (viz kapitola 3.2.2.) extrakt

#### 4.6.3. Analýza moči po extrakci tuhou fází

Jelikož extrakce kapalina – kapalina se nejevila jako dostatečně vhodná, další alternativou k předúpravě vzorků moči byla extrakce tuhou fází (SPE). Postup SPE je popsán výše v kapitole 3.2.3. První měření byla provedena bez úpravy vzorku na pH 8 – 9 a centrifugace, jen s fosfátovým pufrům. Obr. 40 obsahuje tato spektra, ve kterých jsou intenzivní píky při m/z 591 a m/z 573, které by mohly představovat:



Ani jeden z píků další experimenty nepotvrdily, proto se v dalších případech vzorek zalkalizoval a zcentrifugoval.



**Obr. 40.** Spektrum morfinu po SPE bez úpravy vzorku.

Před samotnou extrakcí byl vzorek moči zalkalizován (buď pomocí KOH nebo  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) a centrifugován po dobu 7 min. (3000 ot./min.).

1) Prvně se provedla SPE extrakce moči oběma postupy s použitím acetátového i fosfátové pufru při kondicionaci. Následně byl odparek rozpuštěn:

a) „fosfátový postup“

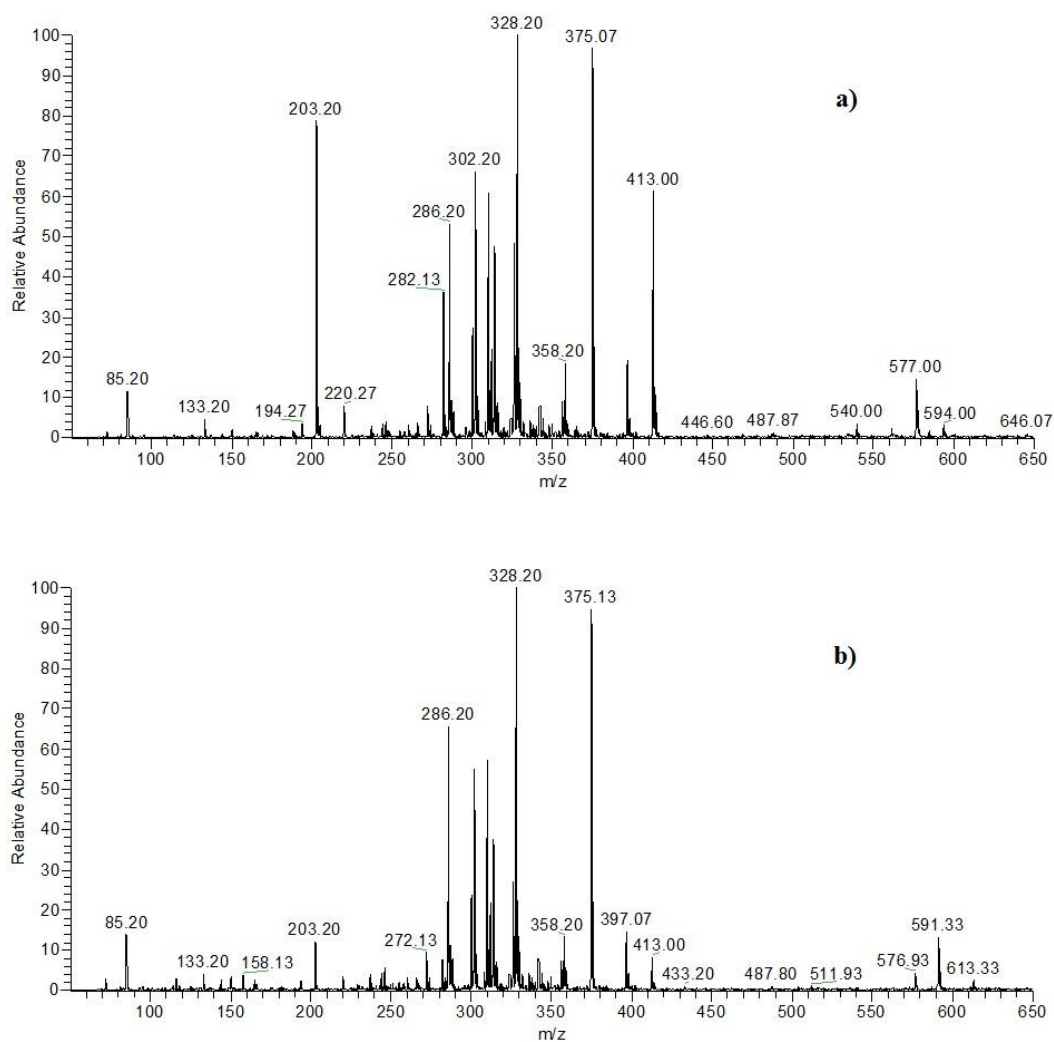
- první odparek rozpuštěn ve 180  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) + 10  $\mu\text{l}$  standardu morfinu (1mg/ml) + 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- druhý odparek rozpuštěn taktéž + bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  značeného standardu morfinu – D3 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- třetí odparek rozpuštěn ve 180  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) + 10  $\mu\text{l}$  standardu 6 – acetylmorfinu (1mg/ml) + 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- čtvrtý odparek rozpuštěn jako předchozí + bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

b) „acetátový postup“

- Stejný postup rozpuštění odparku jako při použití fosfátového pufru.

Spektra získaná pro tyto látky oběma postupy jsou podobná. Po SPE moči lze ve spektru píky standardů sledovat s dostatečnou intenzitou. Přidávky značených standardů byly malé, nelze je ve spektru pozorovat. Jako příklad jsou uvedena spektra (obr. 41)

se standardem 6 – acetylmorfinem. Z výsledků těchto analýz vyplývá, že po SPE matrice (moči) nedochází k rušení detekce opiátů, neprojevuje se vliv iontové suprese, jako je tomu u neupraveného vzorku. Extrakci tuhou fází lze využít k předúpravě vzorku moči. Měření ukázalo, že metoda úpravy vzorku využívána v toxikologických laboratořích s následnou GC – MS analýzou je taktéž použitelná i pro analýzy bez chromatografické separace.

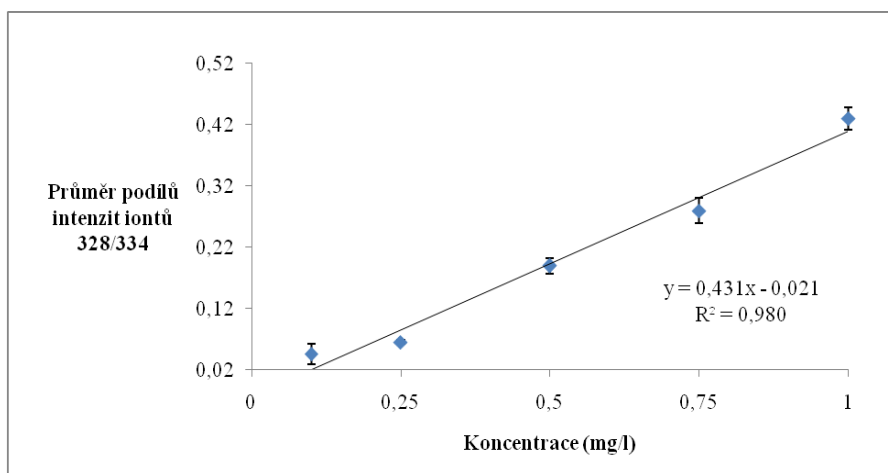


**Obr. 41.** Spektra moči po SPE a odpaření

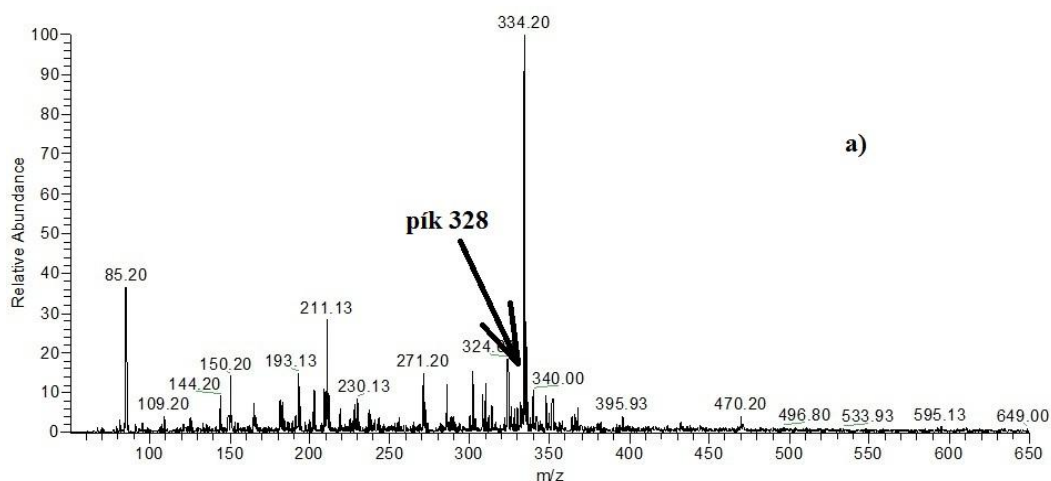
- A) „fosfátový postup“ s přidavkem 6 – acetylmorfinu,  
 B) „acetátový postup“ s přidavkem 6 – acetylmorfinu.

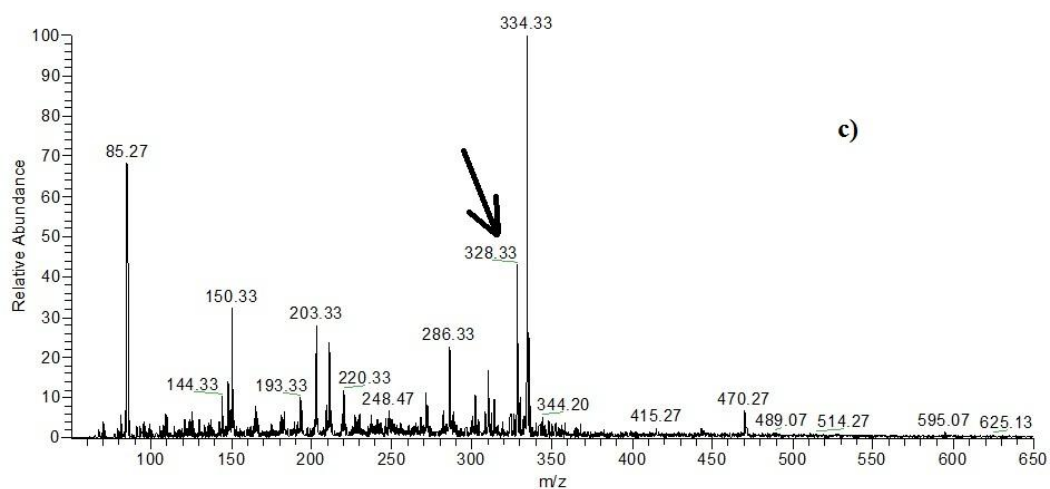
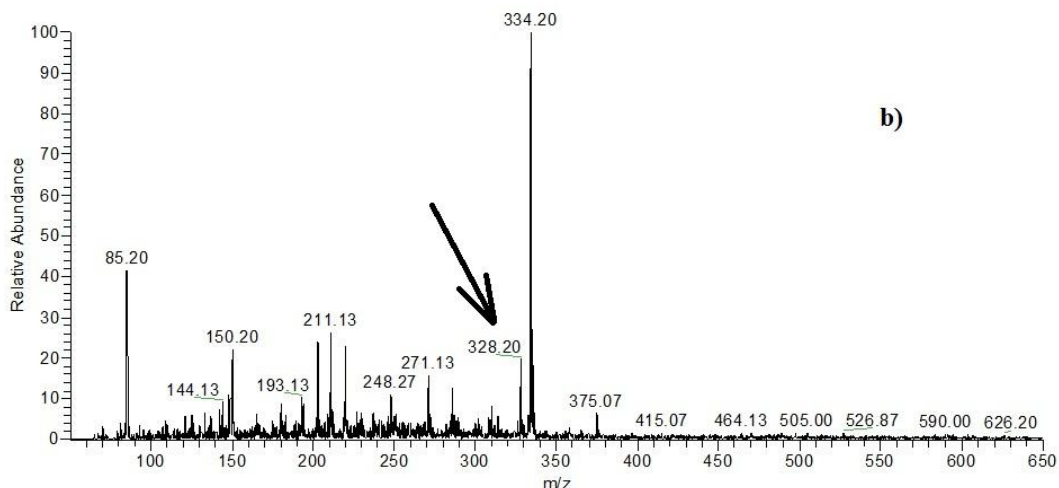
Proto dalším krokem analýzy byla SPE moči s přidavkem 6 – acetylmorfinu a značeného 6 – acetylmorfinu – D6. Po SPE byl odparek rozpuštěn ve 200  $\mu$ l  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  (1 : 1) okyselený 1%  $\text{HCOOH}$ . Byly provedeny tři extrakce při koncentracích v moči 0,1 mg/l; 0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1 mg/l. Přídavek značeného 6 – acetylmorfinu – D6

byl vždy 10 µl (1 mg/ml). Každý tento extrakt byl posléze analyzován pět krát. Pro všechny extrakty byly naměřeny i fragmentační spektra 6 – acetylmorfinu (m/z 328) a 6 – acetylmorfinu – D6 (m/z 334), která danou látku dovolují identifikovat (příloha II.). Byla získána kalibrační závislost v rozsahu 0,1 – 1 mg/l (graf 9). Na obr. 42 jsou zobrazena spektra moči s přidavkem 6 – acetylmorfinu a s přidavkem značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 po SPE o koncentracích a) 0,1 mg/l; b) 0,5 mg/l; c) 1 mg/l.



**Graf 9.** Kalibrační závislost 6 – acetylmorfinu v moči po SPE v rozsahu koncentrací 0,1 – 1 mg/l. (Chybové úsečky odpovídají hodnotám směrodatných odchylek).





**Obr. 42.** Spektra moči s přidavkem 6 – acetylmorfinu a značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 (1mg/ml) po SPE o koncentracích a) 0,1 mg/l; b) 0,5 mg/l; c) 1 mg/l.

Pro měření kalibrační závislosti v moči byl použit jiný vzorek 6 – acetylmorfinu a oproti předpokladu směrnice těchto závislostí nebyla 1, ale byla nižší. Z hmotnostního spektra je zřejmé, že v těchto vzorcích je přítomen morfin. Signál tohoto iontu (m/z 286) je významný. Přičemž při použití standardu 6 – acetylmorfinu dodaného firmou Chromservis tento ion pozorován nebyl (viz spektra kalibračních závislostí zasolených vzorků). Tento fakt, ukazuje na rozklad použitého vzorku.

Limit detekce pro 6 – acetylmorfin v moči se opět počítal ze vztahu:

$$DL = (3,3 * \sigma) / S$$

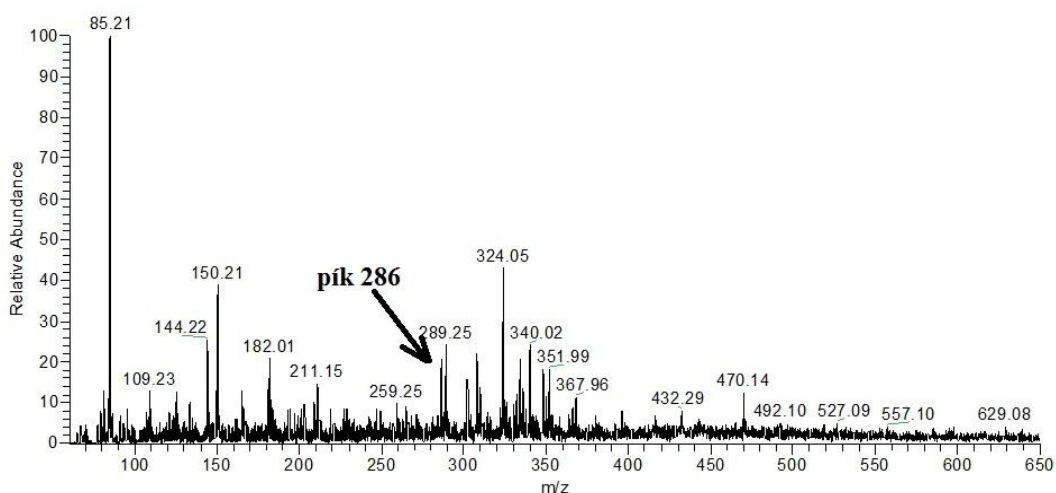
$\sigma$ .....směrodatná odchylka úseku (stanovena na základě kalibrace)

S.....směrnice kalibrační závislosti

Limit detekce pro 6 – acetylmorfin v moči odpovídá 0,16 mg/l. V moči po přečištění se dá dostat na úroveň limitu detekce jako u zasolených vzorků. Tato hodnota je menší než výrobcí uváděná cut off hodnota u metody ELISA.

Pro výslednou koncentraci vzorku moči 0,1 mg/l byl tento postup proveden i s přidavkem morfinu (obr. 43). Přídavek značeného standardu v tomto případě byl opět 10  $\mu$ l o koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Přítomnost protonovaných molekul morfinu (m/z 286) i morfinu – D3 (m/z 289) byly potvrzeny fragmentačními spektry (viz přílohy III.).

Vzhledem k tomu, že nebylo k dispozici dostatečné množství deuterovaného standardu morfinu, nebyla pro morfin zkonstruována kalibrační závislost. Bylo provedeno pouze toto měření na koncentrační úrovni 0,1 mg/l. Získané spektrum ukazuje, že lze prokázat morfin na této koncentrační hladině.



**Obr. 43.** Spektrum moči s přidavkem morfinu a značeného standardu morfinu – D3 po SPE.



## 5. ZÁVĚR

Řada příkladů z literatury dokládá aplikovatelnost ambientních ionizačních technik jako je desorpční elektrosprej, desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku aj. v analýze nejrůznějších typů vzorků včetně analýz pro forenzní účely. Pro ambientní techniky je charakteristická minimální nebo žádná úprava vzorku, z tohoto hlediska by jistou analogií mohl být nanoelektrosprej, který, jak potvrdily i výsledky předkládané práce, je například tolerantnější k zasolení vzorku více než elektrosprej.

Posouzení vhodných experimentálních podmínek pro ionizaci vybraných opiátů ukázalo, že teplota vyhřívané kapiláry ani průtok zmlžovacího plynu ve sledovaném rozsahu nehraje při měření zásadní roli, což dovoluje, i přes jistou odlišnost v závislosti intenzity signálu na zmíněných experimentálních parametrech, volit pro různé typy stejné podmínky. Porovnání fragmentačních spekter získaných pomocí ESI a nanoESI ukázalo značnou podobnost, což naznačuje blízké hodnoty vnitřních energií iontů vznikajících při použití ESI a nanoESI. Rozdíly byly zjištěny při měření zasolených vzorků. Ve spektrech po ionizaci elektrosprejem lze pozorovat zřetelnější adukty chloridu sodného oproti nanoESI, což poukazuje na větší tolerantnost nanoESI k přítomnosti anorganických solí ve vzorku. S ohledem na tento fakt byl nanoESI použit při analýze vzorků moči. I přes jeho větší tolerantnosti k solím se ukázalo, že pro neupravené vzorky nelze dosáhnout potřebných mezí detekce. Pro úpravu a přečištění moče byly použity postupy extrakce kapalina – kapalina a extrakce tuhou fází známé z toxikologických analýz. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při aplikaci SPE.

Pro odhad mezí detekce případně pro kvantitativní účely je nezbytné při přímé analýze roztoků nanoelektrosprejem použít vnitřní standardy. Byla ověřována možnost provádět stanovení morfinu s morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronidem jako vnitřním standardem. Při obvyklém postupu toxikologické analýzy je morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid štěpen a v konečném kroku je analyzován derivatizovaný morfin pomocí GC/MS. Za předpokladu štěpení glukuronidu lze uvažovat o přidavku vnitřního standardu (morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronidu) po provedené hydrolyze před dalším krokem analýzy. To by umožnilo vyhnout se použití drahých standardů značených stabilními izotopy. Touto metodou dosažené chyby měření však nebyly vyhovující a použití izotopicky značených standardů se jevilo jako nutnost.

Přídavek značených standardů dovolil nanoelektrosprejem u zasolených nijak nepřečišťovaných vzorků dosáhnout limitů detekce pro morfin 0,42 mg/l a 6 – acetylmorfin 0,19 mg/l. Pro třetí opiát morfin – 3 $\beta$  – D – glukuronid přímá analýza nebyla možná a nabízí se i v tomto případě provádět šetrnou hydrolyzu glukuronidu na morfin.

V případě analýzy opiátů v moči bylo zjištěno, že analyzovat opiáty přímo nelze, protože i při vysokých koncentracích byla intenzita jejich signálu nízká. Pro vzorky moči s přídavkem 6 – acetylmorfinu byla po jejich přečištění pomocí SPE změřena kalibrační závislost v rozsahu 0,1 – 1 mg/l. Následně z této kalibrace byl vypočítán limit detekce pro 6 – acetylmorfin v moči – 0,16 mg/l. Je zřejmé, že u vzorku moči po přečištění se dá dosáhnout úrovně limitu detekce jako u zasolených vzorků (u nich však bez přečištění). Tato hodnota je menší než cut off hodnota, kterou uvádějí výrobci u metody ELISA (cut off hodnota pro opiáty 0,3 mg/l). Bylo provedeno i měření morfinu v moči na nejnižší koncentrační úrovni 0,1 mg/l. Získané spektrum potvrdilo, že lze prokázat morfin na této koncentrační hladině. Vypracovaná metoda je vhodná pro screening vzorků moči případně pro stanovení sledovaných opiátů.

Pro další zlepšení mezi detekce a stanovení by bylo možné zpracovat větší objem vzorku, nebo přenést metodu na novější hmotnostní spektrometr, kde lze očekávat řádový nárůst signálu.

## 6. LITERATURA

1. [www.dnabased.com](http://www.dnabased.com); staženo 3.2.2012.
2. Šimovček, I. a kol.: *Kriminalistika*, Bratislava, 2001.
3. Bell, S.: *Forensic Chemistry*, Pearson Prentice Hall, New Jersey, 2006.
4. Venter A., Nefliu M., Cooks R. G.: *Trends in Anal. Chem.* 27, 284 – 290 (2008).
5. Huang M. – Z., Cheng S. – Ch., Cho Y. – T., Shiea J.: *Anal. Chim. Acta* 702, 1 – 15 (2011).
6. Green F. M., Salter T. L., Stokes P., Gilmore I. S., O’Coonor G.: *Surf. Interface Anal.* 42, 347 – 357 (2010).
7. Williams J. P., Patel V. J., Holland R., Scrivens J. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1447 – 1456 (2006).
8. Takáts Z., Wiseman J., Cooks R. G.: *J. Mass Spectrom.* 40, 1261 – 1275 (2005).
9. Cooks R. G., Takáts Z., Gologan B., Wiseman J., Talaty N., Chen H., Cotte Rodriguez I.: Aplikáční list pro desorpční elektrosprej.
10. [www.jeolusa.com](http://www.jeolusa.com); staženo 6.2.2012.
11. Cody R. B., Laramée J. A., Nilles J. M., Durst H. D.: *JEOL News* 40, 8 – 12 (2005).
12. Chen H. W., Lai J. H., Zhou Y. F., Huan Y. F., Li J. Q., Zhang X., Wang Z. Ch., Luo M. B.: *Chin. J. Anal. Chem.* 35, 1233 – 1240 (2007).
13. Chen H., Zheng J., Zhang X., Luo M., Wang Z., Qiao X.: *J. Mass Spectrom.* 42, 1045 – 1056 (2007).
14. Haapala M., Pól J., Saarela V., Arvola V., Kotiaho T., Ketola R. A., Franssila S., Kauppila T. J., Kostiainen R.: *Anal. Chem.* 79, 7867 – 7872 (2007).
15. Kauppila T. J., Arvola V., Haapala M., Pól J., Aalberg L., Saarela V., Franssila S., Kotiaho T., Kostiainen.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 979 – 985 (2008).
16. [www.biochem.oulu.fi/proteomics/finnprot/files/tiina09.pdf](http://www.biochem.oulu.fi/proteomics/finnprot/files/tiina09.pdf); staženo 6.2.2012.
17. Luosujärvi L., Arvola V., Haapala M., Pól J., Saarela V., Franssila S., Kotiaho T., Kostiainen R., Kauppila T. J.: *Anal. Chem.* 80, 7460 – 7466 (2008)
18. Wilm M., Mann M.: *Anal. Chem.* 68, 1 – 8 (1996).
19. Gibson G. T. T., Mugo S. M., Oleschuk R. D.: *Mass Spectrom. Reviews.* 28, 918 – 936 (2009).
20. Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K.: *Chem. Listy* 101, 524 – 529 (2007).

21. Hartmanová L., Ranc V., Papoušková B., Bednář P., Havlíček V., Lemr K.: *J. Chromatogr. A* *1217*, 4223 – 4228 (2010).
22. Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K.: *Eur. J. Mass Spectrom.* *14*, 411 – 417 (2008).
23. Ifa D. R., Jackson A. U., Paglia G., Cooks R. G.: *Anal. Bioanal. Chem.* *394*, 1995 – 2008 (2009).
24. Rodriguez – Cruz S. E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *20*, 53 – 60 (2006).
25. Kauppila T. J., Flink A., Haapala M., Laakkonen U. – M., Aalberg L., Ketola R. A., Kostiaainen R.: *Forensic Science Inter.* *210*, 206 – 212 (2011).
26. Kauppila T. J., Talaty N., Kuuranne T., Kotiaho T., Kostiaainen R., Cooks R. G., *Analyst* *132*, 868 (2007).
27. Miao Z., Chen H.: *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* *20*, 10 – 19 (2009).
28. Lin Z., Zhang S., Zhao M., Yang Ch., Chen D., Zhang X., *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* *22*, 1882 – 1888 (2008).
29. Huang G., Chen H., Zhang X., Cooks R. G., Ouyang Z.: *Anal. Chem.* *79*, 8327 – 8332 (2007).
30. Talaty N., Mulligan C. C., Juster D. R., Jackson A. U., Noll R. J., Cooks R. G.: *Analyst* *133*, 1532 – 1540 (2008).
31. Hajslová J., Čajka T., Václavík L.: *Trends in Anal. Chem* *30*, 204 – 217 (2011).
32. Čajka L., Václavík L., Riddelová K., Hajslová J.: *LC – GC Europe*, 250 – 256 (2008).
33. Ifa D. R., Gumaelius, L. M., Eberlin, L. S., Manicke, N. E., Cooks, R. G.: *Analyst* *132*, 461 – 467 (2007).
34. Ifa D. R., Wiseman J. M., Song Q. Y., Cooks R. G.: *Inter. J. of Mass Spec.* *259*, 8 (2007).
35. Jones R. W., Cody R. B., McClelland J. F.: *J Forensic Sci.* *51*, 915 – 918 (2006).
36. [www.drogy-info.cz](http://www.drogy-info.cz); staženo 10.2.2012.
37. [www.rect.muni.cz](http://www.rect.muni.cz); staženo 10.2.2012.
38. [www.medinfo.cz](http://www.medinfo.cz); staženo 10.2.2012.
39. Bogusz M. J.: *Handbook of analytical separations*, Elsevier, Oxford, 3 – 71, 2008.
40. [www.nal-vonminden.com](http://www.nal-vonminden.com); staženo 10.2.2012.
41. Spyridaki M. – H., Kiousi P., Vonaparti A., Valavani P., Zonaras V., Zahariou M., Sianos E., Tsoupras G., Georgakopoulos C.: *Anal. Chim. Acta* *573 – 574*, 242 – 249 (2006).
42. Suni N. M., Lindfors P., Laine O., Ostman P., Ojanpera I., Kotiaho T., Kauppila T. J., Kostiaainen R.: *Anal. Chim. Acta* *699*, 73 – 80 (2011).

## 7. SEZNAM ZKRATEK

**ABDF** – bromo – DragonFly

**APCI** – atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku

**APPI** – atmospheric pressure photoionization, fotoionizace za atmosférického tlaku

**CE** – capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza

**CID** – collision induced dissociation, kolizí indukovaná disociace

**DAD** – diode array detector, detektor diodového pole

**DAPCI** – desorption atmospheric pressure chemical ionization, desorpce chemickou ionizací za atmosférického tlaku

**DAPPI** – desorption atmospheric pressure photoionization, desorpce fotoionizací za atmosférického tlaku

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

**DESI** – desorption electrospray ionization, desorpční elektrosprej

**DMMP** – dimethyl – methylfosfonát

**DOPA** – dihydroxyfenylalanin

**EI** – electron ionization, ionizace elektronem

**ESI** – electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

**GC** – gas chromatography, plynová chromatografie

**HMX** – cyklotetramethylentetranitramin

**LIF** – laser induced fluorescence, laserem indukovaná fluorescence

**LC** – liquid chromatography, kapalinová chromatografie

**LSD** – diethylamid kyseliny lysergové

**MA** – N - methylamfetamin

**MALDI** – matrix – assisted laser desorption/ionization, desorpce/ionizace laserem za účasti matrice

**MDMA** – 3, 4 – methyendioxy – N – methylamfetamin

**MDPV** – 3, 4 – methyendioxyprovaleron

**MEKC** – micellar electrokinetic chromatography, micelární elektrokinetická chromatografie

**MS** – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

**NanoDESI** – desorption nanoelectrospray, desorpční nanoelektrosprej

**NanoESI** – nanoelectrospray, nanoelektrosprej

**PETN** – pentaerythritetranitrát

**PFPA** – anhydrid kyseliny pentafluoropropanové

**PMMA** – polymethylmetakrylát

**PTFE** – polytetrafluorethylen

**RDX** – 1, 3, 5 – cyklotrimethyltrinitramin

**RP – HPLC** – reversed phase – high performance liquid chromatography, vysoce účinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích

**SPE** – solid phase extraction, extrakce tuhou fází

**SPME** – solid phase microextraction, mikroextrakce na pevné fázi

**TLC** – thin layer chromatography, tenkovrstevná chromatografie

**TNT** – 2 – methyl – 1, 3, 5 – trinitrobenzen

**TOF** – time of flight, průletový analyzátor

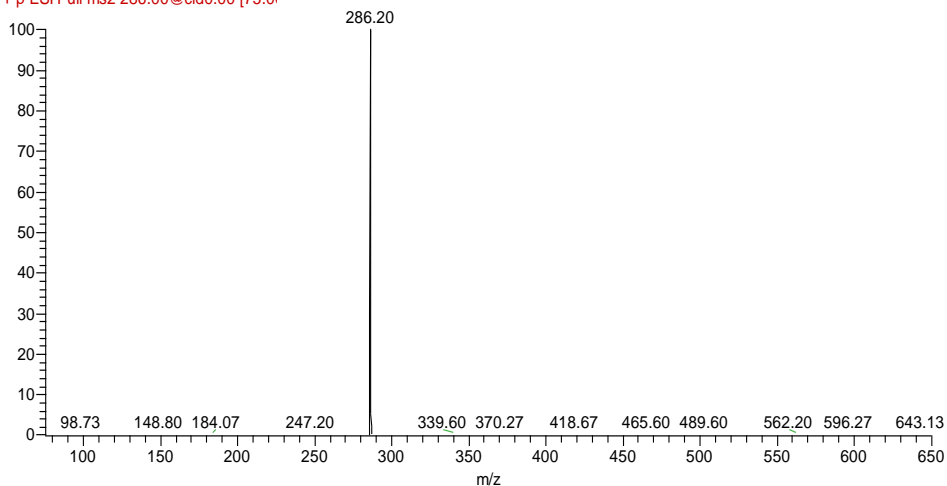
## 8. PŘÍLOHY

I. Fragmentační spektra standardů.....	I
A. Standard morfin.....	I
B. Značený standard morfin – D3.....	IV
C. Standard 6 – acetylmorfin.....	VII
D. Značený standard 6 – acetylmorfin – D6.....	IX
II. Fragmentační spektra standardu 6 – acetylmorfinu a značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 v moči po SPE extrakci.....	XI
III. Fragmentační spektra standardu morfinu a značeného standardu morfinu – D3 v moči po SPE extrakci.....	XIII

# I. Fragmentační spektra standardů

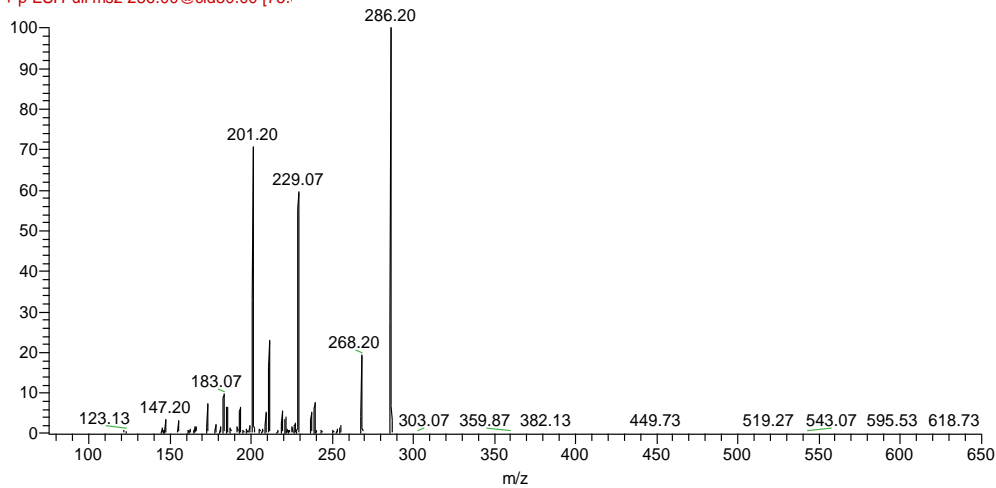
## A. Standard morfin

ESI\_Morfin\_2.5mg\_L1 #60-88 RT: 0.87-1.54 AV: 29 NL: 3.20E5  
F: +p ESI Full ms2 286.00@cid0.00 [75.0]



Obr. 44. Izolace iontu morfinu m/z 286.

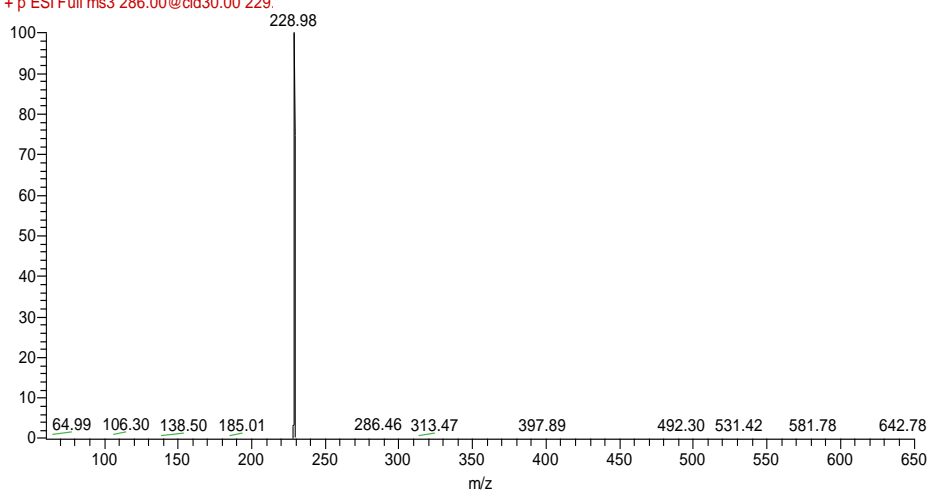
ESI\_Morfin\_2.5mg\_L1 #128-160 RT: 2.45-3.17 AV: 33 NL: 6.16E4  
F: +p ESI Full ms2 286.00@cid30.00 [75.0]



Obr. 45. Fragmentace iontu morfinu m/z 286.

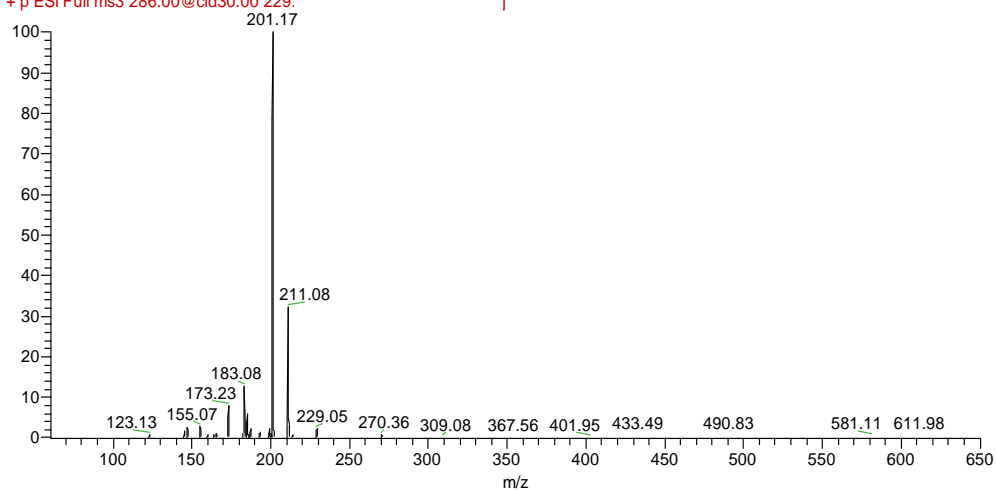


ESI\_Morfin\_\_2.5mg\_I\_1 #164-183 RT: 3.27-3.76 AV: 20 NL: 2.27E4  
F: + p ESI Full ms3 286.00@cid30.00 229.



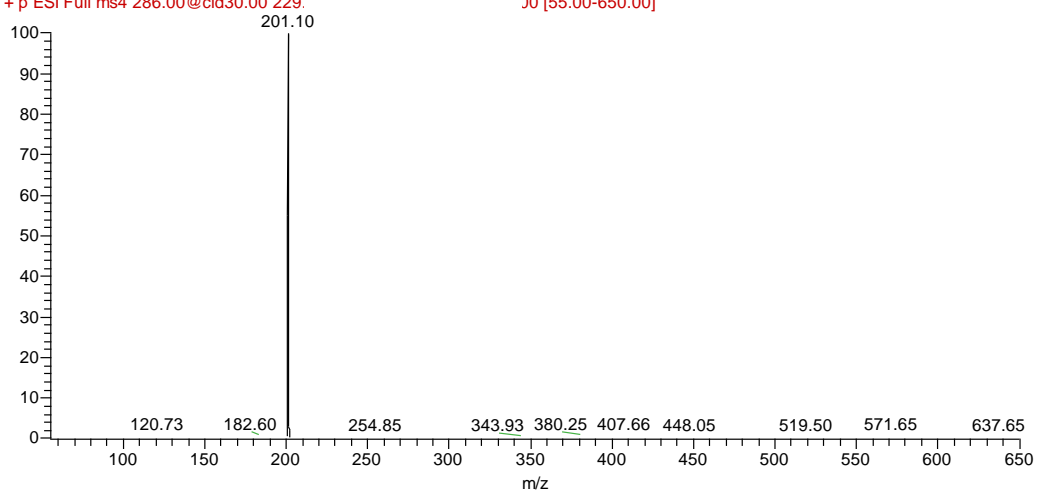
**Obr. 46.** Izolace iontu m/z 229.

ESI\_Morfin\_\_2.5mg\_I\_1 #212-231 RT: 4.52-5.01 AV: 20 NL: 1.85E4  
F: + p ESI Full ms3 286.00@cid30.00 229. |



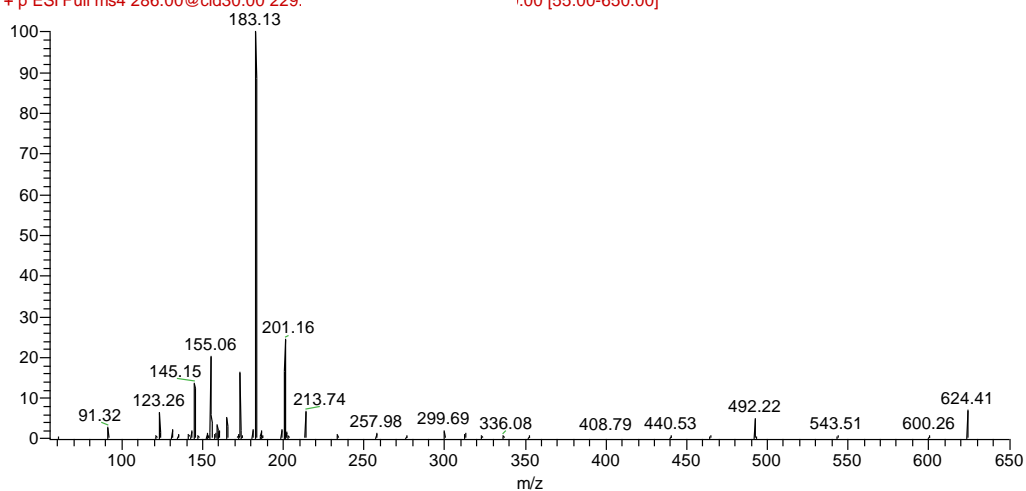
**Obr. 47.** Fragmentace iontu m/z 229.

ESI\_Morfin\_2.5mg\_I\_1 #235-259 RT: 5.12-5.84 AV: 25 NL: 2.12E4  
F: +p ESI Full ms4 286.00@cid30.00 229.00 [55.00-650.00]



**Obr. 48.** Izolace iontu m/z 201.

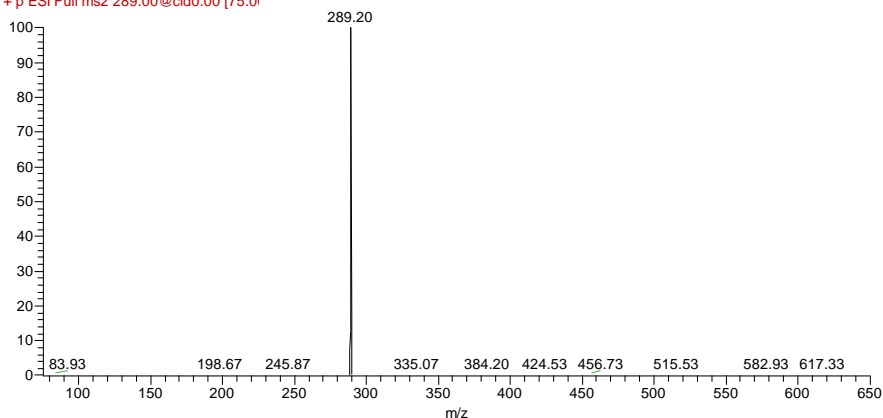
ESI\_Morfin\_2.5mg\_I\_1 #293-312 RT: 6.87-7.45 AV: 20 NL: 5.18E3  
F: +p ESI Full ms4 286.00@cid30.00 229.00 [55.00-650.00]



**Obr. 49.** Fragmentace iontu m/z 201.

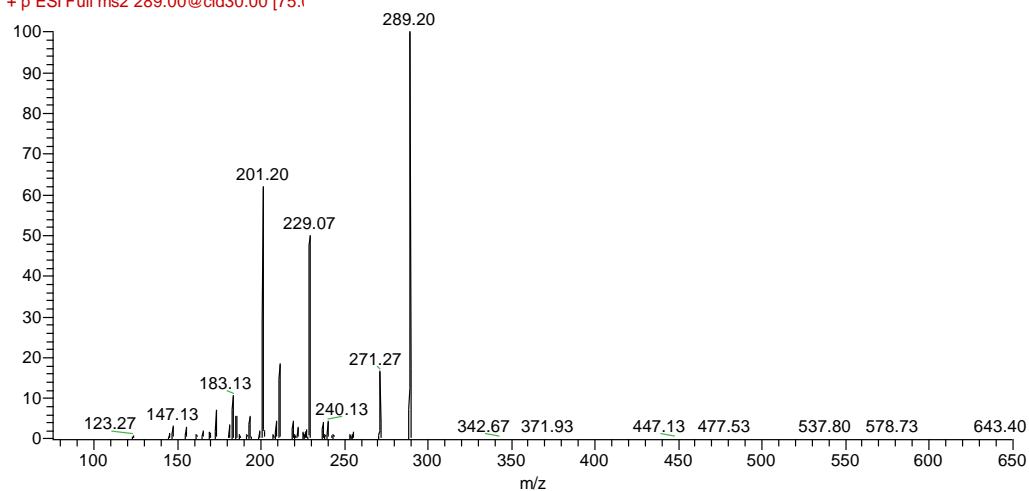
## B. Značený standard morfin – D3

ESL\_Morfin\_D3\_2.5mg\_L1 #17-46 RT: 0.25-0.73 AV: 29 NL: 1.78E6  
F: + p ESI Full ms2 289.00@cid0.00 [75.0]



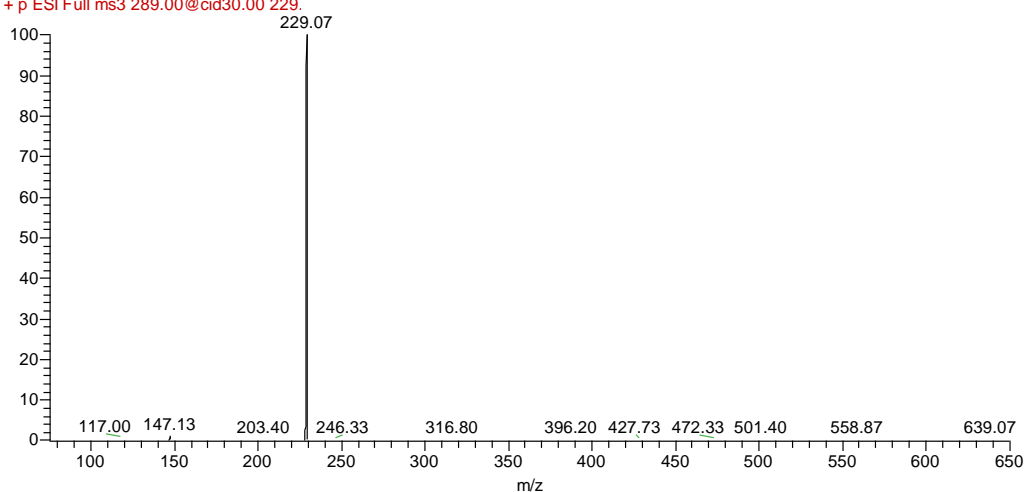
Obr. 50. Izolace iontu značeného standardu morfinu – D3 m/z 289.

ESL\_Morfin\_D3\_2.5mg\_L1 #79-117 RT: 1.32-2.04 AV: 39 NL: 1.90E5  
F: + p ESI Full ms2 289.00@cid30.00 [75.0]



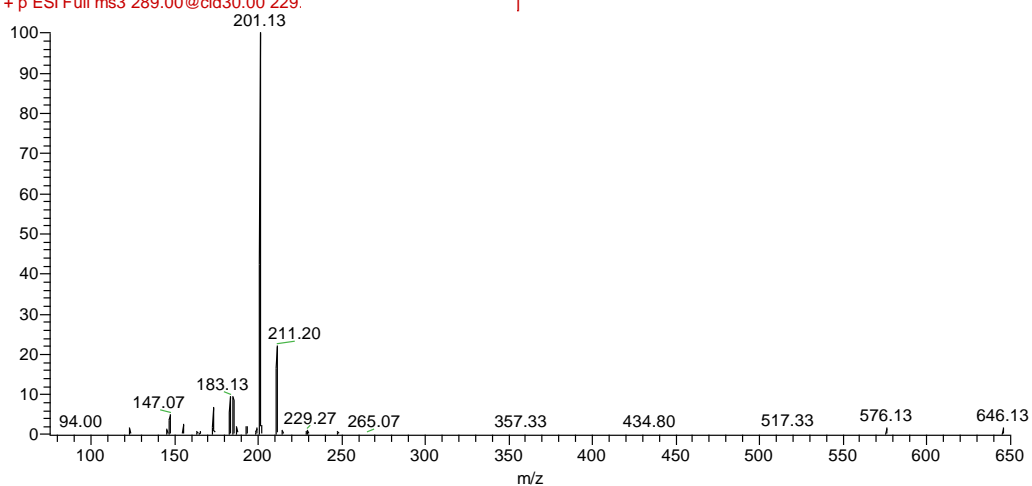
Obr. 51. Fragmentace iontu m/z 289.

ESL\_Morfin\_D3\_2.5mg\_I\_1 #121-139 RT: 2.12-2.52 AV: 19 NL: 6.23E4  
F: + p ESI Full ms3 289.00@cid30.00 229.



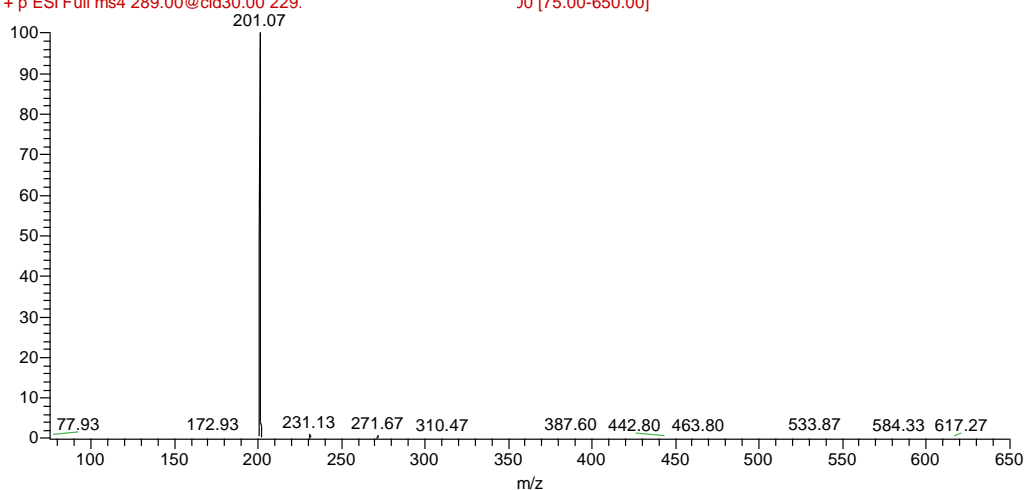
**Obr. 52.** Izolace iontu m/z 229.

ESL\_Morfin\_D3\_2.5mg\_I\_1 #159-175 RT: 3.02-3.40 AV: 17 NL: 2.92E4  
F: + p ESI Full ms3 289.00@cid30.00 229. |



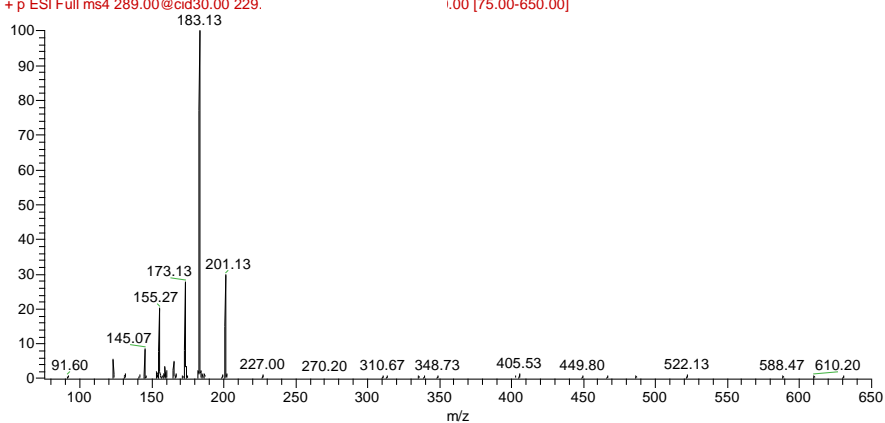
**Obr. 53.** Fragmentace iontu m/z 229.

ESL\_Morfin\_D3\_2.5mg\_L1 #178-202 RT: 3.48-4.13 AV: 25 NL: 2.09E4  
F: +p ESI Full ms4 289.00@cid30.00 229. 30 [75.00-650.00]



**Obr. 54.** Izolace iontu m/z 201.

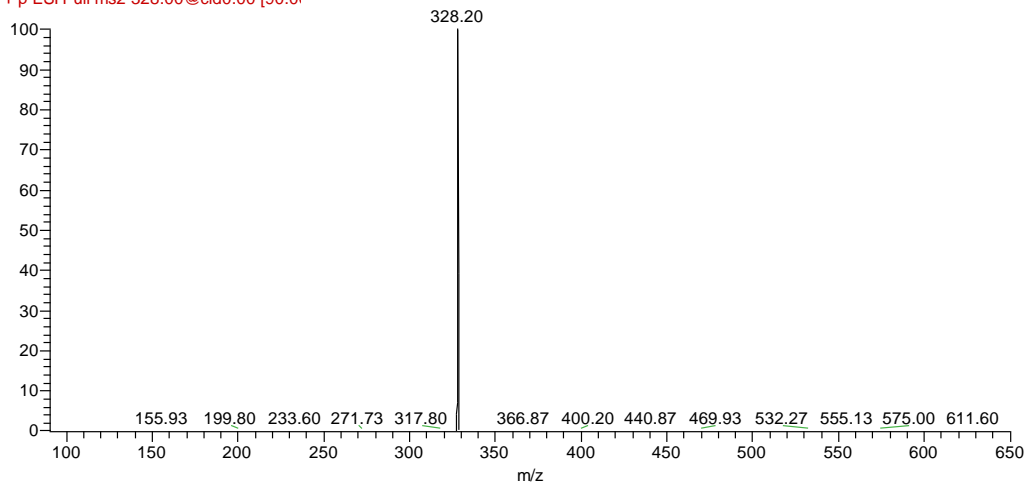
ESL\_Morfin\_D3\_2.5mg\_L1 #221-259 RT: 4.66-5.75 AV: 39 NL: 5.14E3  
F: +p ESI Full ms4 289.00@cid30.00 229. 1.00 [75.00-650.00]



**Obr. 55.** Fragmentace iontu m/z 201.

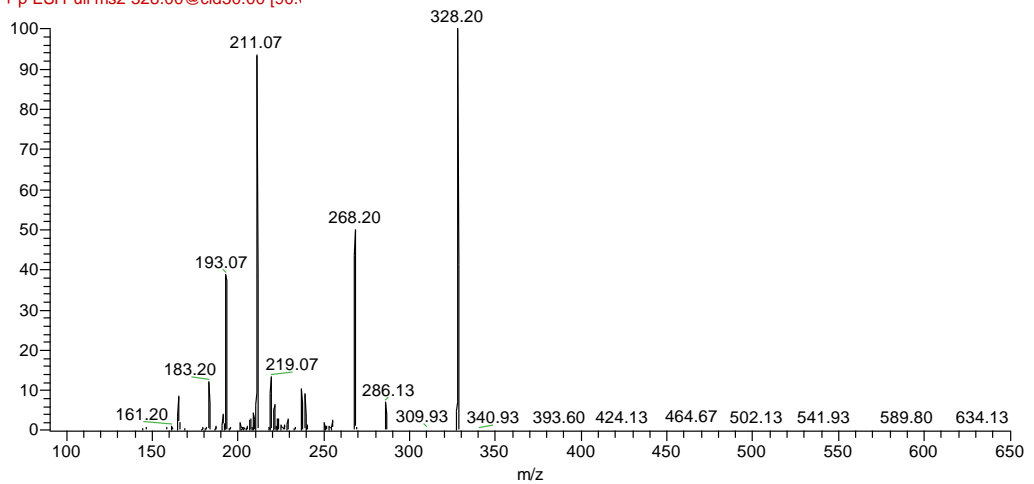
### C. Standard 6 – acetylmorfin

ESI\_AcMorfina\_2.5mg\_I\_1 #35-232 RT: 0.50-5.47 AV: 45 NL: 1.57E5  
F: + p ESI Full ms2 328.00@cid0.00 [90.0]



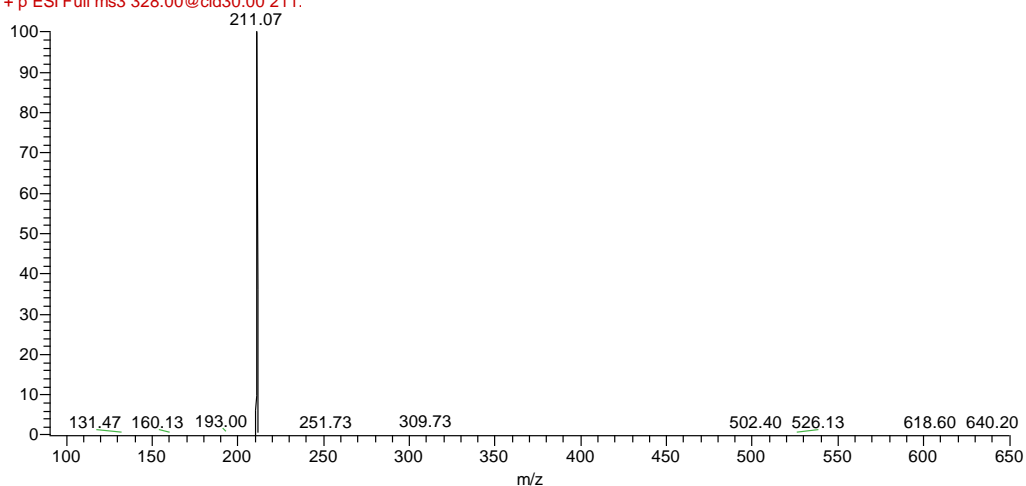
**Obz. 56.** Izolace iontu standardu 6 – acetylmorfinu m/z 328.

ESI\_AcMorfina\_2.5mg\_I\_1 #84-249 RT: 1.73-5.89 AV: 42 NL: 3.71E4  
F: + p ESI Full ms2 328.00@cid30.00 [90.0]



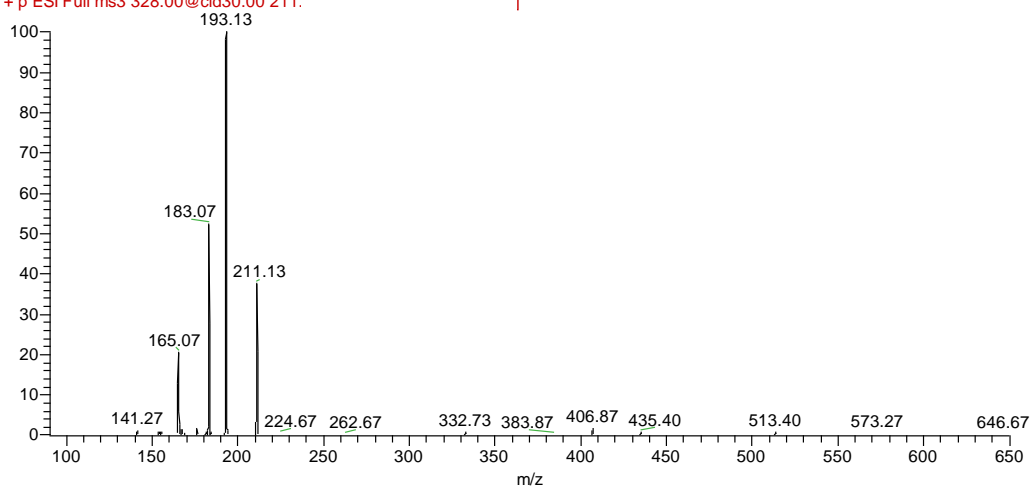
**Obz. 57.** Fragmentace iontu standardu 6 – acetylmorfinu m/z 328.

ESL\_AcMorfina\_2.5mg\_I\_1 #253-270 RT: 6.00-6.45 AV: 17 NL: 3.58E4  
F: + p ESI Full ms3 328.00@cid30.00 211.



Obr. 58. Izolace iontu m/z 211.

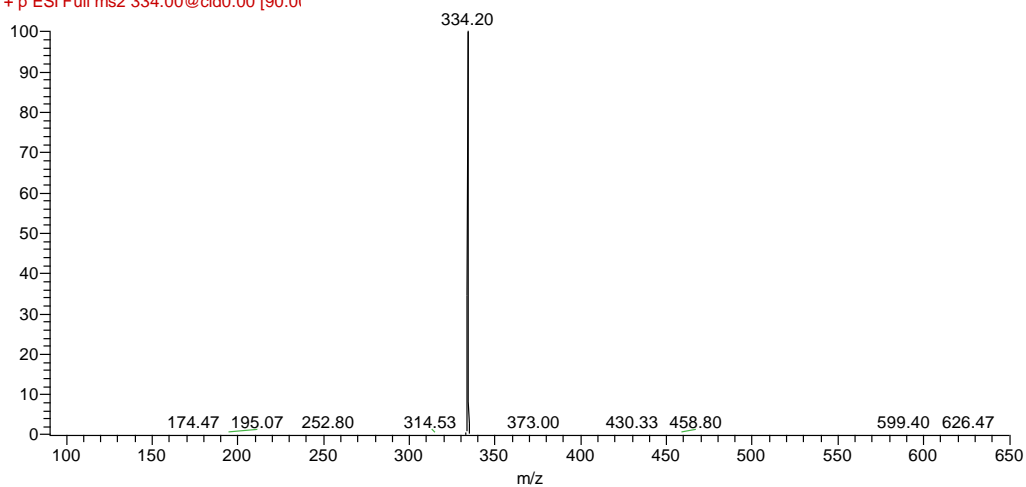
ESL\_AcMorfina\_2.5mg\_I\_1 #293-312 RT: 7.12-7.62 AV: 19 NL: 1.12E4  
F: + p ESI Full ms3 328.00@cid30.00 211.



Obr. 59. Fragmentace iontu m/z 211.

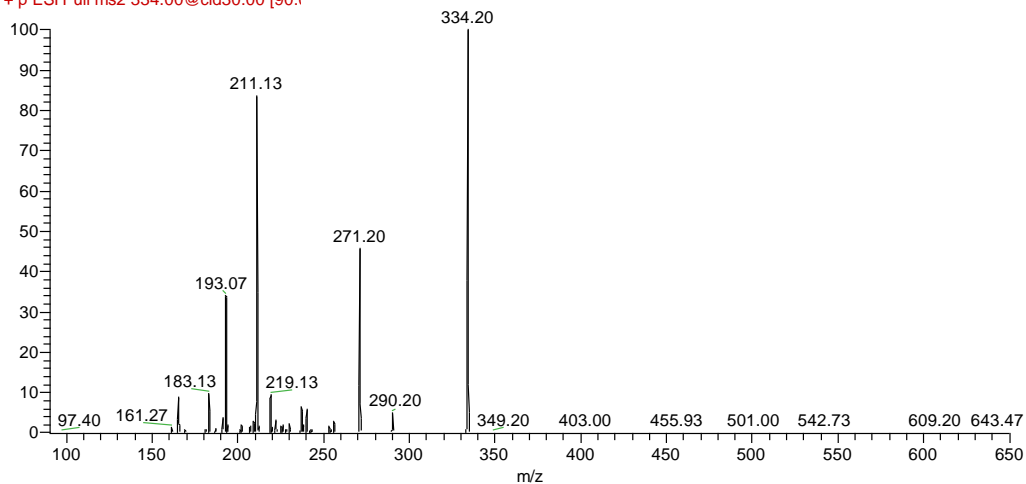
## D. Značený standard 6 – acetylmorfin – D6

ESI\_AcMorfín\_D6\_2.5mg\_L2 #12-41 RT: 0.17-0.80 AV: 29 NL: 3.34E5  
F: + p ESI Full ms2 334.00@cid0.00 [90.0]



Obr. 60. Izolace iontu značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 m/z 334.

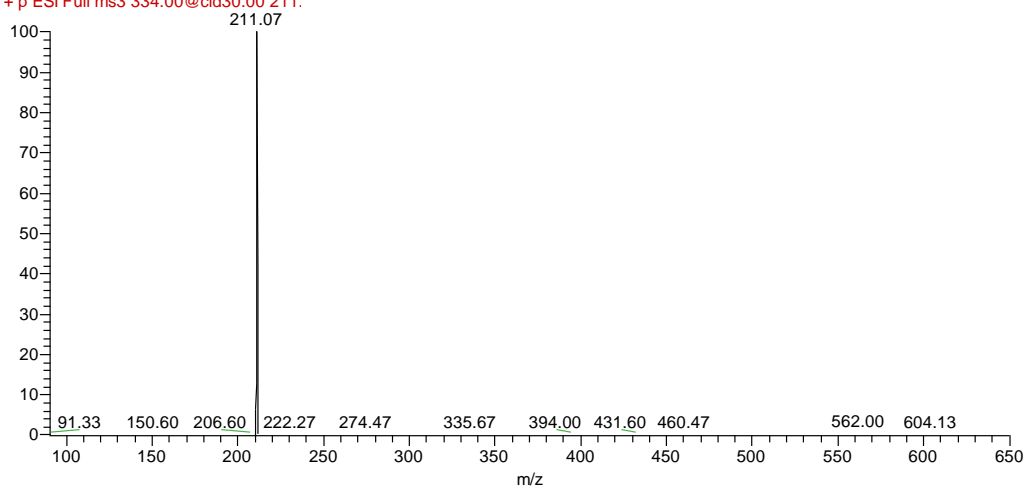
ESI\_AcMorfín\_D6\_2.5mg\_L2 #71-179 RT: 1.46-3.72 AV: 38 NL: 1.64E5  
F: + p ESI Full ms2 334.00@cid30.00 [90.0]



Obr. 61. Fragmentace iontu značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 m/z 334.

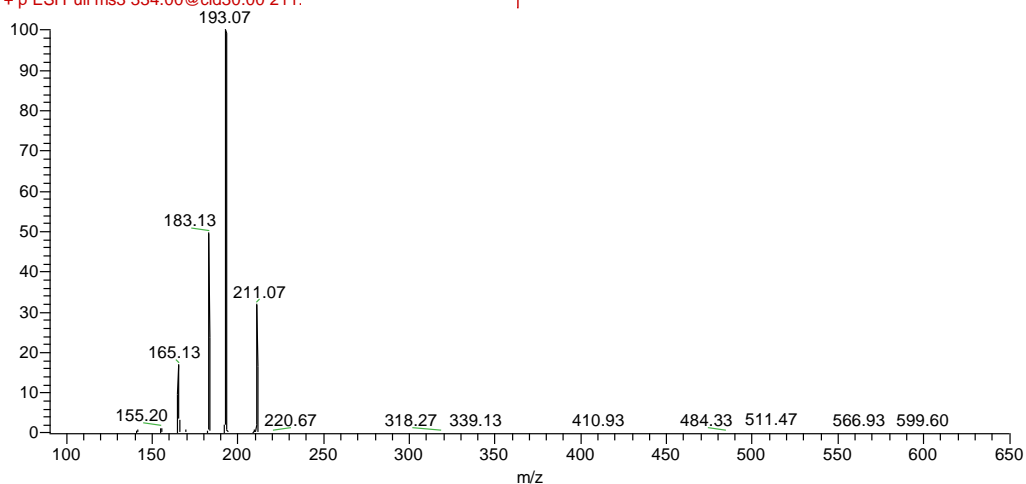


ESL\_AcMorfIn\_D6\_2.5mg\_L2 #181-199 RT: 3.77-4.16 AV: 19 NL: 1.20E5  
F: + p ESI Full ms3 334.00@cid30.00 211.



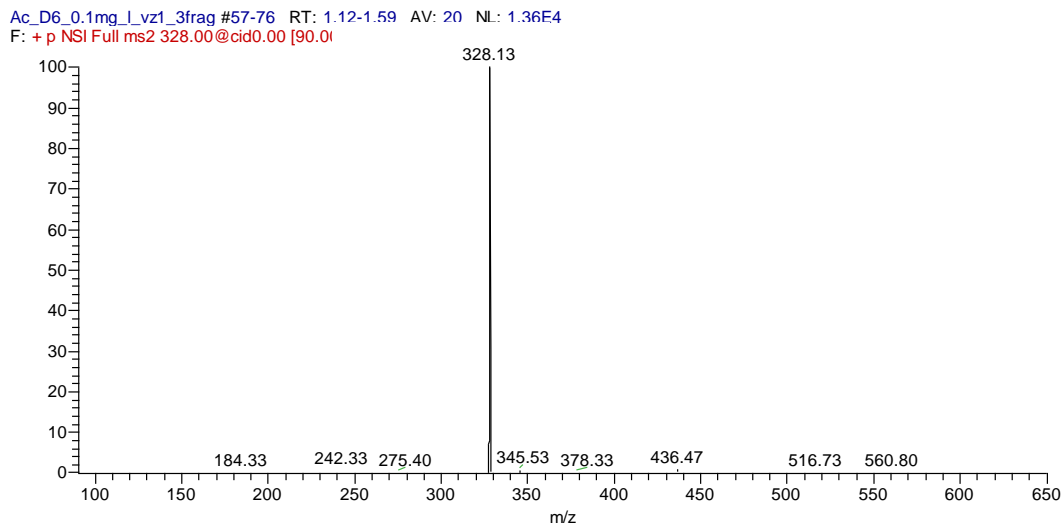
**Obr. 62.** Izolace iontu m/z 211.

ESL\_AcMorfIn\_D6\_2.5mg\_L2 #224-246 RT: 4.72-5.20 AV: 23 NL: 4.64E4  
F: + p ESI Full ms3 334.00@cid30.00 211.

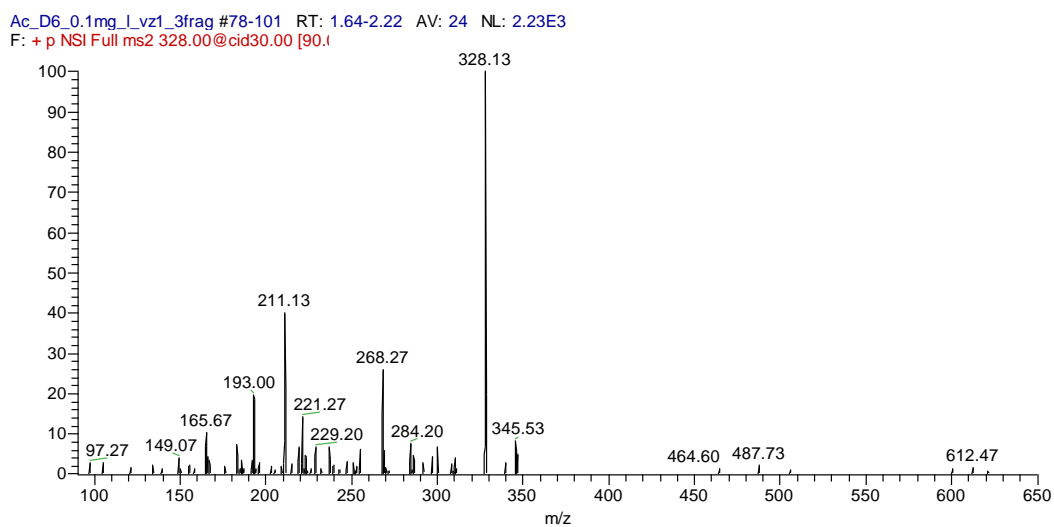


**Obr. 63.** Fragmentace iontu m/z 211.

## II. Fragmentační spektra 6 – acetylmorfinu a značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 v moči po SPE extrakci

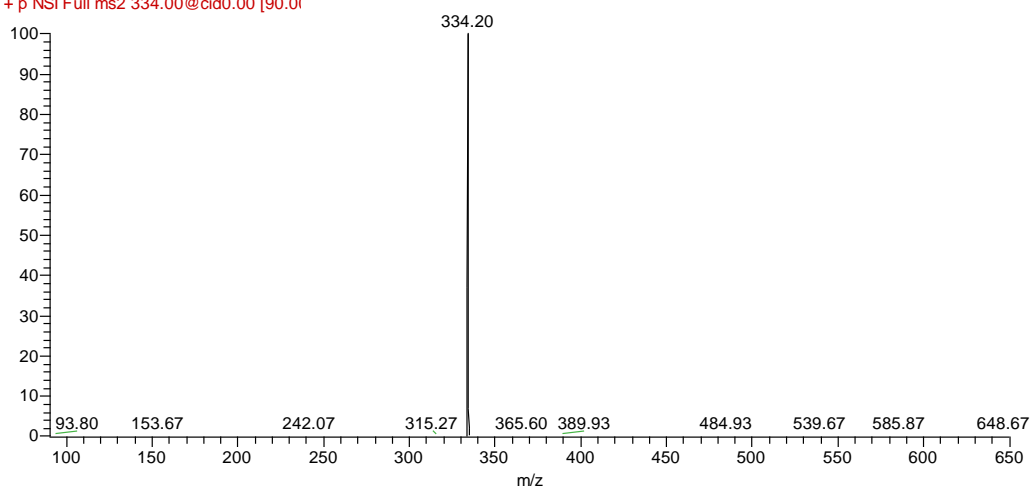


**Obr. 64.** Izolace iontu standardu 6 – acetylmorfinu m/z 328 po SPE extrakci.



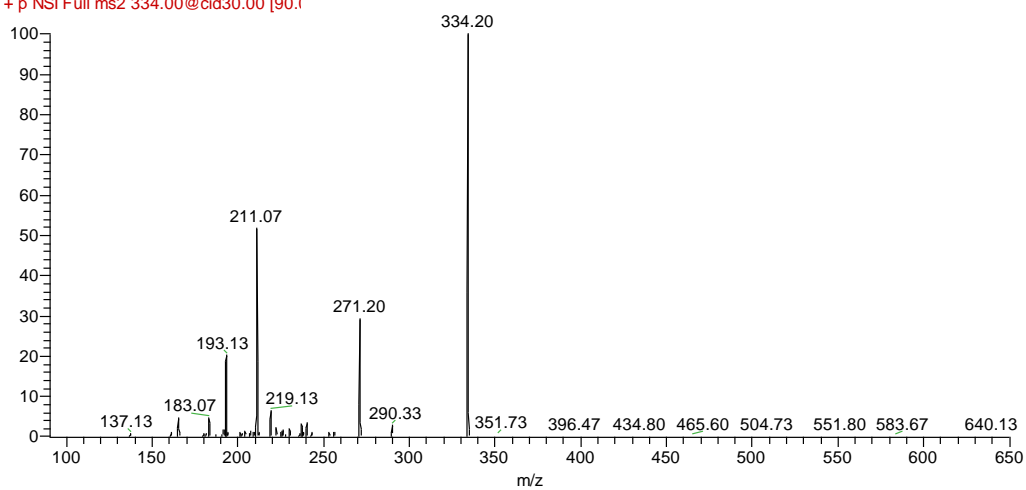
**Obr. 65.** Fragmentace iontu standardu 6 – acetylmorfinu m/z 328 po SPE extrakci.

Ac\_D6\_0.1mg\_l\_vz1\_3frag #12-34 RT: 0.17-0.64 AV: 23 NL: 1.60E5  
F: + p NSI Full ms2 334.00@cid0.00 [90.0]



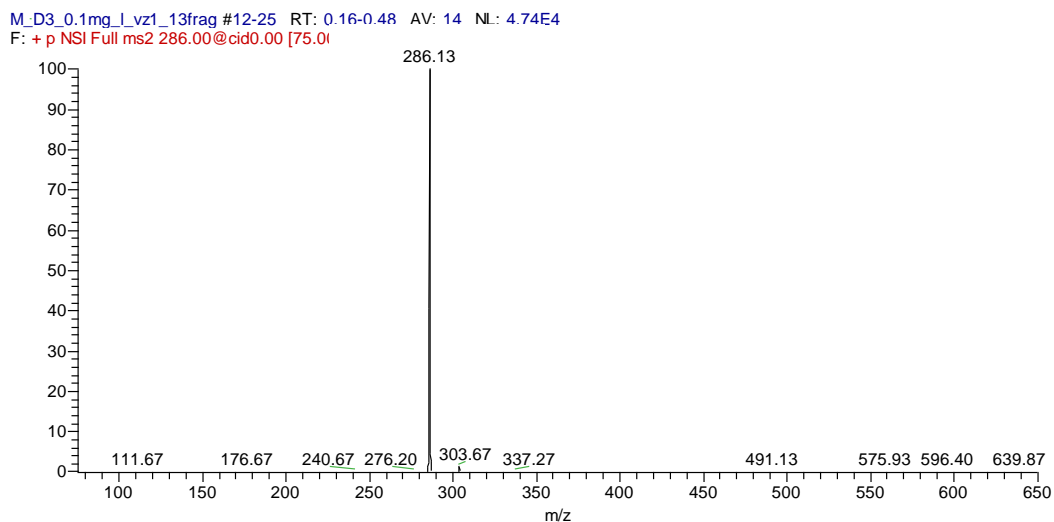
**Obr. 66.** Izolace iontu značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 m/z 334 po SPE extrakci.

Ac\_D6\_0.1mg\_l\_vz1\_3frag #36-56 RT: 0.69-1.10 AV: 21 NL: 6.44E4  
F: + p NSI Full ms2 334.00@cid30.00 [90.0]

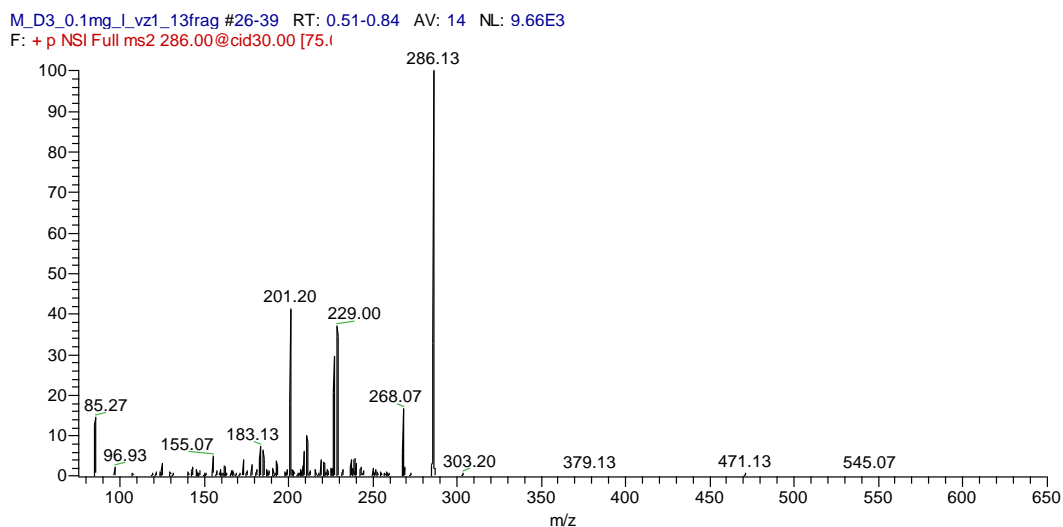


**Obr. 67.** Fragmentace iontu značeného standardu 6 – acetylmorfinu – D6 m/z 334 po SPE extrakci.

### III. Fragmentační spektra morfinu a značeného standardu morfinu – D3 v moči po SPE extrakci

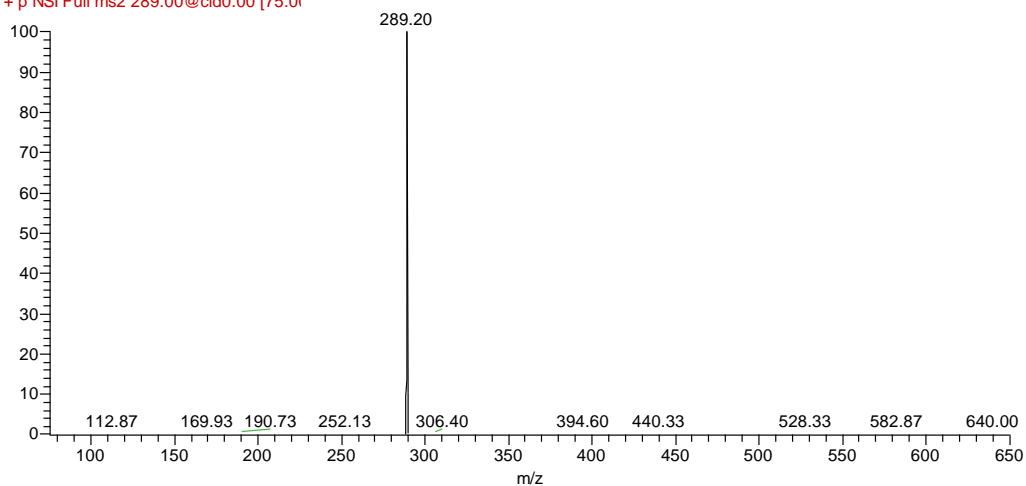


**Obr. 68.** Izolace iontu standardu morfinu m/z 286 po SPE extrakci.



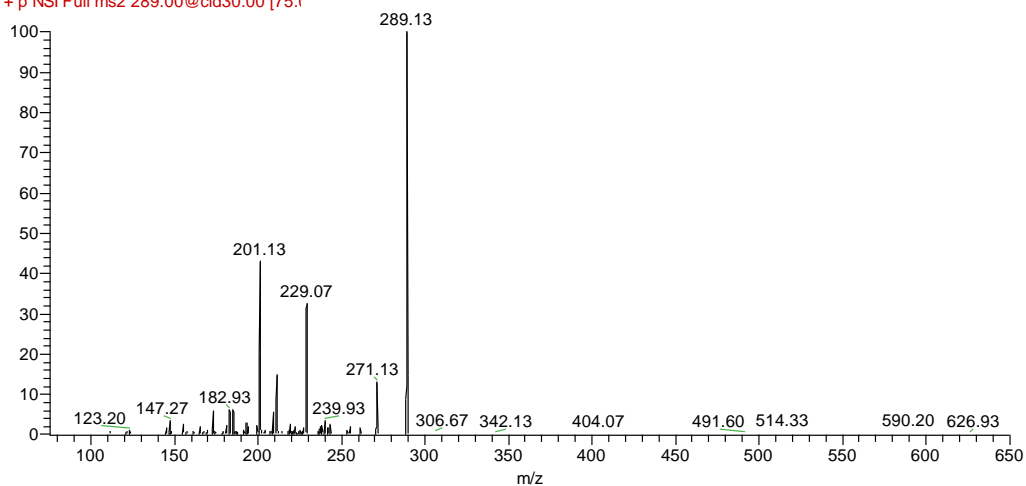
**Obr. 69.** Fragmentace iontu standardu morfinu m/z 286 po SPE extrakci.

M\_D3\_0.1mg\_I\_vz1\_13frag #40-50 RT: 0.86-1.12 AV: 11 NL: 1.01E5  
F: + p NSI Full ms2 289.00@cid0.00 [75.0]



**Obr. 70.** Izolace iontu značeného standardu morfinu – D3 m/z 289 po SPE extrakci.

M\_D3\_0.1mg\_I\_vz1\_13frag #52-66 RT: 1.17-1.52 AV: 15 NL: 2.55E4  
F: + p NSI Full ms2 289.00@cid30.00 [75.0]



**Obr. 71.** Fragmentace iontu značeného standardu morfinu – D3 m/z 289 po SPE extrakci.