

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie

**SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE
S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ V DOPINGOVÉ KONTROLE**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

OLOMOUC 2010

Vítězslav Branda

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie

**SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE
S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ V DOPINGOVÉ KONTROLE**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Vítězslav Branda

Studijní obor:

Aplikovaná chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Václav Ranc, Ph.D.

OLOMOUC 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v této práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu Vaškovi Rancovi za cenné rady při vypracování této práce a za čas, který věnoval jejím častým opravám.

Dále také Martinovi Dančákovi za poskytnutí vzorků rostlin druhu Ephedra a také správci skupiny Za záchranu dugongů Václavu Dvořákovi.

Souhrn

Cílem práce bylo vytvoření citlivé metody na kvantifikaci tří dopingových látek a následné použití na reálném vzorku. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie se ukázalo jako dobré řešení.

Mezi nejdůležitější úkoly patřilo nalezení účinné mobilní fáze pro úspěšnou separaci. Výsledek pro kolonu Discovery plněnou oxidem zirkoničitým se skládal ze dvou složek: 5 mM – kysel. 3,5-dinitrobenzoová s 5 % acetonitrilu (A) a acetonitril (B). Použitá eluce byla izokratická v poměru 70:30 A:B s průtokem 0,1 ml/min.

Kalibrační model se skládal z připravených roztoků o koncentracích od 1 mg/l až po 25 mg/l. Determinační koeficient linearity křivek se pohyboval od 0,988 pro *p*-hydroxyamfetamin, 0,996 pro metafetamin až po 0,998 pro efedrin. Meze detekce byly 0,77 mg/l pro efedrin, 1,04 mg/l pro metamfetamin a 1,89 mg/l pro *p*-hydroxyamfetamin. Mez kvantifikace pro EPH byl 1,13 mg/l, pro MET 1,54 mg/l a pro PHA 2,80 mg/l.

Jako reálný vzorek byly použity 4 rostliny druhu Ephedra. Dvě z nich efedrin obsahovaly (Ephedra Sinica a Ephedra Americana) a byl kvantifikován, u další byl detekován, ale pod limitem kvantifikace (Ephedra Fragilis) a u Ephedra Likiangensis byl obsah efedrinu pod limitem detekce. U rodu Ephedra Sinica byl obsah stanoven na $811,37 \pm 55,41$ ppm v 1 g vzorku. U Ephedra Americana byl obsah efedrinu $78,00 \pm 3,66$ ppm v 1 g vzorku.

Summary

The objective of this thesis is to create a simple method for quantification of three doping agents and use on a real sample. The hyphenation of liquid chromatography and mass spectrometry was found as suitable solution.

The most important part was the founding of the operative mobile phase for separation. The result for column Discovery (filled with ZrO_2) consisted 5 mM - 3,5 dinitrobenzoic acid with 5 % of acetonitrile (A) and acetonitrile (B). Elution was izocratic A:B 70:30 with flow rate 0.1 ml/min.

Calibration curve consisted of prepared solutions with concentrations from 1 mg/l to 25 mg/l. Coefficient of determination was 0.988 for *p*-hydroxyamphetamine, 0.996 for metamphetamine and 0.998 for ephedrine. Limits of detection were 0.77 mg/l for EPH, 1.04 mg/l for MET and 1.89 mg/l for PHA. Limits of quantification were 1.13 mg/l for EPH, 1.54 mg/l for MET and 2.80 mg/l for PHA.

There were 4 herbs Ephedra specie used as real samples. Two of them contained ephedrine (Ephedra Sinica and Ephedra Americana) and it was quantified. By the next one (Ephedra Fragilis), the amount of ephedrine was detected, but under the limit of detection and by the last one (Ephedra Likiangensis), the amount of ephedrine was under the limit of detection. Genus Ephedra Sinica contained 811.37 ± 55.41 ppm in 1 g of herb. Ephedra Americana contained 78.00 ± 3.66 ppm in 1 g of herb.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Doping ve sportu	2
2.2	Kapalinová chromatografie	4
2.3	Hmotnostní spektrometrie	7
2.3.1.	Ionizace.....	7
2.3.2.	Analyzátory	9
2.3.3.	Detektory	10
2.4	HPLC-MS.....	10
2.5	Dopingové látky	11
2.5.1.	Zakázané ve všech případech – Anabolické látky.....	11
2.5.1.1.	Testosteron	11
2.5.1.2.	Další anabolika	12
2.5.2.	Zakázané ve všech případech – Peptidové hormony a proteiny.....	13
2.5.2.1.	Růstové hormony.....	13
2.5.2.2.	EPO.....	13
2.5.3.	Zakázané ve všech případech – Diuretika	14
2.5.4.	Zakázané ve všech případech – Beta-2 blokátory	14
2.5.5.	Zakázané ve všech případech – Zakázané metody zvýšení výkonu.....	15
2.5.6.	Zakázané pouze během soutěží a závodů – Stimulanty	16
2.5.6.1.	Amfetamin	16
2.5.6.2.	Efedrin	17
2.5.6.3.	Kokain	17
2.5.7.	Zakázané pouze během soutěží a závodů – Narkotika	18
2.5.8.	Zakázané pouze během soutěží a závodů – Další látky.....	18
2.5.9.	Látky zakázané pouze v některých sportech	19
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1	Instrumentace.....	20
3.2	Chemikálie.....	21
3.3	Metoda	22
3.4	Pracovní postup	22

3.5	Použité programové vybavení	22
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	23
4.1	Vývoj HPLC metody	23
4.2	Vývoj kvantifikační metody	24
4.3	Příprava a měření reálného vzorku.....	28
5.	ZÁVĚR.....	30
6.	LITERATURA	31
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	37

1. ÚVOD

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je účinnou metodou na separaci a detekci nejen nízkomolekulárních látek. V tomto případě byla použita na vytvoření kvantifikačního modelu pro tři dopingové látky a zjištění obsahu jedné z nich v rostlinném vzorku.

HPLC-MS je obecně používaná metoda pro detekci látek v různých biologických materiálech.¹ Jedná se například o rostlinný materiál nebo různé druhy potravinových doplňků. Samotnému měření vždy předchází nějaký obecný postup přípravy vzorku.

Tato práce se zajímá o kvantifikaci efedrinu. Jako reálný vzorek byly zajištěny 4 rostliny druhu Ephedra. Tato rostlina, čínsky Ma Huang, česky Chvojník, pochází původem z Asie a Severní Ameriky a na světě jí existuje přes 50 druhů. Obsahuje látky ze skupiny efedrinů a dříve byla využívána v lékařství díky účinkům těchto látek.

Součástí této práce je i vytvoření kalibračního modelu pro tři dopingové látky. Efedrin, metamfetamin a *p*-hydroxyamfetamin. Všechny tři jsou zakázané Světovou antidopingovou agenturou a dobře detekovatelné právě metodou HPLC-MS.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Doping ve sportu

Jako první období, kdy se celosvětová veřejnost začala zajímat o dopingovou stránku sportu, se dají označit šedesátá léta minulého století. V tuto dobu zemřel dán Knut Jensen a brit Tommy Simpson, oba profesionální silniční cyklisté. V jejich krvi byly nalezeny stopy amfetaminu.^{2,3} Poté se těmito případy začala zabývat Světová cyklistická organizace (UCI, Union Cycliste Internationale) a vytvořila první komisi určenou jen pro boj s dopingem a to Lékařskou komisí spadající pod Mezinárodní Olympijský výbor (IOC-MC, The International Olympic Committee – Medical Commission).

Jejím prvním krokem bylo vytvoření Seznamu zakázaných látek (the List).³ Původní návrh byl, že by zde měly být obsaženy pouze látky, které laboratoře mohly úspěšně detekovat. Ovšem později byly do Seznamu zakázaných látek doplněny i metody a další látky, na které stále IOC-MC nestačila, například transfuze krve.^{4,5} Další záležitostí byla akreditace laboratoří k odhalování dopingových látek. V současnosti má tuto záležitost na starosti Světová antidopingová agentura (WADA, The World Anti-Doping Agency) a na světě je 34 laboratoří. Jedna z nich se nachází v Praze.⁶

WADA byla založena v roce 1999. Mezi základní příčiny jejího založení patřilo: sjednocení antidopingových pravidel všech světových federací; zákaz požívání například anabolických steroidů nejen profesionálními sportovci, ale i amatéry, a to z důvodu především vedlejších účinků a vlivu na jejich povahu (př. srdeční problémy nebo agresivita⁷); vývoj nových metod k analyzování látek ve vzorcích a v neposlední řadě propagace „čistého“ sportu ve státní, ale i mezinárodní sféře, pod jednou jedinou organizací.

Doping byl poté zdefinován jako: „porušení jednoho či více antidopingových pravidel uvedených ve člancích 2.1 až 2.8 Světového antidopingového kodexu.“⁶ Sportovec samozřejmě nesmí mít zakázanou látku ani její metabolit v těle. Nesmí použít nedovolenou metodu a ani odmítnout poskytnutí vzorku bez dostatečně důveryhodného zdůvodnění. Nesplnění požadavků týkajících se dostupnosti sportovce pro testování mimo soutěž a to včetně nedodání požadované informace o místě pobytu je taktéž porušení. Samozřejmě je zakázána i jakákoliv manipulace se vzorkem vedoucí k nereprodukovatelnosti analytu či snaha o podvod v jakékoliv jiné části dopingové

kontroly. I držení či obchodování s těmito látkami je zakázáno. To vše je obsaženo ve Světovém antidopingovém kodexu (WAC, The World Anti-Doping Code) a vede k jeho porušení.⁶ Nejdůležitější částí je Seznam zakázaných látek (the Prohibited List), který je každý rok aktualizován.

Každá Národní antidopingová organizace, v ČR to je Antidopingový výbor České republiky, má možnost testovat všechny sportovce žijící v zemi, státní příslušníky a členy místních sportovních organizací.⁶ Dále jsou ještě testy mimosoutěžní, které probíhají bez předchozího oznámení. Ty platí ovšem pouze pro sportovce, kteří jsou uvedeni v Registru pro testování. A ti pak musí zasílat informace o svém pobytu dle Mezinárodního standardu pro testování. Předposlední druh testování je tzv. „cílené“. Jedná se o testování nenáhodné, kdy se vybírají buď sportovci světové třídy či ti s náhlým rapidním zlepšením nebo sportovci trenéra, jehož jiný svěženec již měl pozitivní test. Poslední testování jsou ti se zastavenou či pozastavenou činností.⁶

2.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je nejstarší známá chromatografická technika vynalezena Michaiem Cvetem. Původní instrumentací byla především papírová chromatografie (PC, paper chromatography) a následně tenkovrstvá (TLC, thin layer chromatography).⁸ Jejich princip je podobný, rozlišují se pouze stacionární fází (SF), kdy u PC je to celulóza a u TLC např. oxid hlinitý nebo silikagel. Poté vznikla kolonová LC, kdy principem separace byly interakce se stacionární fází a síla atmosférického tlaku. Až v 70. letech 20. století vznikla HPLC. Její základ byl v GC, od které se liší velkými pracovními tlaky a interakcemi s mobilní fází. Samozřejmě jsou i rozdíly v detekci či další instrumentaci.

HPLC sestava se skládá ze zásobníků mobilní fáze, HPLC jednotky, kolony a detektoru.⁸ HPLC jednotka je nejdůležitější část celého systému. Obsahuje čerpadla mobilní fáze a ty jsou dvou druhů: na principu velkoobjemové stříkačky; které se používají pro kapilární kolony, mají bezpulzní režim, ale je tu zdoluhavější výměna a promývání mobilní fáze (MF); a čerpadla s malým objemem činné části, které obsahují dva zpětné ventily a používají se například pro náplňové kolony. Dalším krokem je eluce. Ta je tvořena čerpadly spolu se směšovacími ventily ve směšovací komoře. Může být izokratická, kdy se složení MF nemění, a nebo gradientová, např. binární, ternární či kvartérní dle počtu složek. Následuje dávkování vzorku a u HPLC jsou dvě možnosti. První je manuálně přesnou stříkačkou (např. značky Hamilton) pomocí smyčky a šesticestného ventilu nebo s využitím vnitřního prostoru. Smyčka lze plnit buď částečně a nebo přeplnit, přičemž obě možnosti mají svá pro a proti. Druhou možností dávkování jsou automatické autoinjectory.

Průměrná kolona pro HPLC systém je náplňová s délkou jednotek až desítek cm a vnitřním průměrem 4,6 mm s velikostí částic 5 μm .⁹ Lze se také setkat s monolitickými kolonami vyplněnými porézními polymery. Systémy v HPLC jsou dva hlavní – separace na polárních fázích (NP, normal phase) a separace na nepolárních chemicky vázaných fázích (RP, reversed phase) – a několik dalších jako například chromatografie na měničích iontů, chromatografie iontových párů, gelová permeační chromatografie či afinitní chromatografie.

Základním principem NP-LC je adsorpce. MF je méně polární než sorbent a tak analyt soutěží o aktivní místa na povrchu adsorbentu s MF. Retence je pak výsledek rozdílu interakcí analytu s adsorbentem a MF s adsorbentem, což jsou především interakce dipól-dipól.¹⁰ Díky tomu je tento druh chromatografie vhodný pro separaci izomerů či látek s více funkčními skupinami, naopak vůbec neseperuje homologické řady, např. alkany.

Chromatografie na reverzních fázích (RP-LC) využívá silné polární mobilní fáze a nepolární fáze stacionární, např. silikagelu s C8-C18 fázemi. Hnacím mechanismem retence jsou hydrofóbní interakce mezi molekulami vody v MF a analytem. To lze popsat dvěma ději a to rozdělováním a adsorpcí.^{11,12} Rozdělování závisí na chemické afinitě analytu k mobilní či stacionární fázi. Analyt může být ještě minoritně adsorbován na zbytkový povrch stacionární fáze a tím přispět k retenci. Tento druh kapalinové chromatografie je v současnosti jedním z nejvíce využívaným a je výhodný pro separaci homologů.

Detektory kapalinové chromatografie mohou být rozděleny dle několika vlastností, např. destruktivní či nedeštruktivní nebo selektivní či univerzální.⁸ Mezi nejrozšířenější detektory patří spektrofotometrické. Jedinou podmínkou je zde nutnost absorpce záření. Selektivním a velmi citlivým detektorem je fluometrický s podmínkou vykazování fluorescence. V opačném případě je ještě možnost derivatizace dodáním fluoforu do vzorku. Velmi citlivými selektivními detektory jsou elektrochemické, kde se měří změna proudu při průchodu elektroaktivní látky. Podmínkou je vodivá mobilní fáze a dělí se dále na amperometrické a coulometrické.

Jeden ze základních univerzálních detektorů je refraktometrický.⁸ Jeho výhodou je vysoká detekční hranice, ovšem nelze použít s gradientem MF. Principem je zde rozdíl indexu lomu světla mobilní fáze a analytu, každého v jiné měrné cele. Dalším je vodivostní detektor, kdy je intenzita signálu dána elektrickou vodivostí mezi dvěma elektrodami. Podobným je bezkontaktní vodivostní detektor, kde se používá vysokofrekvenční střídavé napětí.

Další možnosti detekce pro HPLC je například detektor rozptylu světla s odpařením mobilní fáze (ELSD, evaporative light scattering detector), aerosolový detektor nabitých částic (CAD, charged aerosol detector) nebo radiometrický či detektor optické otáčivosti. Poslední druh detekce je v on-line spojeních. HPLC je možno kombinovat s různými

spektrometrickými metodami, jako např. atomová absorpční či emisní spektroskopie nebo hmotnostní spektrometrie.

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda s neobvykle širokým polem působnosti - od rozboru potravin až po hledání života na Marsu.^{13,14} Díky svým vynikajícím vlastnostem, např. rychlosti, vysoké citlivosti nebo velmi nízkým limitům detekce, se i v jedenadvacátém století řadí mezi přední fyzikálně-chemické metody.

Joseph John Thomson představil svůj první hmotnostní spektrometr v roce 1912. Blokové schéma typu – vzorek – zdroj iontů – analyzátor – detektor – zpracování dat - je ale stále stejné. Zavádění vzorku může být buď přímé a nebo z různých analytických separačních metod. Například z chromatografie – kapalinová (LC, liquid chromatography) či plynová (GC, gas chromatography). Mezi další možnosti může patřit kapilární elektroforéza (CE, capillar electrophoresis) či průtoková injekční analýza (FIA, flow injection analysis).

2.3.1. Ionizace

Základní možnosti ionizace máme dvě a to tvorbu kation radikálu (M^+), který vzniká vyražením elektronu, nebo přijmutím protonu za vzniku iontu MH^+ či M^+ .¹⁵

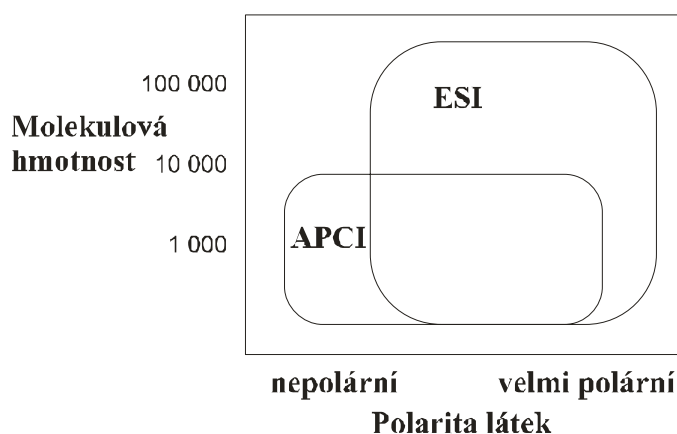
Ionizační techniky jsou tvrdé a měkké. Do první kategorie patří ionizace elektronem (EI, electron ionization). Základním principem je, že molekuly vzorku jsou vystaveny proudu vysokoenergetických elektronů (70 eV), které z plynných molekul vytváří molekulové ionty či fragmenty. Tato technika se používá v GC-MS a využívá vysoké fragmentace plynného analytu.^{16,17}

Mezi měkké ionizační techniky se řadí chemická ionizace (CI, chemical ionization). Je to metoda komplementární k EI, dodávající zbývající informace o neznámé látce. Jako reakční plyn se nejčastěji používá methan či isobutan.

Další měkkou ionizační technou je ionizace elektrosprejem (ESI, electrospray ionization), což je druh ionizace za atmosférického tlaku (API, atmospheric pressure ionization). Tato možnost obecně je výhodná pro vysokomolekulární látky, např. proteiny. Elektrosprej samotný je vytvořen díky silnému elektrostatickému poli působícímu na kapiláru, které je získáno díky rozdílu potenciálů mezi kapilárou a protiležící elektrodou. Na konci kapiláry se tvoří náboj, který je dodán kapce, která se protahuje se zvyšováním napětím a jakmile je překročena síla povrchového napětí, mění svůj

polokulovitý tvar na tzv. Taylorův kužel, z kterého jsou dále uvolňovány menší kapky. Ty se mohou dále rozdělovat na více menších z důsledku odpařování rozpouštědla. Zároveň se na jejím povrchu tvoří elektrický náboj. Nabitý molekulový ion se pak uvolňuje z povrchu kapky. Ovšem v případě molekul okolo 5000 Da nenastává desorpce, nýbrž uvolnění molekuly díky vypařování rozpouštědla, což probíhá už od tvoření samotné kapky.^{15,18,19}

Další druh ionizace je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, atmospheric pressure chemical ionization), měkká ionizační technika. Analyt je veden přímo do zmlžovače a poté jsou kapky zahřáty na teplotu, kdy nastává odpařování rozpouštědla a vzorku v proudu plynu. Další krok je ionizace, která nastává v koronárním výboji. Pozitivní ionizace nastává nejčastěji buď přijetím protonu nebo reakcí s molekulou plynu. V negativním módu je možnost tvorby nové sloučeniny, stejně jako v pozitivním, reakcí s molekulou plynu a nebo vyražením protonu.^{15,20,21} APCI se používá spíše pro polární až méně polární látky a s elektrosprejem se navzájem doplňují.



Obrázek 1: Volba ionizační techniky za atmosférického tlaku v závislosti na polaritě látky a její molekulové hmotnosti.

Další ionizační techniky jsou například bombardování urychlenými atomy či ionty (FAB/FIB, fast atom/ion bombardment). Nejčastěji se používají prvky argon, xenon či cesium o energii 5 až 10 keV.¹⁵ Další možností je samotná ionizace či desorpce laserem (LDI, laser desorption ionization) nebo za účasti matrice (MALDI, matrix assisted LDI). Druhá zmíněná se využívá především pro relativně velké molekuly - do 25 až 30 kDa²² - proteiny či peptidy. Velmi používané ionizační metody jsou ještě fotoionizace

za atmosférického tlaku (APPI, atmospheric pressure photo ionization), termosprej nebo nanoelektrosprej.

2.3.2. Analyzátořy

Jakmile jsou v ionizátoru vytvořeny plynné ionty, jsou okamžitě urychleny elektrickým či magnetickým polem do analyzátořy, který jednotlivé ionty odděluje dle jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z).¹⁵ Každý analyzátoř používá nepatřně odlišný princip separace iontů. Mohou být rozděleny mezi analyzátořy pulsní, kam patří kvadrupólový, průletový a iontový cyklotronový analyzátoř. Druhá skupina se nazývá spojitá a patří sem magnetické analyzátořy a kvadrupólové filtry.¹⁵

První spektrometr vytvořený Thomsonem v roce 1897 měl jako analyzátoř magnet, z čehož se vyvinuly moderní sektorové analyzátořy. V elektrickém poli probíhá nejen zrychlení iontů, ale i separace dle jejich kinetických energií. V magnetickém poli jsou ionty separovány díky velikosti $m \cdot v/z$, což odpovídá změně velikosti magnetické indukce.¹⁵

Další analyzátoř je kvadrupólový analyzátoř. Díky své ceně, vysoké rychlosti snímání a počtu iontů přicházejících z ionizátoru na detektor, se řadí mezi nejběžnější analyzátořy. Složení tohoto přístroje je ze čtyř elektrodových tyčí. Zrychlené ionty putující z iontového zdroje jsou zde separovány dynamickým elektrickým polem kvadrupólu podle svých hodnot m/z . Tím pádem může (ve skenovacím módu) pouze jedna hodnota m/z přicházet do následného detektoru a patří tedy mezi analyzátořy pulsní.¹⁵

Dalším analyzátořem je iontová past. To je zařízení, které obecně využívá oscilační elektrické pole k uchování iontů. Existuje 2D iontová past, která byla vyvinuta později a 3D iontová past, někdy nazývána jako kvadrupólová iontová past. Ta se skládá z koncové vstupní a výstupní elektrody a prstencové středové elektrody dohromady tvořící kvadrupólové pole. To ionty zachycuje ve svém středu na stálých dráhách. Následně je hmotnostní spektrum získáno díky změnám napětí a frekvence a uvolnění nejdříve iontů s nižším m/z , které jsou vyraženy skřz elektrody do detektoru. Používá se ještě přídavek helia jako inertního plynu, který je použit pro chlazení = snížení počtu vzájemných interakcí = zvýšení účinnosti analyzátořy.^{15,23,24} Vzhledem ke způsobu funkce lze provádět MS^n , několikanásobné fragmentování látky.

Průlétový analyzátor (TOF, time of flight) ionty separuje podle jejich rychlosti během jejich letu trubicí poté, co jsou urychleny rozdílem potenciálů. Poměr hmotnosti ku náboji je zjištěn z času letu ze zdroje iontů do detektoru. Nespornou výhodou TOF je možnost detekovat rozsáhlé sloučeniny a tak se využívá společně s MALDI k identifikaci látek s molekulovou hmotností přes 30 kDa.^{15,25,26}

Mezi moderní analyzátoři pro hmotnostní spektrometrii patří tzv. iontový cyklotronový analyzátor nebo orbitrap.

2.3.3. Detektory

Po analyzátoru ionty putují do sekce, kde se nachází detektor. Detekce iontů je obecně založena na základě jejich náboje či rychlosti.^{15,27} Mezi prvními detektory byla například fotografická deska, která pracovala na principu toho, že ionty se stejným m/z dorazí na stejné místo a to ztmaví. Teď už je však tento druh detektoru zastaralý a nepoužívá se. Dalším podobným je tzv. Faradayův pohárek. Ten využívá jevu, kdy jsou ionty uvnitř detektoru neutralizovány buď přijetím nebo odevzdáním elektronu, což vede k vytvoření proudu, který je následně zesílen a zaznamenán.

Ovšem nejčastějšími současnými detektory, se kterými se setkáme v hmotnostní spektrometrii, jsou přístroje na bázi elektronových násobičů. Tam ionty přicházejí na první konverzní dynodu, ze které vyrážejí elektrony, které později sekundárně na dalších dynodách emitují další elektrony. Ty jsou urychlovány a vedeny elektrickým napětím mezi dynodami na konec elektronásobiče, kde se nachází anoda spolu s konektory, které nejčastěji vedou do počítače.²⁷

2.4 HPLC-MS

Spojení kapalinové chromatografie (LC, liquid chromatography) a hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) se zpočátku zdálo být méně vhodné. MS potřebuje vzorek v plynném stavu a LC se používá pro netěkavé sloučeniny, na které není vhodná plynová chromatografie. S tím spojený problém byl vliv rozpouštědla. Z analytu se neodpařovalo a tak byly potřeba velké průtoky, které se těžko ionizovaly. To vyřešil buď dělič toku a nebo moderní ionizační techniky, jako např. TSP (thermospray), ESI, APCI či APPI.^{15,28}

2.5 Dopingové látky

Užití dopingové látky je jedno z osmi možných porušení Světového antidopingového řádu.⁶ Tyto látky se mohou do těla dostat třemi možnými způsoby. Za prvé přijmutí za snahou o zvýšení sportovního výkonu, za druhé způsobem nějaké rekreační drogy a nebo poslední možnost a to v léku či potravním doplňku.²⁹ Dopingové látky jsou rozděleny mezi ty, které jsou zakázány stále, kam řadíme i nepovolené metody zvýšení výkonu, a ty, které pouze během závodů.³⁰ Dále ještě mezi několik kategorií podle jejich vlastností, kam jsou zařazeny. Například stimulanty, steroidy, proteiny, diuretika či beta blokátory.

2.5.1. Zakázané ve všech případech – Anabolické látky

Tato skupina může být dále rozdělena mezi anabolické androgenní steroidy, to jsou endogenní a exogenní látky (samy se v těle tvoří / netvoří) a další anabolické látky.

2.5.1.1. Testosteron

Anabolické steroidy jsou syntetické deriváty právě této látky - testosteron je steroidní hormon tvořící se v lidském těle z cholesterolu.³¹ Během života má různé účinky na lidské tělo - např. vývin sekundárních pohlavních znaků nebo zvýšený nárůst svalové hmoty.³² Dostat do těla testosteron lze dvěma způsoby. Orálně a injekčně. Při přijetí této látky orálně se následně metabolituje na většinou neaktivní látky. Díky tomu se používá metabolit testosteronu - dihydrotestosteron, který má větší afinitu k androgenním receptorům, případně testosteron undecanoat.^{33,34} Nejčastější odvětví sportu, kde se tato látka používá jsou silové sporty jako například vzpírání či kulturistika.

Primární možnost detekce této látky v moči je poměr testosteronu a jeho metabolitu, epitestosteronu (T/E). Přijmutím exogenního testosteronu se zvýší hladina testosteronu v moči, ovšem ne epitestosteronu, čímž se zvýší poměr T/E. Mezní hranice je pro poměr T/E 4.0 a stanovuje se několika technikami. WADA preferuje volbu GC-MS, ovšem byly vyvinuty i další techniky, jak ho zjišťovat.³⁵ Jednou z nich je HPLC-MS s analyzátozem doby letu, kterou opublikoval Danaceau J.P., et. al..³⁸ Její výhodou je zkrácení doby analýzy na necelých patnáct minut, zlepšení limitu detekce a zjednodušení přípravy vzorku. Chromatografický systém se v tomto případě skládal z mobilní fáze

destilované vody s 0,1% kyseliny mravenčí (A) a methanolu s 0,1% té samé kyseliny (B). Průtok 350 µl/min a následující gradient: na začátku 75% A a 25% B, po nadávkování vzorku lineární přechod až na 95% B během 9-ti minut, zdržení se na 95% B 1,5 min a následně návrat na 75% A během 0,5 min.

Po zjištění vyššího poměru T/E následuje hmotnostní spektrometrie, hledající izotopový poměr (IRMS, isotope ratio mass spectrometry), konkrétně poměr $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, který potvrdí či vyvrátí nález exogenního testosteronu či jiného steroidu, který obsahuje méně ^{13}C .³⁵ Bylo zjištěno, že celkový testosteron v lidském těle je součtem všech nahromaděných, které člověk přijme z potravy.³⁹ Ovšem synteticky se tato látka vyrábí pouze z jedné rostliny, která má tento poměr výrazně nižší. K této metodě se WADA uchyluje i v případě, kdy je v moči nalezena vysoká koncentrace steroidů, které indikují přítomnost zakázané látky nebo jsou jejími metabolity. Koncentrace testosteronu či epitestosteronu nesmí přesáhnout 200 ng/ml, androsteronu a etiocholanolonu 10 ng/l a DHEA (dehydroepiandrosteron) 100 ng/ml.

Existuje ovšem spousta dalších metod, jak detekovat testosteron. Jednou z nich je test na ketoconazol, což je látka, která snižuje jeho hladinu.³⁶ Další možností jsou testy na hormony, především ty, které uvolňují gonadotropin a hormony luteinizační.^{32,40} Ty jsou často označovány jako prekurzory testosteronu, jsou ale i samostatně zakázány jako dopingové látky v těle sportovce.³⁰ Dále je detekce testosteronu a jeho esterů možná v plasmě a ve vlasech pomocí GC-MS.^{32,41} A poslední možností jsou různé imunologické testy založené například na kapilární elektroforéze.⁴²

2.5.1.2. Další anabolika

Dalšími anabolickými zakázanými látkami jsou tzv. 19–norsteroidy, v čele s látkou nandrolon (19-nortestosteron). Je to i látka tvořící se v lidském těle, ovšem v nízké koncentraci, její mezní limit je 1 ng/ml.⁴⁶ Na její detekování se používá obvyklá metoda a to příprava vzorku moči a následná GC-MS, případně pro potvrzení exogenního původu GC-IRMS. Metodu GC-MS v tomto případě publikoval již Ward R.J. se zjištěním, že anabolické steroidy, jako strukturně velmi podobné látky, jsou identifikovatelné stejnou metodou a to GC-MS.⁴³ Nandrolon je, co se týče dopingu, zodpovědný za růst svalové hmoty a urychlení regenerace po zranění či operaci.⁴⁴ Do těla se může ovšem dostat

i nechtěně a to v podobě různých potravinových doplňků a to už v množství mikrogramů, které jsou následně detekovatelné.⁴⁵

2.5.2. Zakázané ve všech případech – Peptidové hormony a proteiny

Peptidové hormony a proteiny mají stejnou strukturu jako endogenní látky v lidském těle, jsou těžko detekovatelné a často navíc zvyšují účinnost jiných dopingových látek, například steroidů.⁴⁷

2.5.2.1. Růstové hormony

Lidský růstový hormon (hGH, human growth hormone) je látka složená ze 191 aminokyselin o molekulové hmotnosti 22 kDa zodpovědná za růst svalové hmoty a snižování tělesného tuku. Její stanovení z moči je možné jen díky velmi citlivým imunodiagnostickým testům, protože koncentrace v moči je cca 100x – 1000x menší než v krvi.⁴⁷ Na detekci růstových hormonů v krvi se používají dva způsoby. Nepřímý, kdy se mohou nalézt různé závislé faktory jako například IGF-1 (insulin-like growth factor) nebo markery – osteocalcin. Těto metody se využívá především díky delší době života těchto látek, na rozdíl od samotných růstových hormonů, které ji mají velmi krátkou. Další cesta je přímý způsob. Bylo zjištěno, že při dopingování pomocí exogenních růstových hormonů v lidském těle stoupne pouze hladina největší formy, v porovnání s ostatními, a to té o molekulové hmotnosti 22 kDa.⁴⁷ Ovšem samotné endogenní růstové hormony jsou nalézány ve více formách – modifikovaný monomer o hmotnosti 20 kDa či kyselé a více fragmentované formy. A tak se v oficiálním testu pomocí imunoanalýzy měří poměr 22 kDa formy a všech zbylých. Tyto testy jsou ovšem časově omezeny do 36 hodin po poslední injekci.

2.5.2.2. EPO

Erythropoietin (EPO) je glykoprotein o molekulové hmotnosti 30400 g·mol⁻¹. V lidském těle je produkován především ledvinami, ale v malém množství i játry a mozky. Jeho produkce je ovlivněna množstvím kyslíku v tkáních, při nižším množství se tvoří EPO, které je vedeno k receptorům do kostní dřeně, kde jsou tvořeny erythrocyty.

Až se hladina červených krvinek dostane na svoji úroveň, erythropoietin se přestane tvořit.⁴⁸ Proto je EPO používán především cyklisty a sportovci ve vytrvalostních disciplínách, kteří se snaží zvýšit množství červených krvinek.

Nepřímá metoda detekce je založena na sekundárních markerech této látky v krvi a to například hodnoty hematokritu nebo počtu retikulocytů.⁴⁸ Přímé stanovení má základ v různé glykosylaci endogenní a exogenní formy.⁴⁸ A tak se dají elektroforézně separovat díky svému různému náboji. Ovšem musí se tak stát do 24 hodin po poslední injekci, jakmile je časová prodleva větší než 3 dny, úspěšnost detekce je na hranici 50%. Byla ovšem vyvinuta ještě jedna metoda (Lasne F.) a to separace pomocí isoelektrické fokuse (IEF, isoelectric focusation).⁴⁹ Ta využívá faktu, že rekombinovaný lidský erythropoietin (rHuEPO) je méně acidický než endogenní a tak je možné od sebe oddělovat různé druhy - alfa, beta i omega EPO.

2.5.3. Zakázané ve všech případech – Diuretika

Další možnost, jak zabránit dokázání dopingu v krvi či moči, je krytí zakázané látky. K tomu se používají dva druhy látek. Diuretika, což jsou látky, které zvyšují odvodnění organismu, a maskovací látky, které mohou narušit či zatajit přítomnost specifické látky nebo snížit její koncentraci.⁵⁰

Všechny tyto látky jsou k nalezení v Seznamu zakázaných látek a mezi nejznámější patří albumin, maskovací látka, a mezi diuretika skupina thiazidů. Jsou to heterogenní látky o relativně nízké molekulové hmotnosti a tak se dají detekovat v moči pomocí chromatografických a spektrometrických technik. GC-MS lze ale použít pouze v případě derivatizace.⁵⁰ Další možností je LC-MS, kterou publikoval Deventer K., et al.⁵¹ Průtok při separaci byl 0,3 ml/min a mobilní fáze jsou 1% kys. octová (A) a acetonitril (B). Gradient začíná na 85% A po 2 minuty, poté během 10-ti minut se lineárně dostane na 45% A, pak během 8 minut na 35% A a nakonec skok zpět na 85% A a 10 minut na uvedení do rovnováhy.

2.5.4. Zakázané ve všech případech – Beta-2 blokátory

Beta-2 blokátory jsou látky, které se používají v lékařství např. na léčbu astma či bronchitidy. Na lidské tělo působí podobně jako anabolika a to růstem svalové hmoty.

Tyto látky s nízkou molekulární hmotností se detekují v moči například pomocí GC-MS⁵². Limity detekce (LOD, limit of detection) jsou od 0,5 ng/ml pro salbutamol až po 5,0 ng/ml pro clenbuterol. Další možností je kapalinová chromatografie s vodivostní detekcí, jak publikoval Shen S., et al.⁵³ Tato technika má LOD 2,0 ng/ml pro salbutamol a 10,0 ng/ml pro clenbuterol. Výhodou je rychlost měření a to 8 minut.

2.5.5. Zakázané ve všech případech – Zakázané metody zvýšení výkonu

Do této kategorie patří tři metody: zvýšení přenosu kyslíku, chemická a fyzická manipulace se vzorkem a genový doping.³⁰

Zvýšení obsahu kyslíku ve svalích a tím pádem jejich výkonnost je možno více způsoby. Spánek v kyslíkovém stanu či trénink ve vysokých nadmořských výškách zakázané nejsou, ovšem transfuze krve je. Všeobecně známá je metoda získání vlastní okysličené krve a následné infuze před výkonem. Toto je těžko detekovatelné, ale i přesto je. Bylo zjištěno, že během skladování klesá hladina 2,3-difosfoglycerátu.⁵⁴ Detekce cizí krve je jednodušší, neboť obsahuje mnohem více antigenů než jen A, B, Rh a 0 a tak je velmi malá pravděpodobnost, že by dva jedinci měli tyto hodnoty stejné. Délka života červených krvinek je 3 až 4 měsíce a tak se tato krevní transfuze dá pomocí flow cytometrie dobře detekovat.⁵⁴

Mezi fyzikální a chemické metody patří především různé podvody – zaměnění moči nebo její poškození.³⁰ A poslední zakázanou metodou je genový doping. Původní snahou této techniky bylo léčení chudokrevnosti pomocí erythropoietinu, který byl vkládán do buněk v lidském těle.⁵⁴

2.5.6. Zakázané pouze během soutěží a závodů – Stimulanty

Stimulanty jsou obecně látky, které působí na centrální nervový systém (CNS, central nervous system). Ten může tělo ovlivnit mnoha rozličnými způsoby - např. změnou nálady, zvýšenou bdělostí či pohybovou činností.⁵⁵ Mnoho z nich jsou látky v těle se tvořící a tak byly vytvořeny hraniční limity detekované v moči, kdy už je látka považována za dopingovou a kdy za endogenní.³⁰ Pro stimulant cathin (norpseudoefedrin) to je 5 µg/ml, pro efedrin a metylefedrin 10 µg/ml. Nalezení jakéhokoliv jiného zakázaného stimulantu v moči znamená porušení Světového antidopingového kodexu. Ovšem existují i stimulanty, které jsou povolené.³⁰ Například pseudoefedrin či kofein. Jsou ale na seznamu látek, které jsou monitorovány ohledně možnosti zneužití jako doping.

2.5.6.1. Amfetamin

Amfetamin je heterogenní látka o hmotnosti 135 g/mol, která se dříve používala v lékařství na léčbu narkolepsie, akutní spavosti. Je také prekurzorem mnoha jiných látek - např. metamfetaminu, parahydroxyamfetaminu či methylamfetaminu, které se detekují pomocí stejných metod jako amfetamin. Sportovci ho zneužívají především díky rychlé mobilizaci CNS a produkci noradrenalinu.⁵⁵

Na detekci této látky s nízkou molekulovou hmotností v moči se používá především GC-MS.⁵⁶ Na oficiální potvrzení nalezení amfetaminu je potřeba jak retenčního času z chromatografie, tak údaj z hmotnostního spektra. LOD pro detekci amfetaminu touto metodou, kterou publikoval van Thuyne W. et al., je 20 ng/ml s retenčním časem 4,95 min. Podobnou možností je LC-MS dle Anderssona M., et al.⁵⁷ Je preferovaná díky jednodušší přípravě vzorku a lepšímu LOD – 0,6 ng/ml. V případě této metody byla použita kolona C18 s dvěmi mobilními fázemi: 25 mM kyselina mravenčí s 1% acetonitrilu (A) a stejná kyselina, jen s 90% acetonitrilu (B). Průtok 0,3 ml/min a gradient začal s 9% B, který lineárně vzrostl na 20% B během 4 minut. Poté za další 3 minuty až na 100%. Dalším možným způsobem detekce v moči je pomocí imunologických testů.⁵⁸ Amfetamin lze zjišťovat i v krvi a to díky elektroforézním metodám, např. elektroforéze s detekcí pomocí diodového pole.⁵⁹

2.5.6.2. Efedrin

Efedrin je látka, která má na lidské tělo vliv jako déle trvající adrenalin. Působí aktivně na kardiovaskulární systém a nepřímo deaktivuje alfa a beta adrenoreceptory. Efedrin se do těla často dostane i díky potravinovým doplňkům či lékům vyrobeným z rostliny Ephedra (Ma Huang).⁵⁵

Efedrin je pouze jedna látka ze skupiny efedrinů. Sem patří ještě pseudoefedrin, norefedrin, methylefedrin a norpseudoefedrin, známý jako cathin. Jsou to všechno opticky aktivní látky a první dvě z těchto čtyř nejsou zakázané díky častému lékařskému využití. Detekce spočívá opět v chromatografických metodách. Původní metodou byla plynová chromatografie s termoionizačním (NP) detektorem.⁶⁰ Detekovanou koncentrací pro efedrin byly v tomto případě 4 µg/ml s opakovatelností 6,0. Ale díky dlouhotrvajícím přípravám vzorku byla vyvinuta i rychlá a citlivá metoda používající GC-MS.⁶¹ Na derivatizaci vzorku byl použit anhydrid kyseliny pentafluoropropionové a celková doba jednoho měření byla cca 6 minut. Separace více látek – skupiny amfetaminů a efedrinů - proběhla do tří minut s LOD od 1,5 ng/ml až po 6,25 ng/ml.

Byly vyvinuty ale i další metody založené na kapalinové chromatografii. Jednou z možností je HPLC se spektrofotometrickým UV detektorem.⁶² Zde byly vyzkoušeny vzorky jak s plasmou, tak s močí, ovšem se špatnými výsledky. Další může být spojení LC-MS, jak publikoval Deventer K., et al.⁶³ To bylo vyzkoušeno s C8 kolonami a chromatografickým systémem skládajícím se z 2 mobilních fází: voda/acetonitril (98/2) s 0,1% kyseliny octové (A) a 0,01% kyselina trifluoroctová (B). V tomto případě byla použita izokratická eluce s průtokem 0,4 ml/min. Celkový čas měření jednoho vzorku byl 16 min. Jednou z dalších možností je použití kapilární zónové elektroforézy (CZE) s LIF (laser-induced fluorescence) detektorem.⁶⁴ Před samotnou separací je nutná extrakce vzorku a jeho derivatizace. Vzorky stimulantů o koncentraci 22 ng/ml jsou detekovatelné touto metodou s časem měření 10 min. Výhodou je právě tato krátká doba a nízká cena zařízení.

2.5.6.3. Kokain

Kokain je známý jako rekreační droga, ovšem je to i zakázaný stimulant. Působí na CNS a kardiovaskulární systém zvýšením tepla a krevního tlaku. V lidském těle kokain

metabolituje na několik látek v závislosti na způsobu požití a látkách, které byly požívány společně – např. alkohol. Všechny tyto metabolity, včetně původního kokainu, mohou být detekovány v moči pomocí LC-MS, jak zjistil Langman L.J, et al.⁶⁵ Chromatografický systém se v tomto případě skládal z dvou mobilních fází: 20 mM – mravenčan amonný (A) a methanol/acetonitril (50/50) (B). Nastavený průtok byl 270 µl/min a dosažený LOD 1,0 ng/ml. Alternativním způsobem detekce je například použití extrakce na pevné fázi a následné iontové mobilní spektrometrie.⁶⁶ Detekční limity se pohybují od 4 ng/ml do 10 ng/ml v závislosti na metabolitu. Čas samotné spektrometrie je 20 s, což přináší velmi rychlou metodu na detekci kokainu.

2.5.7. Zakázané pouze během soutěží a závodů – Narkotika

Narkotika jsou látky velmi podobné stimulantům a jsou také stejně detekovatelné. Základem je opět plynová chromatografie, ať už s termoionizačním detektorem nebo s hmotnostním spektrometrem, který se používá pro potvrzení, protože je potřeba jak sretenční čas, tak i spektrum z MS.⁵⁶ Mezi nejznámější narkotika patří morfin, který se dříve používal v lékařství a je obsažen v několika drogách. Jeho LOD pomocí GC-NP nebo GC-MS je v tomto případě 50 ng/ml.⁵⁶ Další známou látkou je heroin, známá droga rychle tvořící závislost. LOD pro tuto metodu je 200 ng/ml.⁵⁶ Je ale i vyvinuta metoda LC-MS na detekci 18 druhů narkotik v moči, včetně těchto dvou dosahující LOD od 0,5 ng/ml až po 20 ng/ml.⁶⁷

2.5.8. Zakázané pouze během soutěží a závodů – Další látky

Poslední skupiny zakázaných látek jsou kanabinoidy a glukokortikosteroidy. Mezi nejznámější kanabinoidy patří hašiš a marihuana. Pro tyto látky jsou známe především kvalitativní testy a až poté se zjišťuje kvantita. Imunologické testy či tenkovrstvá chromatografie (TLC, thin layer chromatography) potvrdí či vyvrátí nález kanabinoidu. Pro kvantitu se může použít metoda, která zahrnuje extrakci na pevné fázi a LC-MS s detektorem doby letu (TOF).⁶⁸ Mobilní fáze této techniky se skládala z 5 mM – octanu amonného v 0,1% kyselině mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Průtok byl v tomto případě nastaven na 0,3 ml/min a gradient začínal na 10% B, vzrostl na 40% B během 10-ti minut,

75% B v 13,75 min a 80% v čase 16 minut. Hranice WADA pro karboxy-THC (tetrahydrocannabinol) v moči je 15 ng/ml.⁴⁶

Glukokortikosteroidy mají protizánětlivé účinky a jejich syntetické analogy jsou zakázány, mezi nejznámější patří kortizol. Jedna z detekčních možností je LC-MS s ionizací elektrosprejem.⁶⁹ V závislosti na struktuře glukokortikosteroidu jsou detekční limity od 5 ng/ml do 20 ng/ml.

2.5.9. Látky zakázané pouze v některých sportech

Tato skupina zahrnuje pouze dvě látky. Alkohol a beta blokátory. Alkohol je zakázán pouze při závodech ve sportovních odvětvích jako například automobilových či motocyklových závodech, karate, letectví či moderním pětiboji. Stanovuje se z krve a hranice od WADA je 0,1 mg/ml. Beta blokátory jsou taktéž zakázány jen během soutěží a to v mnoha sportech – např. letectví, lukostřelbě, zápasu či golfu.³⁰

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Instrumentace

Praktická část byla provedena s využitím kapalinového chromatografu System Gold (Beckman, USA) a LCQ hmotnostního spektrometru s iontovou pastí (Thermo Electron, USA) s ionizací elektrosprejem. Kolona byla značky Supelco (Discovery, Zr-Carbon 15cm x 2,1 mm x 3 μ m, Bellefonte, PA, USA). Při zpracování rostlin rodu Ephedra byla použita centrifuga značky DenverInstrument (DenverInstrument Company, USA).

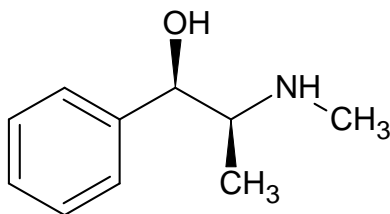


Obrázek 2: Spojení kapalinového chromatografu Beckmann a hmotnostního spektrometru Thermo Finnigan.
(Katedra Analytické chemie, Univerzita Palackého, Olomouc)

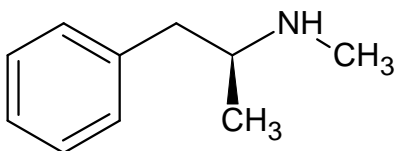
3.2 Chemikálie

Přesné navážky látek byly rozpuštěny ve směsi voda:methanol (1:1) na zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml. (voda - Millipore, Water Purification Systems, Direct UV, 18,2 MΩ·cm²; methanol – Biosolve, 99,5 %). Jednalo se o látky: efedrin, metamfetamin a parahydroxyamfetamin (kvalita p.a., Ústav Soudního Lékařství, Fakultní Nemocnice Univerzity Palackého, Olomouc). Přímý nástřik byl proveden se vzorkem o koncentraci 100 mg/l. Na mobilní fázi byly použity tyto látky: acetonitril (Merck, 99,9 %), kyselina 3,5-dinitrobenzoová (Fluka, 98 %) a voda (Millipore, Water Purification Systems, Direct UV, 18,2 MΩ·cm²). Při hledání optimálních podmínek separace byly ještě použity: kyselina trifluoroctová (Fluka, 99 %) a kyselina heptafluoromáselná (Fluka 99,5 %).

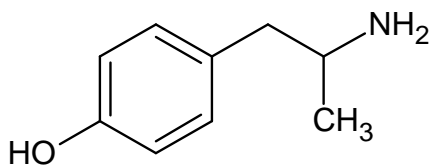
Pro experimentální část byly zajištěny rostliny *Ephedra Sinica*, *Ephedra Americana*, *Ephedra Fragilis* a *Ephedra Likiangensis* z Katedry Botaniky, Univerzita Palackého, Olomouc.



Obrázek 3: Efedrin ((R,S)-2-(methylamino)-1-fenylpropan-1-ol)



Obrázek 4: Metamfetamin ((S)-N-methyl-1-fenylpropan-2-amin)



Obrázek 5: *p*-Hydroxyamfetamin (4-(2-aminopropyl)fenol)

3.3 Metoda

Nastavení kapalinové chromatografie bylo s průtokem 0,1 ml/min a izokratická eluce v poměru A:B 70:30. Mobilní fáze A byla 5 mM - kyselina 3,5-dinitrobenzoová s 5 % cetonitrilu a B acetonitril. Hmotnostní spektrometr obsahoval ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu a tato nastavení: teplota vyhřívané kapiláry byla studována od 100 °C do 200 °C a na základě výsledků byla vybrána teplota 175 °C; vliv průtoku zmlžovacího plynu na kvalitě získaného hmotnostního spektra byl studován od 40 do 100 jednotek a bylo vybráno 80 jednotek; napětí na sprejovací kapiláře bylo studováno od 5,0 do 6,5 kV a vybráno bylo 5,6 kV; napětí na vstupní kapiláře bylo nastaveno pomocí automatického ladění, jež je součástí příslušného programového vybavení a bylo nastaveno na 10 V.

3.4 Pracovní postup

Z připravených zásobních roztoků efedrinu (EPH), metamfetaminu (MET) a parahydroxyamfetaminu (PHA) o koncentraci 1 g/l byly připraveny kalibrační roztoky ve směsi voda:methanol (1:1) o koncentracích látek 1 mg/l, 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l a 25 mg/l. Ty byly následně dávkovány stříkačkou Hamilton do kapalinového chromatografu.

Příprava vzorků rostlin rodu *Ephedra* (*Ephedra Sinica*, *Ephedra Americana*, *Ephedra Fragilis* a *Ephedra Likiangensis*) se skládala z rozetření 300 mg rostliny v třecí misce a převedení do 20 ml methanolu. Poté byly vzorky 30 minut v ultrazvuku a pak se zfiltrovaly. Poté se vzorky vysušily při 50 °C a kvantitativně se převedly do 1 ml mobilní fáze. Na závěr byly vzorky umístěny do centrifugy (10000 ot./min) na 20 minut.

3.5 Použité programové vybavení

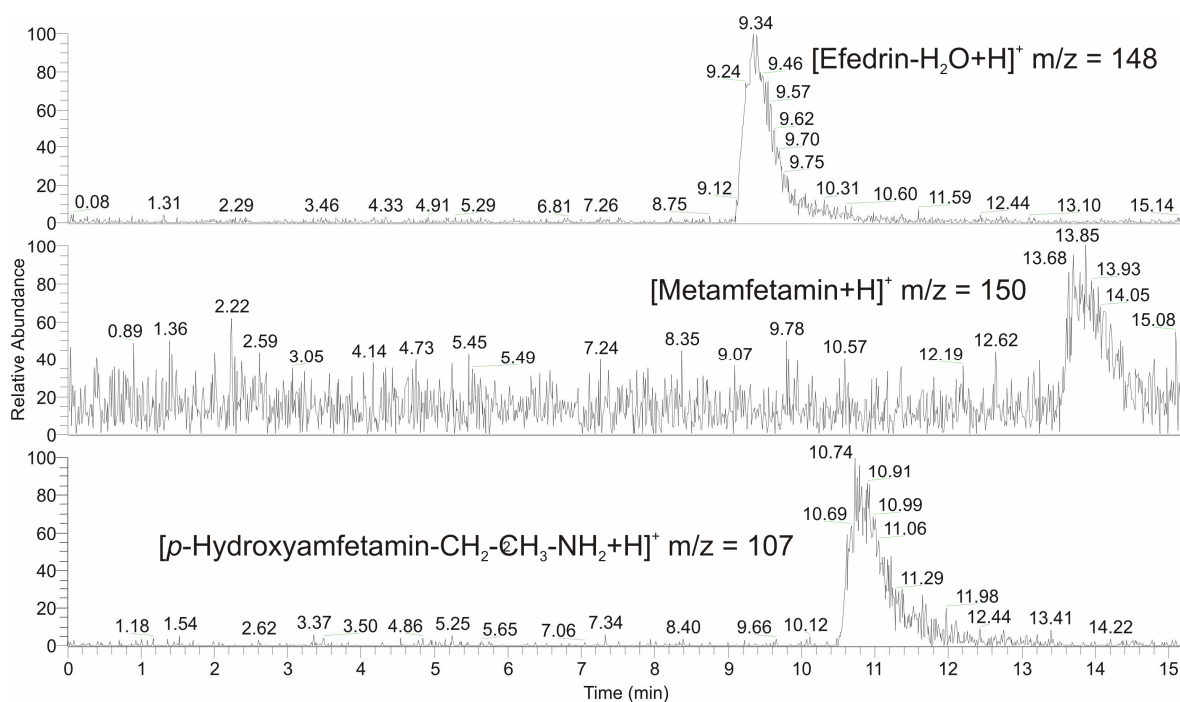
Základní statistické zpracování dat bylo realizováno pomocí programu Microsoft Excel 2003, ostatní výpočty byly provedeny programem QC.Expert (2.7).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Vývoj HPLC metody

Kapalinová chromatografie je technika, která separuje látky ze směsi a přivádí do detektoru. V této práci byla použita technika reverzních fází (RP-LC). Mobilní fáze byla polárnější než stacionární, kterou byl oxid zirkoničitý. Hledání optimální mobilní fáze začalo se systémem A = deionizovaná voda a B = methanol. Při izokratické eluci se látky neseparovaly z důvodu stejných retenčních časů, což byl nejčastější problém i u dalších mobilních fází. Byl tedy zkoušen ještě i gradient, ovšem bez lepších výsledků. Další možností bylo upravení pH a to přidáním 0,5 % kyseliny mravenčí do vody. Separace těchto tří látek (EPH, MET a PHA) stále nenastávala a tak byla zvolena kyselina heptafluoromáselná o koncentraci 10 mmol/l jako složka A. Bohužel ani při izokratické či gradientové eluci nebyly látky stále separovány. Další volbou byla 0,1 % kyselina trifluoroctová jako složka A a jako složka B stále methanol. Tato mobilní fáze byla také nevhodná. Poslední změnou byl přechod na složku B acetonitril a jako složka A byla použita kyselina 3,5 - dinitrobenzoová o koncentraci 5 mmol/l obsahující 5 % acetonitrilu. Eluce byla použita izokratická a to v poměru A:B 70:30 s průtokem 0,1 ml/min. Čas jednoho měření se pohyboval kolem 15-ti minut, což je podobný čas ve srovnání s Deventerem (2009), který stejnou metodou separoval pouze skupinu efedrinů. Jako mobilní fázi v jeho případě byl použit 2 % acetonitril s 0,1 % kyseliny octové a jako druhá složka byla 0,01 % kyselina trifluoroctová s časem měření 16 minut.⁶³

Další podobnou metodu publikoval Trujillo (2003).⁷⁰ Mobilní fáze v jejich případě obsahovala octan amonný, kyselinu octovou, acetonitril a vodu v poměru 3,8 g octanu na 30 ml acetonitrilu, 20 ml kyseliny octové a 500 ml vody. V jejich případě probíhala separace pouze skupiny efedrinů a retenční čas posledního z nich byl 23 minut.



Obrázek 6: Chromatogram separované směsi tří látek o koncentraci 2 mg/l.

Sledované ionty měly $m/z = 148$ $[EPH-H_2O+H]^+$, $m/z = 150$ $[MET+H]^+$ a $m/z = 107$ $[PHA-CH_2-CH_3-NH_2+H]^+$. Tyto ionty byly vybrány pro kvantifikační účely díky své nejvyšší intenzitě. Jejich identifikace byla založena nejen na základě těchto poměrů náboje ku hmotnosti, ale též na základě naměřených fragmentačních spekter.

4.2 Vývoj kvantifikační metody

Kalibrační body pro měření byly vyvíjeny v rozmezí koncentrací od 1 mg/l až po 25 mg/l. Každý bod byl změřen třikrát a průměr ploch píků byl vyneseno do grafu. Z těchto bodů byla spočítána data pro všechny tři separované látky – efedrin, metamfetamin a *p*-hydroxyamfetamin. Mez detekce pro EPH byla koncentrace 0,767 mg/l, pro MET 1,040 mg/l a pro PHA 1,890 mg/l. Mez kvantifikace byla ve stejném pořadí 1,134 mg/l, 1,538 mg/l a 2,795 mg/l. V porovnání s publikací Deventera et. al. (2009) se kvantifikační limit snížil (LOQ 5 mg/l), neboť v jejich publikaci byl jako limit kvantifikace použit kalibrační bod s přijatelnou reprodukovatelností.⁶³ V dalším případě (Trujillo, 2003) byla mez detekce 0,5 mg/l.⁷⁰

Kalibrační přímka je dána směrnici a absolutním členem a to pro každou látku takto:

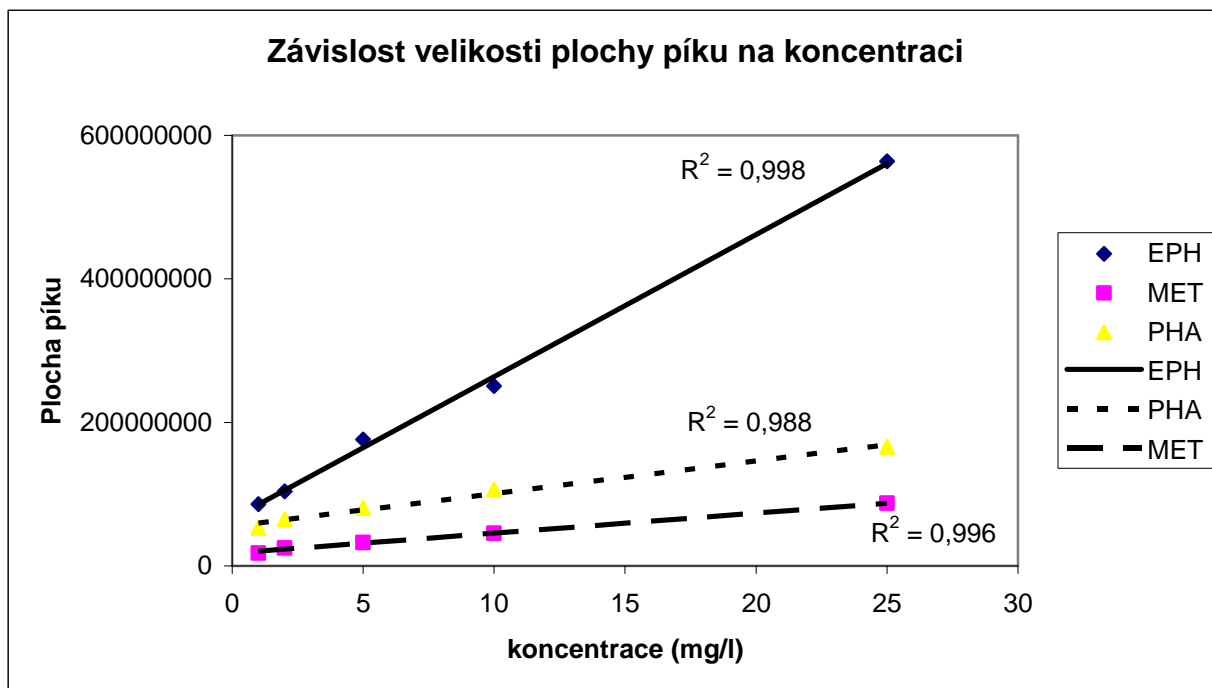
- Efedrin: $y = 19780424x + 65869052$
- Metamfetamin: $y = 2791542x + 17652729$
- p-hydroxyamfetamin: $y = 4532889x + 55187269$

Vysoké hodnoty směrnic dokazují, že je tato metoda velmi citlivá. Na druhou stranu ale vysoké hodnoty absolutních členů poukazují na velký šum a možný paměťový efekt kolony.

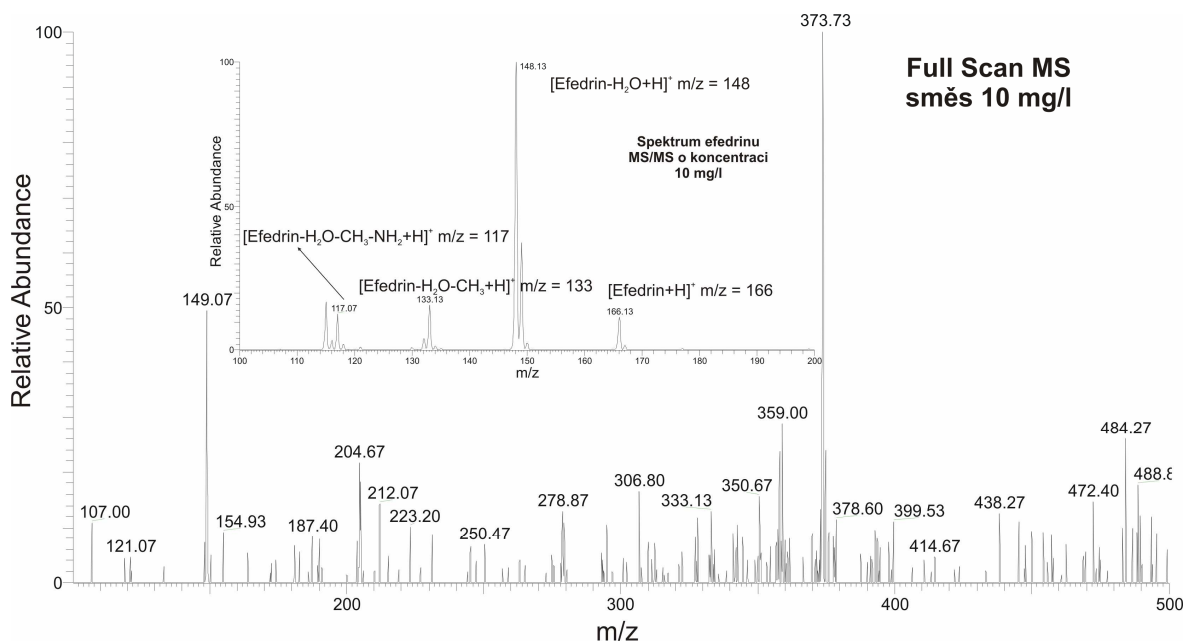
Relativní směrodatné odchylky se pro směrnici pohybovaly od 2,6 % (EPH) až po 6,4 % (PHA). U absolutních členů byly zaznamenány tyto odchylky od 6,5 % (PHA) po 9,6 % (EPH). Determinační koeficient R^2 kalibračních přímek byl pro EPH 0,998, což je vyšší než publikoval Deventer (2009) s výsledkem 0,962, který pro kalibrační přímku použil body v rozmezí koncentrací od 5 do 20 mg/l.⁶³ Pro další látky byl R^2 : MET 0,996 a PHA 0,988.

Látka	EPH	MET	PHA	
Mez detekce (mg/l)	0,767	1,040	1,890	Metoda dle
Mez kvantifikace (mg/l)	1,134	1,538	2,795	ISO 11843-2
Směrnice	19780424	2791542	4532889	
Směr, odchylka	514845	98578	290824	
Rel, směr, odchylka (%)	2,60	3,53	6,42	
Absolutní člen	65869052	17652729	55187269	
Směr, odchylka	6326520	1211345	3573709	
Rel, směr, odchylka (%)	9,60	6,86	6,48	
Determinační koeficient	0,998	0,996	0,988	(Excel)

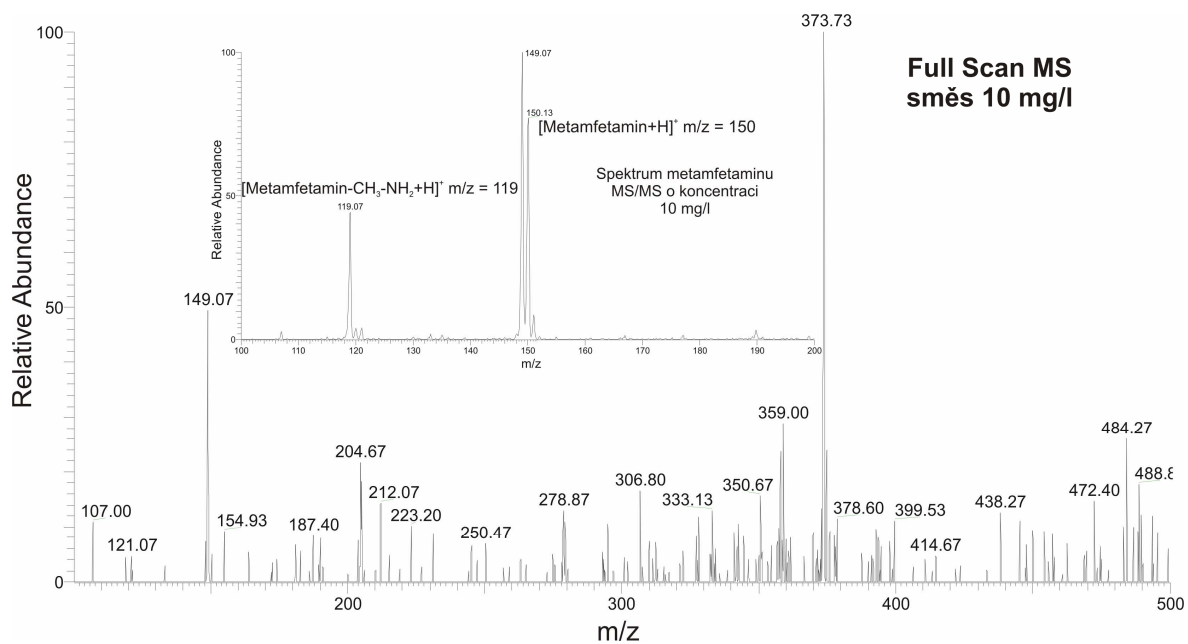
Tabulka 1: Výsledky z měření kalibrační přímky.



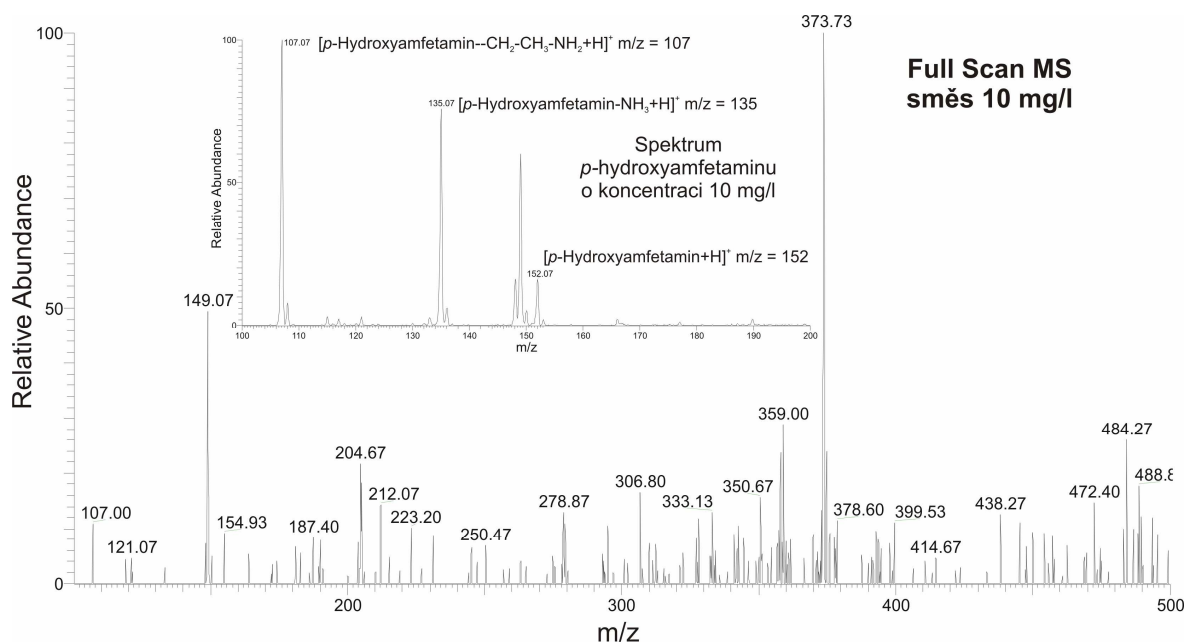
Obrázek 7: Graf závislosti plochy píku na koncentraci vzorku.



Obrázek 8: Spektrum efedrinu ze směsi o koncentraci 10 mg/l.



Obrázek 9: Spektrum metamfetaminu ze směsi o koncentraci 10 mg/l.



Obrázek 10: Spektrum *p*-hydroxyamfetaminu ze směsi o koncentraci 10 mg/l.

4.3 Příprava a měření reálného vzorku

Reálné vzorky, rostliny rodu *Ephedra*, byly zajištěny z Katedry Botaniky, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Olomouc. Poskytnuty byly druhy *Ephedra Sinica*, *Ephedra Americana*, *Ephedra Fragilis* a *Ephedra Likiangensis*.

Každý z připravených vzorků byl desetkrát zředěn, třikrát změřen a výsledná zprůměrovaná plocha vztažená na 1 ml dosazena do kalibrační přímky.

Druh	Koncentrace (mg/l)	Směr. odchylka	Rel. směr. odchylka (%)
<i>Ephedra Sinica</i>	73,00	4,99	6,84
<i>Ephedra Americana</i>	7,02	0,33	4,70
<i>Ephedra Fragilis</i>	-		-
<i>Ephedra Likiangensis</i>	-		-

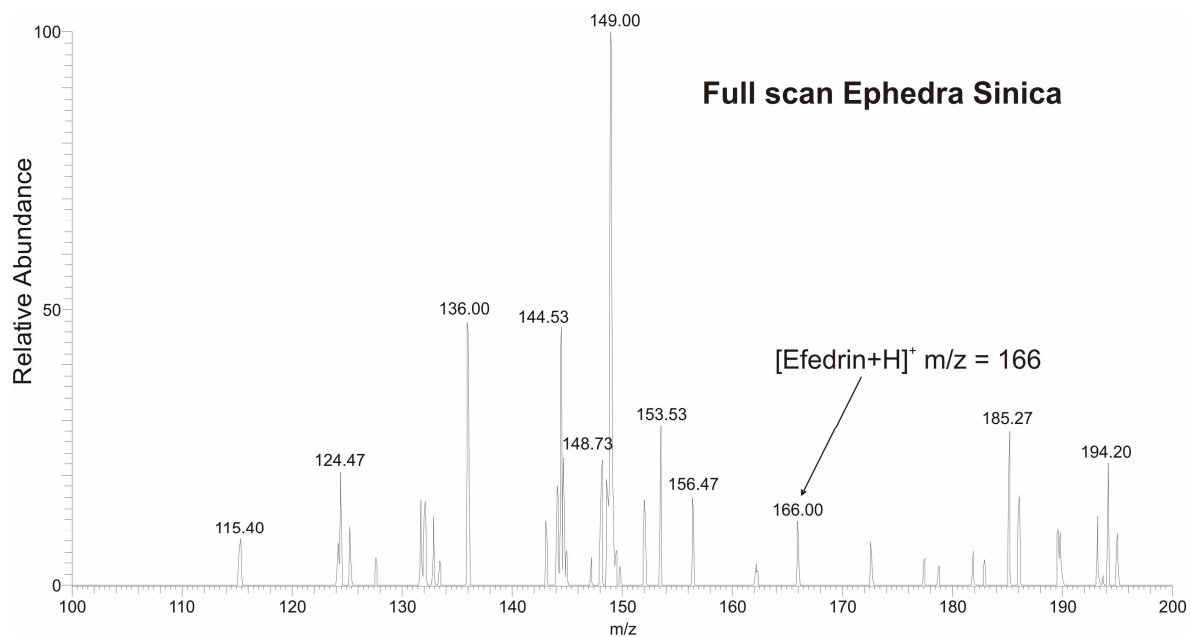
Tabulka 2: Reálné vzorky a jejich hmotnostní koncentrace.

Druh	Obsah efedrinu v 1 g (ppm)	Směr. odchylka	Rel. směr. odchylka (%)
<i>Ephedra Sinica</i>	811,37	55,41	6,83
<i>Ephedra Americana</i>	78,00	3,66	4,69
<i>Ephedra Fragilis</i>	-		-
<i>Ephedra Likiangensis</i>	-		-

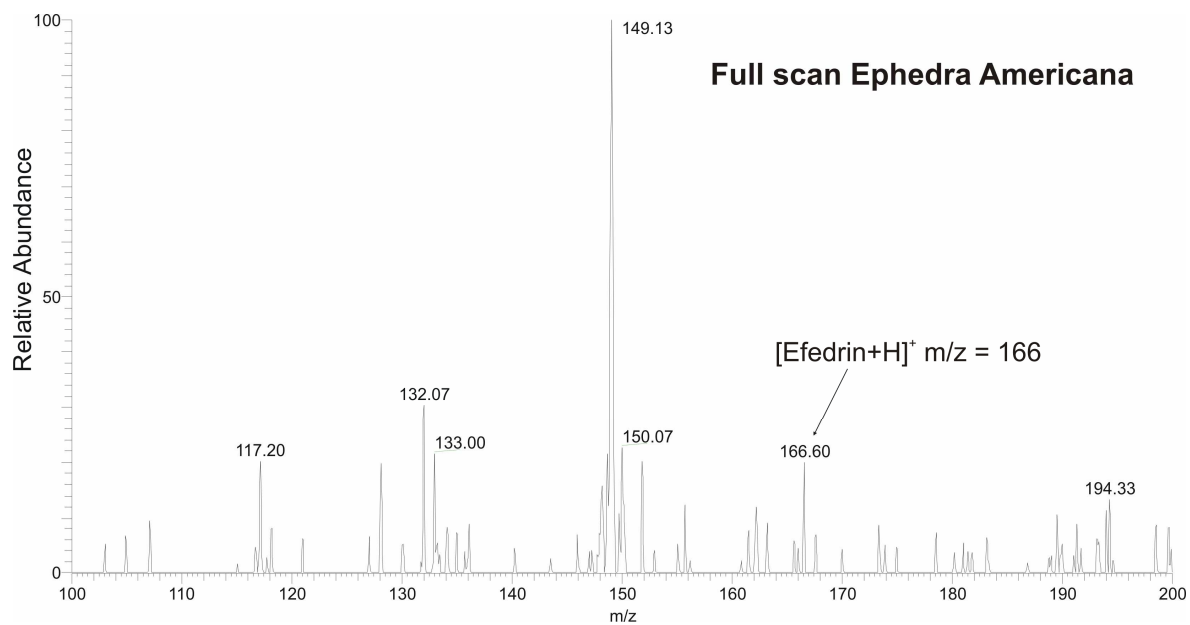
Tabulka 3: Reálné vzorky a obsah dané látky v 1 g.

Po dosazení do kalibrační přímky bylo zjištěno, že vzorek *Ephedra Sinica* obsahoval koncentraci efedrinu $73,00 \pm 4,99$ mg/l. *Ephedra Americana* $7,02 \pm 0,33$ mg/l. Druh *Ephedra Fragilis* obsahovala koncentraci efedrinu, ovšem v hodnotě pod limitem kvantifikace. U druhu *Ephedra Likiangensis* byla koncentrace efedrinu pod limitem detekce.

Hmotnostní spektra naznačovala ještě přítomnost dalších látek ze skupiny efedrinů a to norefedrinu a pseudoefedrinu díky jejich molekulovým hmotnostem.



Obrázek 11: Spektrum získané průměrováním píku pro $m/z = 166$. (Ion efedrinu pro vzorek Ephedra Sinica.)



Obrázek 12: Spektrum získané průměrováním píku pro $m/z = 166$. (Ion efedrinu pro vzorek Ephedra Americana.)

5. ZÁVĚR

Spojení dvou analytických metod, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, se stalo moderním a účinným postupem na separaci a detekci látek. Nejinak tomu bylo i v této práci, kdy byly separovány tři nízkomolekulární látky. Efedrin, metamfetamin a *p*-hydroxyamfetamin.

Optimální mobilní fáze se skládala z 5 mM – kyseliny 3,5-dinitrobenzoové obsahující 5 % acetonitrilu a acetonitrilu samotného. Separace probíhala do 15-ti minut s retenčními časy cca 8,5 min pro EPH, 9,5 min pro PHA a 14,5 min pro MET.

Kalibrační model byl vytvořen na případnou kvantifikaci těchto látek. Pro demonstrační účely aplikačního potenciálu navržených metod bylo kvantifikováno množství efedrinu ve 4 vybraných rodech Ephedry.

Ve dvou z nich byl kvantifikován obsah efedrinu, u Ephedra Fragilis byl detekován, ale pod limitem kvantifikace a u druhu Ephedra Likiangensis byl obsah efedrinu pod limitem detekce. Druh Ephedra Sinica měl obsah efedrinu $811,37 \pm 55,41$ ppm v 1 g rostlinného vzorku. Ephedra Americana obsahovala $78,00 \pm 3,66$ ppm v 1 g vzorku.

6. LITERATURA

1. Sullivan D., Wehrmann J., et al.: Determination of ephedra alkaloids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86, 3 (2003).
2. Jenkins P.: Doping in sport. *The Lancet*, 360, 9327 (2002).
3. Catlin D.H., Fitch K.D., Ljungqvist A.: Medicine and science in the fight against doping in sport. *Journal of Internal Medicine*, 264, 2 (2008).
4. Klein H.G.: Blood-transfusion and athletics. *New England Journal of Medicine*, 312, 12 (1985).
5. Voss S.C., Thevis M., Schinkothe T., Schanzer W.: Detection of homologous blood transfusion. *International Journal of Sports Medicine*, 28, 8 (2007).
6. World Anti-Doping Agency: WADA Code. <http://www.wada-ama.org>, staženo 3.4.2009
7. O'Connor D.B., Archer J., Wu F.C.W.: Effects of testosterone on mood, aggression, and sexual behavior in young men: A double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 6 (2004).
8. Volka K., et al.: *Analytická chemie II. 1997, VŠCHT Praha.*
9. Unger K.K., Skudas R., Schulte M.M.: Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184, 1-2 (2008).
10. Ballschmitter K., Wössner M.: Recent developments in adsorption liquid chromatography (NP-HPLC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 8 (1998).
11. Dorsey J.G., Dill K.A.: The molecular mechanism of retention in RP-LC. *Chemical Reviews*, 89, 2 (1989).
12. Rafferty J.L., Zhang L., et al.: Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective. *Analytical Chemistry*, 79, 17 (2007).
13. Mamone G., Picariello G., Caira S., Addeo F., Ferranti P.: Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. *Journal of Chromatography A*, 1216, 43 (2009).

14. Fenselau C., Caprioli R.: Mass spectrometry in the exploration of Mars – Introduction. *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 1 (2003).
15. Hoffmann E.d., Stroobant V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2007, 3rd edition
16. Rudge M.R.H.: Theory of ionization of atoms by Electron Impact. *Reviews of Modern Physics*, 40, 3 (1968).
17. Rosenberg L.: On electron impact – ionization theory. *Physica Scripta*, 77, 1 (2008).
18. Yamashita M., Fenn J.B.: Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88, 20, (1984).
19. Eberlin M.N.: Electrospray ionization mass spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase. *European Journal of Mass Spectrometry*, 13, 1 (2007).
20. Carroll D.I., Dzidic I., Horning E.C., Stillwell R.N.: Atmospheric-pressure ionization mass-spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 17, 3 (1981).
21. Andrade F.J., Shelley J.T., Wetzel W.C., Webb M.R., Gamez G., Ray S.J., Hieftje G.M.: Atmospheric pressure chemical ionization source. 1. Ionization of compounds in the gas phase. *Analytical Chemistry*, 80, 8 (2008).
22. Goodwin R.J.A., Pennington S.R., Pitt A.R.: Protein and peptides in pictures: Imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics*, 8, 18 (2008).
23. Todd J.F.J.: Ion Trap Mass-Spectrometer – Past, Present and Future. *Mass Spectrometry Reviews*, 10, 1 (1991).
24. McLuckey S.A.: Quadrupole ion trap mass spectrometry – Introduction. *International Journal of Mass Spectrometry*, 191 (1999).
25. Wiley W.C., McLaren I.H.: Time of flight Mass Spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments*, 26, 12 (1955).
26. Bonesini M.: A review of recent techniques of TOF detectors. *Astroparticle, Particle and Space Physics, Detectors and Medical Physics Application* (2004)
27. Koppenaal D.W., Barinaga C.J., Denton M.B., Sperline R.P., Hieftje G.M., Schilling G.D., Andrade F.J., Barnes J.H.: MS Detectors. *Analytical Chemistry*, 77, 21 (2005).

28. Zhou S.L., Song Q., Tang Y., Weng N.D.: Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. *Current Pharmaceutical Analysis*, 1, 1 (2005).
29. Docherty J.R.: Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *British Journal of Pharmacology*, 154, 3 (2008).
30. World Anti-Doping Agency: The World Anti-Doping Code – The 2009 Prohibited List, International Standard.
31. Winter W.E.: Hormones – From Molecules to Disease. *American Journal of Human Biology*, 3, 4 (1991).
32. Saudan C., Baume N., Robinson N., Avois L., Mangin P., Saugy M.: Testosterone and doping control. *British Journal of Sports Medicine*, 40, (2006).
33. Askew E.B., Gampe R.T., Stanley T.B., Faggart J.L., Wilson E.M.: Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 35 (2007).
34. Baume N., Saudan C., Desmarchelier A. et al.: Use of isotope ratio mass spectrometry to detect doping with oral testosterone undecanoate: Inter-individual variability of C-13/C-12 ratio. *Steroids*, 71, 5 (2006).
35. World Anti-Doping Agency. WADA technical document – TD2004EAAS. Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E Ratio, and other endogenous steroids. (2004)
36. Oftebro H., Jensen J., Mowinckel P., et al.: Establishing a ketoconazole suppression test for verifying testosterone administration in the doping control of athletes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78, 4 (1994).
37. Robinson N., Saudan C., Sottas P.E., et al.: Performance characteristics of two immunoassays for the measurement of urinary luteinizing hormone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1 (2007).
38. Danaceau J.P., Morrison M.S., Slawson M.H.: Quantitative confirmation of testosterone and epitestosterone in human urine by LC/Q-ToF mass spectrometry for doping control. *Journal of Mass Spectrometry*, 43, 7 (2008).
39. Aguilera R., Catlin D.H., et al.: Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols. *Journal of Chromatography B*, 727, 1-2 (1999).

40. Thomas A., Geyer H., Kamber M., Schänzer W., Thevis M.: Mass spectrometric determination of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in human urine for doping control purposes by means of LC–ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 43, 7 (2008).
41. Kintz P., Cirimele V., Jeanneau T., Ludes B.: Identification of testosterone and testosterone esters in human hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 23, 5 (1999).
42. Chen H.X., Deng Q.P., Zhang L.W., Zhang X.X.: Quantification of testosterone and epitestosterone in biological samples by capillary electrophoresis with immunoaffinity extraction. *Talanta*, 78, 2 (2009).
43. Ward R.J., et al.: Gas chromatographic – Mass spectrometric methods for detection and identification of anabolic steroid drugs. *British Journal of Sports Medicine*, 9, 2 (1975).
44. Ayotte C.: Significance of 19-norandrosterone in athletes' urine samples. *British Journal of Sports Medicine*, 40, 1 (2006).
45. Van der Merwe P.J., Grobbelaar E.: Unintentional doping through the use of contaminated nutritional supplements. *South African Medical Journal*, 95, 7 (2005).
46. World Anti-Doping Agency: Minimum Required Performance Limits for Detection of Prohibited Substances.
47. Saugy M., Robinson N., Saudan C., et al.: Human growth hormone doping in sport. *British Journal of Sports Medicine*, 40, 1 (2006).
48. Robinson N., Giraud S., Saudan C., et al.: Erythropoietin and blood doping. *British Journal of Sports Medicine*, 40, 1 (2006).
49. Lasne F., de Ceaurriz J.: Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, 405,635 (2000).
50. Thevis M., Schänzer W.: Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. *Mass Spectrometry Reviews*, 26, 1 (2007).
51. Deventer K., Delbeke F.T., et al.: Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 16, 8, (2002).
52. Ventura R., Damasceno L., Farre M., Cardoso J., Segura J.: Analytical methodology for the detection of beta(2)-agonists in urine by gas chromatography-

- mass spectrometry for application in doping control. *Analytica Chimica Acta*, 418, 1 (2000).
53. Shen S.H., Ouyang J., et al.: Determination of beta(2)-agonists by ion chromatography with direct conductivity detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 1 (2005).
 54. Elliott S.: Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *British Journal of Pharmacology*, 154, 3, (2008).
 55. Docherty J.R.: Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency. *British Journal of Pharmacology*, 154, 3 (2008).
 56. Van Thuyne W., van Eenoo P., Delbeke F.T.: Comprehensive screening method for the qualitative detection of narcotics and stimulants using single step derivatisation. *Journal of Chromatography*, 857, 2 (2007).
 57. Andersson M., Gustavsson E., Stephanson N., Beck O.: Direct injection LC–MS/MS method for identification and quantification of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Journal of Chromatography*, 861, 1 (2008).
 58. McClain J., Bender J., Woods H., et al.: An ONLINE DAT immunoassay for the detection of amphetamine, methamphetamine, and designer amphetamines in urine. *Clinical Chemistry*, 54, 6 (2008).
 59. Nieddu M., Boatto G., Carta A., et al.: Simultaneous determination of ten amphetamine designer drugs in human whole blood by capillary electrophoresis with diode array detection. *Biomedical Chromatography*, 19, 10 (2005).
 60. Van Eenoo P., Delbeke F.T., Roels K., De Backer P.: Simultaneous quantitation of ephedrines in urine by gas chromatography–nitrogen–phosphorus detection for doping control purposes. *Journal of Chromatography B*, 760, 2 (2001).
 61. Marais A.A., Laurens J.B.: Rapid GC-MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation. *Forensic Science International*. 183, 1-3 (2009).
 62. Roman M.C.: Determination of Ephedra Alkaloids in Urine and Plasma by HPLC-UV: Collaborative Study. *The Journal of AOAC Int.*, 87, 1 (2004).
 63. Deventer K., Pozo O.J., et al.: Development and validation of an LC–MS/MS method for the quantification of ephedrines in urine. *Journal of Chromatography B*, 877, 4 (2008).

64. Xiuhan Y., Xiaochuan W., Xiangmin Z.: Capillary zone electrophoresis separation of low concentration stimulants in human urine with laser-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 549, 1-2 (2005).
65. Langman L.J., Bjergum M.W., et al.: Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 33, 8 (2008).
66. Lu Y., O'Donnell R.M., Harrington P.B.: Detection of cocaine and its metabolites in urine using solid phase extraction-ion mobility spectrometry with alternating least squares. *Forensic Science International*, 189, 1-3 (2009).
67. Deventer K., Pozo O.J., Van Eenoo P., Delbeke F.T.: Development of a qualitative liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the detection of narcotics in urine relevant to doping analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 18 (2007).
68. Kolmonen M., Leinonen A., et al.: A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 585, 1 (2007).
69. Mazzarino M., Turi S., Botre F.: A screening method for the detection of synthetic glucocorticosteroids in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry based on class-characteristic fragmentation pathways. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 5 (2008).
70. Trujillo W.A., Sörenson W.R.: Determination of Ephedrine Alkaloids in Human Urine and Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 86, 4 (2003).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

UCI	The Union Cycliste Internationale
IOC	The International Olympic Committee
IOC-MC	The International Olympic Committee – Medical Commission
IAAF	International Amateur Athletic Federation
WADA	The World Anti-Doping Agency
WAC	The World Anti-Doping Code
NP	normal phase
RP	reverse phase
LC	liquid chromatography
M ⁺	kation radikál
MH ⁺	molekulový ion
EI	electron ionization
CI	chemical ionization
ESI	electrospray ionization
API	atmospheric pressure ionization
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
APPI	atmospheric pressure photo ionization
TSP	thermospray
MALDI	matrix assisted laser desorption / ionization
FAB	fast atom bombardment
FIB	fast ion bombardment
m/z	mass to charge ratio
TOF	time of flight
MS	mass spectrometry
LC	liquid chromatography
GC	gas chromatography
IRMS	isotope ratio mass spectrometry
hGH	human growth hormone
rhGH	recombinant human growth hormone
EPO	erythropoietin

rHuEPO	recombinant human erythropoietin
IEF	isoelectric focusation
CNS	central nervous system
CZE	capillary zone electrophoresis
LIF	laser induced fluorescence
EPH	ephedrine
MET	metamphetamine
PHA	<i>p</i> -hydroxyamphetamine