

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

IDENTIFIKACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH
LÁTEK V KREVNÍ STOPĚ NA PEVNÉM POVRCHU
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jméno autora: Martin Švidrnoch

Vedoucí práce: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Management v Chemii

Rok: 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

Souhlasím s tím, aby práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 5.5.2010

.....
Vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji panu prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za cenné připomínky, čas a rady, které mi poskytl, a slečně Mgr. Lucii Hartmanové za konzultaci a pomoc s experimentální částí. Rovněž bych rád poděkoval své rodině za vytrvalou podporu v mém studiu.

V Olomouci dne 5.5.2010

Martin Švidrnoch

OBSAH

1. Úvod	1
2. Forenzní chemie biologických vzorků	2
2.1 Vymezení forenzní chemie	2
2.2 Základní biologické vzorky	2
2.3 Biotransformace látek v organismu	4
3. Krev a biologicky aktivní látky.....	6
3.1 Orientační zkouška na přítomnost krve.....	6
3.1.1 Průkaz krve pomocí luminolu	6
3.1.2 Průkaz krve pomocí benzidिनové zkoušky.....	7
3.2 Instrumentální metody v analýze krve pro forenzní účely	7
3.3 Vybrané biologicky aktivní látky	10
3.3.1 Stimulanty.....	10
3.3.2 Sedativa a hypnotika	12
3.3.3 Analgetika	13
4. Experimentální část	15
4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení	15
4.2 Orientační zkoušky a jejich provedení	15
4.3 Příprava standardů s vzorků k analýze	16
4.4 Analýza hmotnostní spektrometrií (nanoDESI-MS)	18
5. Výsledky a diskuze	19
5.1 Volba podmínek analýzy.....	19
5.2 Analýza vzorků	20
6. Závěr	36
7. Rejstřík použitých pojmů a zkratk	37
8. Použitá literatura	38

SOUHRN

Práce se zabývá využitím hmotnostní spektrometrie s ionizací desorpčním nano-elektrosprejem (nanoDESI-MS) k rychlému screeningu a průkazu biologicky aktivních látek v krevních stopách. V teoretické části jsou popsány i další instrumentální metody často aplikované ve forenzní chemii. Pro vybrané modelové látky byla vyvinuta metoda umožňující rychlou identifikaci toxikologicky významných látek v krevních stopách na pevných površích pro forenzní či toxikologické účely, zahrnující i vybrané předběžné testy na přítomnost krve. Zároveň byly navrženy a vyzkoušeny nové povrchy umožňující zlepšení ionizace i možnost jejich aplikace v praxi.

SUMMARY

This work deals with the use of mass spectrometry with desorption nano-electrospray ionization (nanoDESI-MS) for rapid screening and identification of biologically active substances in the blood sample deposited on a solid surface. In the theoretical part, there are described other instrumental methods frequently used in forensic chemistry. A method allowing rapid identification of toxicologically relevant substances in blood traces found on solid surfaces for forensic and toxicological purposes has been developed, including some selected preliminary tests for the presence of blood. At the same time, new surfaces for improving the ionization efficiency and the possibility of their application in practice have been developed and tested.

1. ÚVOD

Výzkum v oblasti chemických věd a forenzního zkoumání je velmi široký a rychlý. Neustále jsou vyvíjeny nové a nové postupy a instrumentální metody jak identifikovat a stanovovat jednotlivé analyty v rozmanitém spektru vzorků a matric.

Vývoj v oblasti zakázaných a návykových látek rovněž nezůstává bez povšimnutí. Na černý trh se dostávají nové a účinnější drogy a stimulanty. Jako příklad je možné uvést syntetické deriváty fenylethylaminů, např. PMMA (paramethoxymethamfetamin) nebo 2-CB (4-bromo-2,5-dimethoxyfenylethylamin) [1]. Snižuje se množství užívané látky, a také prekursorů a látky potřebné k jejich výrobě jsou daleko dostupnější než kdysi. Toto všechno je nutno brát v potaz a přizpůsobit tomu i postupy v analytické chemii, zkoumat působení nových látek, jejich metabolismus a možnosti identifikace a stanovení v biologických matricích či v nalezených vzorcích.

Cílem této bakalářské práce je poskytnout základní přehled problematiky identifikace biologicky aktivních látek v krevních stopách na pevném povrchu za pomoci hmotnostní spektrometrie s ionizací desorpčním neno-elektrosprejem. Současně jsou zmíněny vybrané metody přípravy vzorku i vlastní analýzy a interpretace zjištěných výsledků.

2. FORENZNÍ CHEMIE BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

2.1 Vymezení forenzní chemie

Forenzní chemie je jednou z aplikovaných odvětví chemie, která se zabývá průkazem, identifikací a stanovením chemických látek pro účely kriminalistického šetření zvláště nebezpečné trestné činnosti a soudního řízení. Pro forenzní účely je za primární biologický materiál považována krev, moč a sliny [2]. Z hlediska metod používaných k získávání vzorků k samotné analýze je možné je dělit na [3]:

1. invazivní, tedy získané narušením tělesné integrity jedince (jedná se např. o krev, vzorky tkání apod.) a
2. neinvazivní, tedy takové, k jejichž získání není nutný zásah do tělesné integrity (např. moč, sliny, pot apod.).

2.2 Základní biologické vzorky

Ve forenzních aplikacích chemie je zapotřebí pečlivosti při shromažďování a vyhodnocování stop. Nesmí dojít ke kontaminaci získané stopy, proto je nutno veškeré postupy provádět v ochranných rukavicích, oděvech případně i respirátorech, aby byla zcela eliminována možnost přímého kontaktu se stopou. Biologické materiály odebrané k analýze či dokonce samotné analyty podléhají biologické i chemické degradaci a je nutné je dobře uchovávat nebo konzervovat.

Je-li známo, které látky chceme konkrétně identifikovat, jde o **cílenou analýzu**, kdy je podle hledané látky možné přizpůsobit použité metody, postupy a instrumentaci. V opačném případě testujeme vzorek na přítomnost zakázaných nebo podezřelých látek. V tomto případě se jedná o **systematickou analýzu**, kdy je požadován objektivní průkaz přítomnosti jakéhokoli xenobiotika ve zkoumaném biologickém vzorku [3].

Mezi často používané biologické vzorky získané ze stop na místech činů patří zejména krev, moč, sliny, tkáně či kožní deriváty (vlasy, chlupy apod.) nebo sperma. Níže jsou uvedeny základní fyzikálně-chemické charakteristiky uvedených biologických materiálů, především pak krve, jíž se tato práce zabývá.

Moč – Je to světle žlutá tekutina s charakteristickým zápachem, který je zřetelný především po delším styku se vzduchem, kdy působením enzymů z močoviny vzniká amoniak [4]. Obvykle se jedná o primární biologickou tekutinu používanou k analýze, protože koncentrace hledaných látek zde bývají vyšší a kromě samotných látek se zde vyskytují i jejich metabolity a konjugáty [3].

Sliny – Vznikají ve slinných žlázách a asi z 99,4 % obsahují vodu, dále pak organické a anorganické látky, enzymy a proteiny, které upravují jejich viskozitu a kohezi [4]. Koncentrační hladina zkoumaných analytů bývá nízká, záleží na distribuci a přenosu z krve, odkud se transportují difúzí. Průnik do slin je silně ovlivněn vlastnostmi samotných látek – zejména jejich rozpustností. Další nevýhodou je možnost kontaminace vzorku již v ústech, např. vlivem kouření, potravy nebo bakteriální infekce. Podstatnou výhodou je neinvazivní způsob odběru a snadná dostupnost vzorku, především pro rychlé orientační analýzy zaměřené např. na přítomnost návykových látek.

Tkáně a kožní deriváty – Patří mezi méně často používané alternativní materiály, především proto, že analyty se do nich transportují až sekundárně z krevního oběhu [3]. Jisté omezení je způsobeno také jejich špatnou dostupností a nutností invazivního zásahu do organismu (s výjimkou např. vlasů). U mnoha látek však může docházet k jejich deponování, především ve špatně prokrvených tkáních obsahujících tuk, nebo sekundárně v kožních derivátech jako jsou vlasy. Tam je možné látky prokázat i po delší době, která od užívání nebo expozice uplynula, a je možné z jejich obsahu usuzovat na míru intoxikace, zdali se jedná o náhodnou a nárazovou dávku, dlouhodobou expozici, nebo chronické zneužívání [3,5].

Krev – Tvoří složitou soustavu, je to kapalná cirkulující tkáň skládající se z buněk (červené krvinky, bílé krvinky, krevní destičky) a z tekuté plazmy, která obsahuje asi 90-91 % vody, 6-8 % plazmatických proteinů a zbytek tvoří rozpuštěné anorganické soli včetně transportovaných látek [4]. Normální hodnota pH krve je $7,4 \pm 0,04$. Hlavními funkcemi krve je dopravovat živiny, kyslík a stopové prvky do tkání a zároveň odvádět odpadní a metabolické produkty. Krev v těle zajišťuje transport

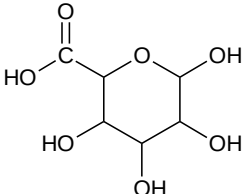
jiných látek a metabolitů, jako jsou např. aminokyseliny, hormony či vitamíny, včetně léčiv a jiných biologicky aktivních látek. Při průniku zkoumané látky do organismu trávicím traktem (GIT), plícemi (inhalace, kouření, dýchání apod.), sliznicemi (nos, ústa apod.) nebo přímým intravenózním (i.v.), intramuskulárním (i.m.) nebo subkutánním (s.c.) způsobem je krev primárním zdrojem vzorku pro analýzu. Může obsahovat jak aktivní látku při jejím transportu, tak i její metabolity při jejich odvádění z míst biotransformace. Analýzou vzorku krve je možno jednoznačně prokázat přítomnost látky v organismu.

2.3 Biotransformace analytu v organismu [3]

Stejně tak, jak je důležité rozpoznat ve vzorku biologicky aktivní látku, je nutné znát i její metabolismus a produkty, které biotransformací vznikají. Pro účely forenzní nebo toxikologické analýzy je možnost průkazu metabolitů velmi důležitou částí. Biotransformací je míněna změna struktury chemické látky vlivem působení chemických pochodů v živém organismu. Z hlediska chemických vlastností dělíme cizí látky vstupující do organismu na hydrofilní a lipofilní. Látky hydrofilní, tedy polární či ionizovatelné, jsou vesměs vylučovány ledvinami a v původní formě opouštějí organismus. Naopak látky lipofilní jsou transformovány na polárnější metabolity a teprve tyto jsou z organismu postupně vylučovány.

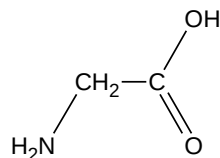
Celý proces transformace má v obecné rovině dvě fáze – nesyntetickou a syntetickou, V **nesyntetické** fázi (reakce I. fáze) dochází k oxidačním, redukčním nebo hydrolytickým reakcím, dealkylacím a tvorbě sulfoxidů za katalýzy enzymy, nejčastěji účinkem jaterního enzymatického systému cytochromu P 450 (CYP450) . V **syntetické** fázi (reakce II. fáze) dojde ke konjugaci metabolitů vzniklých v nesyntetické fázi s endogenními substráty přítomnými v organismu, např. kyselinou glukuronovou, glycinem či glutathionem (Tab. I).

Tabulka I. – Přehled struktur vybraných konjugačních substrátů [3]

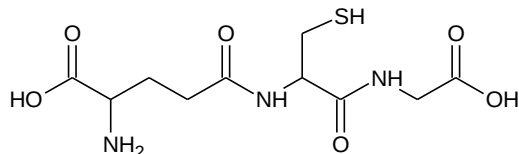
Triviální název	Systematický název	Strukturní vzorec
Kyselina glukuronová	3,4,5,6-tetrahydroxy- tetrahydropyran-2- karboxylová kyselina	

Pokračování tabulky I. ze strany 4

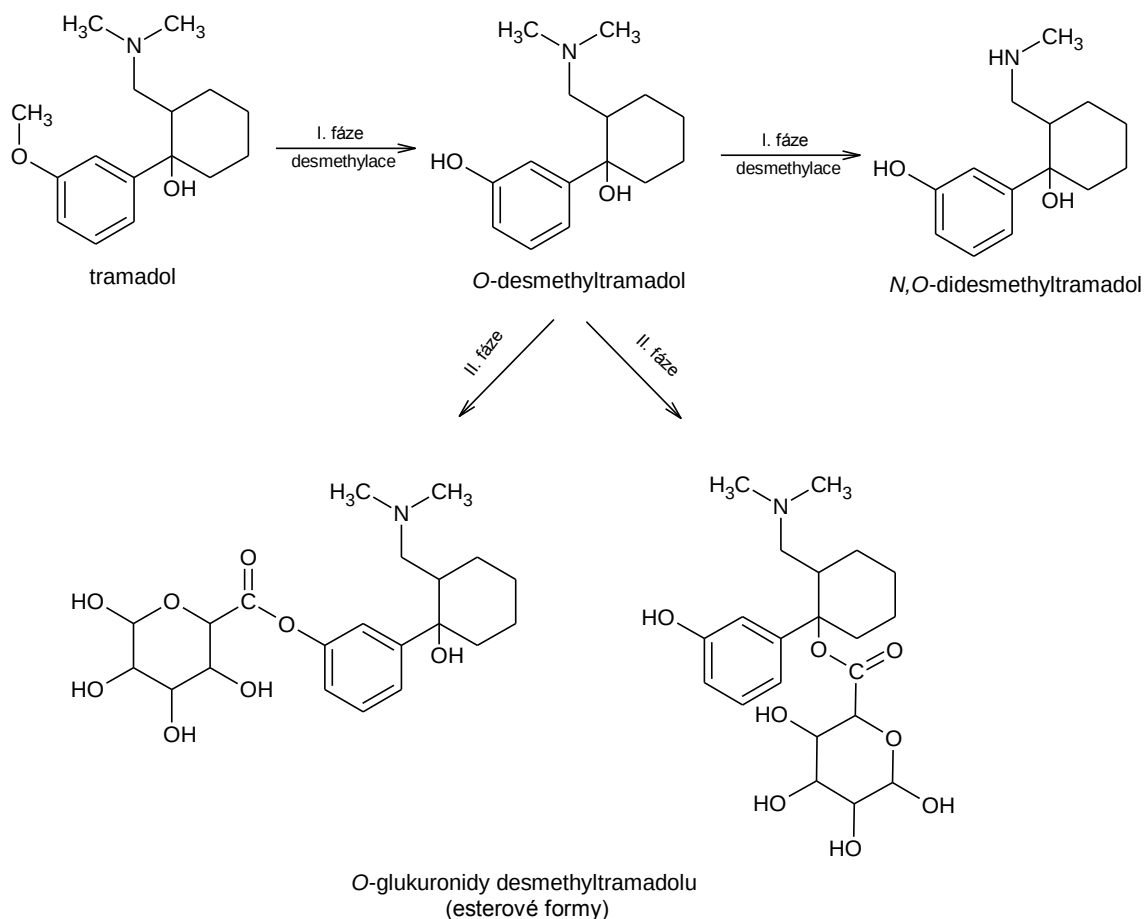
Glycin 2-aminoethanová
kyselina



Glutathion γ -L-glutamyl-L-
cysteinylglycin
(redukována forma)



Příklad metabolismu centrálního analgetika tramadolu je uveden na obrázku 1. Tramadol je metabolisován přes *N*- a *O*-desmethylované produkty a dále následuje glukurodinace fenolické skupiny. *O*-desmethyl metabolit je navíc farmakologicky aktivnější, než samotný tramadol [8].



Obr. 1 –Příklad možného metabolismu tramadolu. I. fáze - desmethylace a didesmethylace a II. fáze - konjugace s kyselinou glukuronovou [6-8]

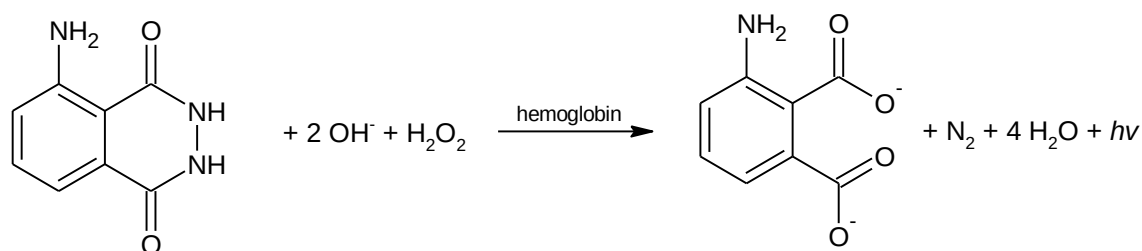
3. KREV A BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY

3.1 Orientační zkouška na přítomnost krve

Orientační zkouška, prokazující přítomnost krve ve vzorku, je nezbytnou součástí předcházející vlastní analýze. Je nutné potvrdit nebo vyvrátit, zdali se skutečně jedná o vzorek krve či zaschlé stopy vína nebo jídla, protože analýza bývá mnohdy nákladná. Obvykle se tato kvalitativní analýza provádí přímo na místě činu, aby se zamezilo záměně vzorků. Ne vždy je to však možné, např. vzhledem k množství vzorku, jeho lokalizaci (pevný povrch, látka či jiný materiál schopný sorpce činidel) apod. Z mnoha typů kvalitativní analýzy krevních stop jsou zde uvedeny dva nejběžnější a nejjednodušší:

3.1.1 Průkaz krve pomocí luminolu

Luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) je luminofor, při jehož oxidaci pomocí peroxidu vodíku nebo jiného anorganického peroxidu v bazickém prostředí za katalýzy dochází k chemiluminiscenci. Luminiscence je charakteristická světle modrým zabarvením emitovaného světla o vlnové délce 425 nm [9,10]. Katalýza této oxidačně-redukční reakce je zde zajištěna právě krevním barvivem hemoglobinem. Bazické prostředí, nutné pro správný průběh reakce, je možno zajistit úpravou pH vhodným pufrům. Vhodné pH je v rozmezí 9-10. Výběr a použití pufru však závisí na celé řadě faktorů. Především nesmí žádná ze složek pufru nijak interagovat se vzorkem nebo jeho částmi. Za uvedených podmínek umožňuje luminol velmi spolehlivou detekci krevní stopy, jeho detekční limit je v řádech nanogramů krve deponované na povrchu [10,11].



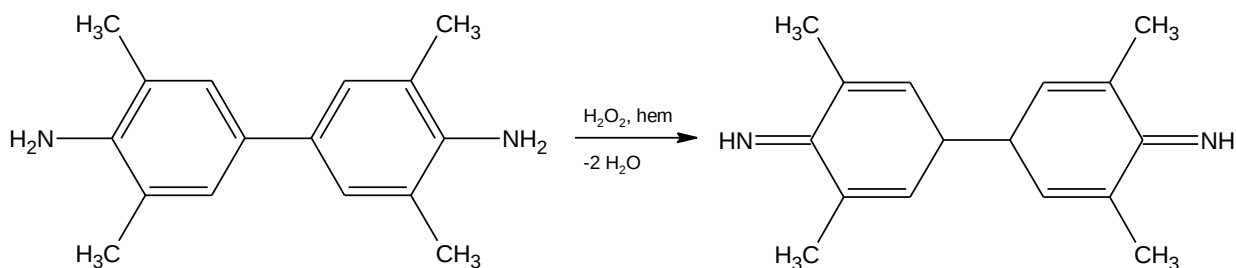
Obr. 2 – Oxidace luminolu v bazickém prostředí peroxidem vodíku [10]

Orientační zkouška za pomoci luminolu má však svá omezení. Kromě hemoglobinu mohou uvedenou reakci katalyzovat také ionty některých přechodných kovů, především Cu^{2+} , Co^{2+} ,

Fe^{3+} nebo některá oxidační činidla, zejména pak chlornanové anionty ClO^- , které jsou často přítomny v desinfekčních prostředcích [10].

3.1.2 Průkaz krve pomocí benzidinové zkoušky

Jako benzidiny jsou označovány 4,4'-diaminoderiváty bifenyly. Tyto látky patří mezi redoxní indikátory, a jsou v redukovaném stavu bezbarvé. Deriváty benzidinu se peroxidem vodíku oxidují na oxidační produkty modré barvy, tzv. benzidinovou modř. Reakce je katalyzována buďto enzymaticky pomocí peroxidas (POD) nebo látkami, které ve své molekule obsahují porfyrin hem s centrálním atomem železa, tedy např. krevní barvivo hemoglobin. Pro účely kvalitativní orientační analýzy se častěji používá 3,3',5,5'-tertramethylbenzidin (TMB) v prostředí kyseliny octové nebo kyselého pufru [12,14]. TMB na rozdíl od silně kancerogenního benzidinu není nebezpečný [13]. Schéma reakce probíhající při oxidaci TMB peroxidem vodíku ze katalýzy hemem je uvedena na obr. 3.



Obr.3 – Oxidace TMB peroxidem vodíku za vzniku benzidinové modři [14]

3.2 Instrumentální metody v analýze krve pro forenzní účely

Existuje značné množství instrumentálních metod, které jsou více či méně vhodné pro analýzu krevních vzorků pro forenzní nebo toxikologické účely. Obvyklým postupem bývá především zúžit okruh hledaných látek, např. za pomoci imunochemických a enzymatických technik, tenkovrstevné chromatografie (TLC) a standardů prokazovaných látek. Teprve poté se přistupuje k přesnějším instrumentálním technikám, které jednoznačně identifikují nebo kvantifikují danou látku. Mezi sofistikované instrumentální techniky využívané pro forenzní analýzu biologických materiálů patří zejména separační metody a spektrální metody. Tyto

metody však téměř vždy vyžadují úpravu vzorku jako například extrakci, čištění či prekoncentraci [15,16].

Imunochemické metody jsou založeny na specifické imunologické reakci antigenu (resp. analytu) s přítomnou protilátkou. Podmínkou je existence specifické protilátky, která je citlivá na přítomnost analytu ve vzorku. Tyto metody pracují na principu kompetice mezi analytem a značeným analytem (nejčastěji radioaktivně, fluorescenčně, enzymaticky atd.) o přítomnou protilátku. Detekce analytu je poté založena na jeho schopnosti vytěsnit značený analyt z vazby na protilátku. Jedná se o technicky nenáročné metody, které jsou však často nedostatečně specifické, a proto je nutné potvrdit pozitivní výsledek jinou objektivní analytickou metodou [3,17].

Separační metody jsou důležité, neboť v analyzovaných vzorcích jsou často přítomny kromě analytu i další látky, které tvoří matici vzorku. Separace slouží k oddělení hledané látky (analytu) od ostatních (matrice, interferenty). Mezi nejčastěji užívané separační metody patří chromatografické metody založené na kontaktu dvou navzájem nemísitelných fází (mobilní a stacionární) mezi které se analyt rozděluje na základě různé afinity k nim. Podle použité mobilní fáze se dělí na plynovou chromatografii (GC) a kapalinovou chromatografii (LC, resp. HPLC). Pokud je jako mobilní fáze použita kapalina při nadkritické teplotě a tlaku, jedná se o tzv. superkritickou fluidní chromatografii (SFC) [3,20]. Další možnosti separace látek nabízí kapilární elektromigrační metody, které využívají odlišnou pohyblivost látek ve stejnosměrném elektrickém poli. V praxi se nejčastěji setkáme s metodami založenými na principu kapilární zónové elektroforézy (CE) nebo izotachoforézy (ITP). Podstatnou výhodou těchto metod je nižší množství vzorku potřebné k separaci, které se pohybuje v řádu nanolitřů [18,19]. Separační metody slouží pouze k dělení analytů mezi sebou a také k jejich oddělení od matrice vzorku. Po vlastní separaci musí následovat detekce separovaných analytů, jejich identifikace a následně i kvantifikace. Samotná identifikace látek bývá obvykle prováděna spojením separačních metod s jinými analytickými metodami, zejména spektrálními (nejčastěji UV/VIS detekce nebo MS). Především spojení s hmotnostní spektrometrií umožňuje nejen separaci látek v matici, ale rovněž jejich jednoznačnou identifikaci. Nejčastějším případem tandemové instrumentální analýzy, hojně využívané

ve forenzní analýze, je spojení plynové či kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS, resp. LC/MS) [2,3,18-20].

Hmotnostní spektrometrie (MS) je z principu separační metoda, bývá však řazena mezi metody spektrální. Molekuly zkoumané látky jsou ionizovány, což podle typu ionizace může vést až k fragmentaci molekuly. Vzniklé ionty nebo fragmenty molekul, lišící se poměrem hmotnosti ku náboji (m/z), jsou následně urychleny a přivedeny na separátor (magnetický, kvadrupólový, průletový analyzátor, iontová past, iontová cyklotronová rezonance), kde jsou rozděleny do svazků podle jednotlivých m/z . Následně dopadají na detektor (např. iontový násobič) kde dojde k jejich kvantifikaci. Tyto procesy probíhají ve vysokém vakuu aby nedocházelo k vzájemným rekombinacím vzniklých fragmentů [21].

Infračervená spektroskopie (IR) je metoda založená na absorpci elektromagnetického záření o vlnočtech v rozsahu $14\,000 - 20\text{ cm}^{-1}$ molekulami vzorku [22]. Absorpce IR záření vede ke změnám vibračních a rotačních stavů v molekulách. Metoda je vhodná pro analýzu a potvrzení identifikace čistých látek, případně k důkazu charakteristických funkčních skupin v molekulách.

Ostatní spektrální metody založené na absorpci záření (UV/VIS, AAS atd.) nebo emisi záření (fluorimetrie, luminometrie, AFS, AES atd.) se používají zřídka. Spektrofotometrii ve viditelné oblasti (UV/VIS) je možné použít ke stanovení koncentrace rozpuštěných látek v roztocích a to buď přímo (pokud absorbují dané záření) nebo např. po převedení na komplex či derivát, který tyto vlastnosti má.

3.3 Vybrané biologicky aktivní látky

3.3.1 Stimulanty

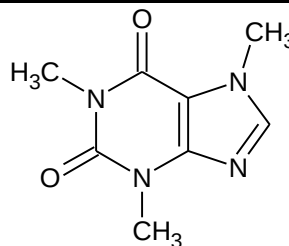
Kofein

Kofein je alkaloid, působící jako centrální stimulant. Vyskytuje se přirozeně v několika rostlinách, zejména v kávě (*Coffea arabica*) a čaji (*Camellia sinensis*), často je však vyráběn synteticky a přidáván do různých nápojů či stimulačních prostředků. Chemicky se jedná o xanthinový (purinový) alkaloid (1,3,7-trimethylxanthin). Přehled fyzikálně-chemických vlastností je uveden v tabulce II. Z forenzního hlediska není kofein významnou látkou pro jeho stimulační účinky avšak proto, že je často přidáván k jiným drogám, aby zdánlivě zvýšil jejich množství [24]. Pro průkaz a stanovení kofeinu ve vzorcích drog i biologických tekutinách existuje řada metod, v praxi často používanými jsou separační metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií [25].

Tabulka II. – Fyzikálně-chemické vlastnosti kofeinu [8]

Kofein

Strukturní vzorec



Systematický název (IUPAC):	1,3,7-trimethyl-1 <i>H</i> -purin- 2,6(3 <i>H</i> ,7 <i>H</i>)-dion
Sumární vzorec	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost (M _r)	194,2
Disociační konstanta (pK _a)	14,0 (20 °C)

Nikotin

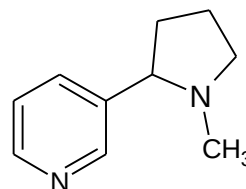
Mezi centrálně působící stimulanty patří také nikotin. Jedná se o vysoce toxický pyridinový alkaloid vyskytující se v několika rostlinách čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), především pak v tabáku (*Nicotiana*). Nikotin je silně návyková látka, která je často aplikována zejména kouřením tabákových výrobků, což vede k mnoha zdravotním

problémům [26]. I když se jedná o toxickou látku, pro forenzní účely není látka příliš významná. Otravy nikotinem jsou spíše vyjímečné, lze se s nimi však setkat [27,28]. Daleko důležitější význam může mít přítomnost nikotinu v těle např. při vyšetřování, kdy může mít rozhodující vliv zdali pachatel je či není kuřák. Přehled fyzikálně-chemických vlastností nikotinu je uveden v tabulce III.

Tabulka III. – Fyzikálně-chemické vlastnosti nikotinu [8]

Nikotin

Strukturní vzorec



Systematický název (IUPAC):	3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin
Sumární vzorec	C ₁₀ H ₁₄ N ₂
Relativní molekulová hmotnost (M _r)	162,2
Disociační konstanta (pK _a)	3,2 ; 7,9 (20 °C)

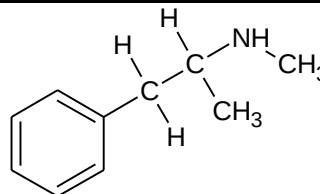
Metamfetamin

V České republice jde o jednu z nejčastěji zneužívaných drog, známější pod názvem pervitin. Stejně jako jiné strukturně příbuzné látky patří do skupiny amfetaminů, které jsou ve velké míře zneužívány jako stimulační drogy. Na černý trh se nejčastěji dostává ilegální syntézou z jeho prekurzorů, především efedrinu a pseudoefedrinu [29]. Působí jako agonista neurotransmiterů dopaminu, noradrenalinu či serotoninu, což vede ke stimulaci a zvýšené výkonnosti [3]. Analýza metamfetaminu je důležitá jak z hlediska toxikologického tak z hlediska forezního. V biologických tekutinách je možná analýza (vč. metabolitů) za použití běžných metod GC-MS či LC ve spojení s UV detektorem nebo s hmotnostní spektrometrií [29-31]. Metamfetamin je navíc chirální látka, u které rozlišujeme dva enantiomery (*R*-, *S*-), jejichž vzájemný poměr či nepřítomnost jednoho z nich může vést k úvahám o metodě jejich ilegální syntézy či o použitém prekurzoru. Enantioselektivní separaci je možné provést LC s chirální stacionární fází (např. s cyklodextriny). Další možnost představuje CE s použitím chirálního selektoru v pracovním elektrolytu [29,32]. Přehled fyzikálně chemických vlastností metamfetaminu je uveden v tabulce IV.

Tabulka IV. – Fyzikálně-chemické vlastnosti metamfetaminu [8]

Metamfetamin

Strukturní vzorec



Systematický název (IUPAC):	<i>N</i> -methyl-1-fenylpropan-2-amin
Sumární vzorec	C ₁₀ H ₁₅ N
Relativní molekulová hmotnost (M _r)	149,23
Disociační konstanta (pK _a)	10,1 (20 °C)

3.3.2 Sedativa a hypnotika

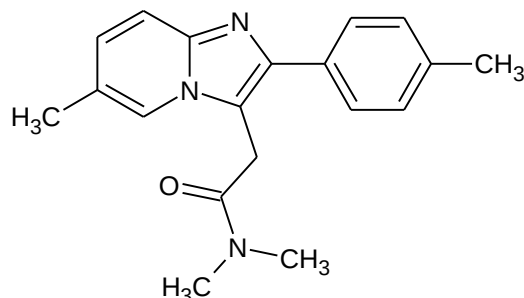
Zolpidem

Zolpidem patří do skupiny látek majících selektivní agonistické účinky na receptory γ -aminomáselné kyseliny (GABA receptory), jedná se o tzv. nebenzodiazepinové hypnotikum. V přiměřených dávkách má tlumivé účinky na centrální nervovou soustavu [33]. Jedná se o často užívané hypnotikum určené k léčbě insomnie [34]. Z forenzního hlediska je látka důležitá například při šetření případů obětí násilné trestné činnosti (znásilnění, krádeže, podvody apod.), kterým byly pachatelem podány látky snižující schopnost jejich vnímání či jednání [35]. Screeningové metody i stanovení zolpidemu v krevním séru či moči mohou být založeny na kapalinové chromatografii s UV detektorem, fluorescenčním detektorem, hmotnostním spektrometrem nebo na plynové chromatografii či kapilární elektroforéze [36-38]. Přehled fyzikálně chemických vlastností zolpidemu je uveden v tabulce V.

Tabulka V. – Fyzikálně-chemické vlastnosti zolpidemu [8]

Zolpidem

Strukturní vzorec



Systematický název (IUPAC):	<i>N,N</i> ,6-Trimethyl-2-(4-methylfenyl)-imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridin-3-acetamid
Sumární vzorec	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O
Relativní molekulová hmotnost (M _r)	307,4
Disociační konstanta (pK _a)	6,2 (20 °C)

3.3.3 Analgetika

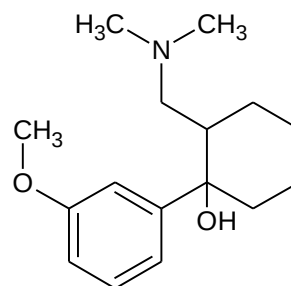
Tramadol

Je to centrálně působící syntetické opioidové analgetikum používané k terapii středně silných až silných bolestí. Tramadol je neselektivní agonista μ -, δ - a κ -opioidových receptorů [39]. Analýza tramadolu je v případě forenzní chemie a toxikologie nejčastěji prováděna kapalinovou či plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí [27,40-42]. Přehled fyzikálně chemických vlastností tramadolu je uveden v tabulce VI.

Tabulka VI. – Fyzikálně-chemické vlastnosti tramadolu [8]

Tramadol

Strukturní vzorec



Systematický název (IUPAC):

2-[(dimethylamino)methyl]-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol

Sumární vzorec

$C_{16}H_{25}NO_2$

Relativní molekulová hmotnost (M_r)

263,4

Disociační konstanta (pK_a)

8,3; 9,41 (20 °C)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Veškerá měření byla provedena na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí (LCQ, Thermo Finnigan, San Jose, USA), kde jako iontový zdroj sloužila modifikovaná sprejovací část nano-elektrospreje se sprejovací kapilárou pokrytou kovem (PicoTip emitter GlassTip, ID = 2 ± 1 μm ; New Objectiv, Woburn, USA) [43]. Kapilára byla před každým měřením naplněna sprejovací kapalinou a poté na ni bylo vloženo sprejovací napětí v rozsahu +1,5 až +3,5 kV. Jako desorpční povrch bylo zvoleno mikroskopické sklíčko se zdrsňeným povrchem (Sigma-Aldrich, Praha) a filtry ze skleněných mikrovláken (typ Z7, stř. velikost pórů 2,5 μm , Merci, Praha). Snímky filtrů ze skelných mikrovláken byly získány pomocí transmisní elektronové mikroskopie ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR.

Jako modelové analyty byly použity kofein, metamfetamin (Sigma Aldrich, Praha), nikotin (Merck, Praha), tramadol a zolpidem (poskytnuty Ústavem soudního lékařství LF UP v Olomouci). Pro přípravu detekčních činidel byly použity luminol, TMB, peroxoboritan sodný (Merck, Praha), uhličitán sodný a peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, Praha). Deionizovaná voda byla připravena deionizační stanicí MilliQ UV (Millipore, MA, USA). Na přípravu sprejovací kapaliny byly použity methanol (Merck, Praha), acetonitril a kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Praha). Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty.

4.2 Orientační zkoušky a jejich provedení

a) Luminol – příprava činidla

Ke 100 mg luminolu v 50 ml kádince bylo přidáno 9 ml deionizované vody. K vzniklé suspenzi bylo přidáno 0,5 g bezvodého uhličitánu sodného (Na_2CO_3) a vše bylo důkladně rozpuštěno. Do mikrozkuhavky bylo odváženo 0,5 g peroxoboritanu sodného ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a doplněno objemem 1 ml deionizované vody a důkladně ropzuštěno pomocí ultrazvukové lázně. Před použitím činidla k analýze byly oba roztoky smíchány a činidlo bylo přidáno buď do roztoku, o kterém se předpokládalo, že obsahuje krev, nebo se rozprašovalo na krví znečištěný povrch (oděv, papír atd.). Pozitivní zkouška se projevila modrou viditelnou modrou luminiscencí, pozorovatelnou ve tmě.

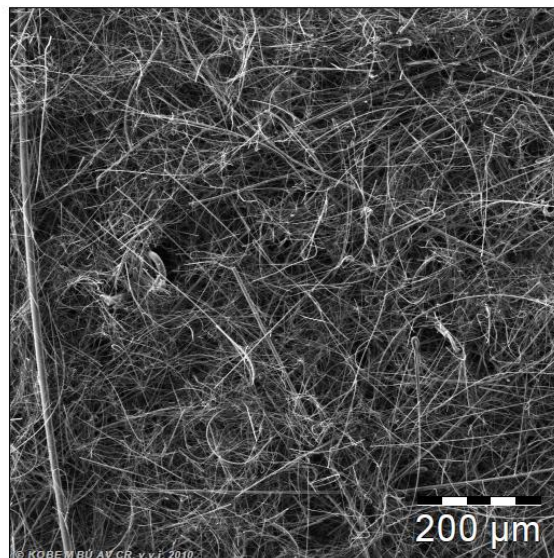
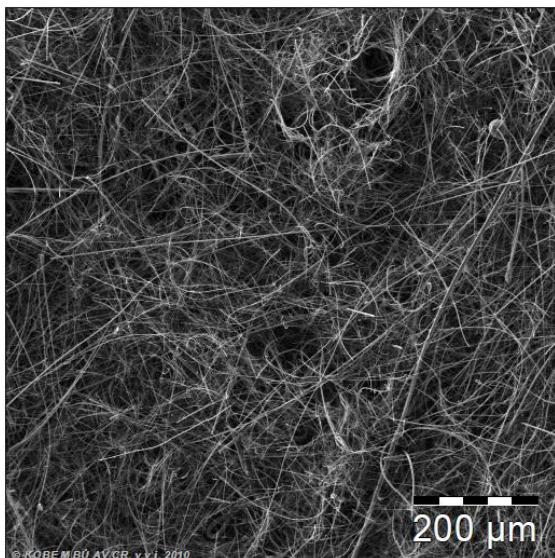
b) TMB – příprava činidla

Na lodičce bylo odváženo 5 mg TMB a rozpuštěno v 5 ml dimethylsulfoxidu. Jako základní roztok bylo připraveno 50 ml roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,1 mol/l. Před analýzou bylo smícháno 1 ml roztoku TMB s 9 ml základního roztoku kyseliny octové a k připravené směsi bylo přidáno 5 μ l 30% peroxidu vodíku. Vzniklé činidlo bylo použito obdobně jako v případě luminolu, pozitivní zkouška se projevila jasně modrým zabarvením v průběhu asi 1 minuty.

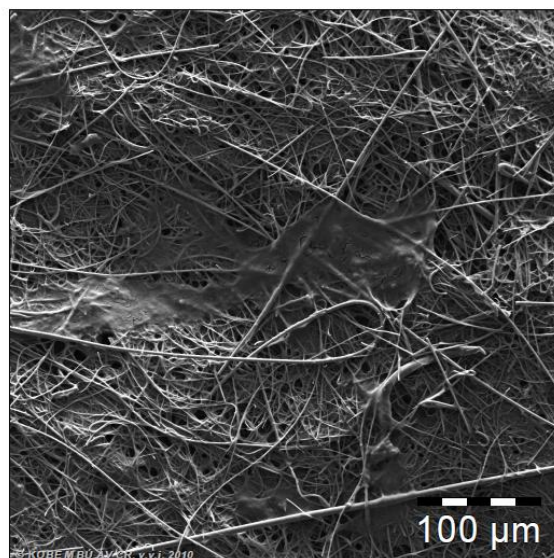
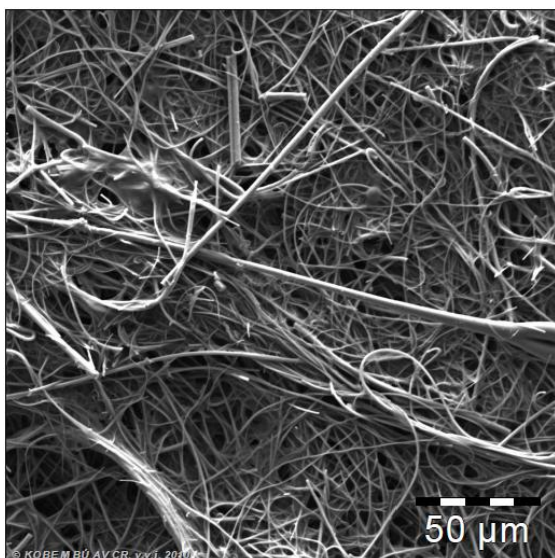
4.3 Příprava standardů a vzorků k analýze

Odvážená množství uvedených modelových analytů byla rozpuštěna v příslušném množství methanolu, aby koncentrace standardních roztoků analytů byla 1 mg/ml. Plná lidská krev byla bez jakékoli úpravy použita jako vzorek k analýze. Do mikrozkušavky bylo odpipetováno vždy 100 μ l standardu o koncentraci 1 mg/ml a při laboratorní teplotě bylo rozpouštědlo odpařeno. Poté byl do mikrozkušavky odpipetováno 1 ml krve, aby výsledná koncentrace látek v krvi byla 100 mg/l. K ověření postupů a vyvinuté metody analýzy byly použity reálné vzorky krve od pacientů po intoxikaci, obsahující studované analyty. Tyto vzorky byly poskytnuty Ústavem soudního lékařství LF UP v Olomouci.

Biologické vzorky, zejména krev bez jakékoli úpravy, obsahují velké množství interferujících látek nízkomolekulárního (transportované látky, vitamíny, hormony, ionty atd.) i vysokomolekulárního charakteru (proteiny). Z tohoto důvodu je důležité zvýšit účinnost ionizace hledaných látek a minimalizovat či snížit vliv matrice. S úspěchem bylo využito filtrů ze skelných mikrovláken (FSM), které se ukázaly jako velice efektivní pro zvýšení intenzity signálu a jeho stability v nanoDESI-MS měřeních [44]. Filtry jsou vyrobeny ze speciálních vláken s velmi malými póry, které dosahují střední velikosti okolo 2,5 μ m. Vláknitá struktura filtrů byla potvrzena snímky z transmísí elektronové mikroskopie (TEM, obr. 4 a 5). K porovnání účinnosti obou povrchů na zvýšení stability a intenzity signálu byly vybrány dvě sprejovací kapaliny, sestávající ze směsi voda/methanol/kyselina mravenčí (50 : 49,5 : 0,5; v/v) a ze směsi acetonitril/voda/kyselina mravenčí (90 : 9,5 : 0,5; v/v).



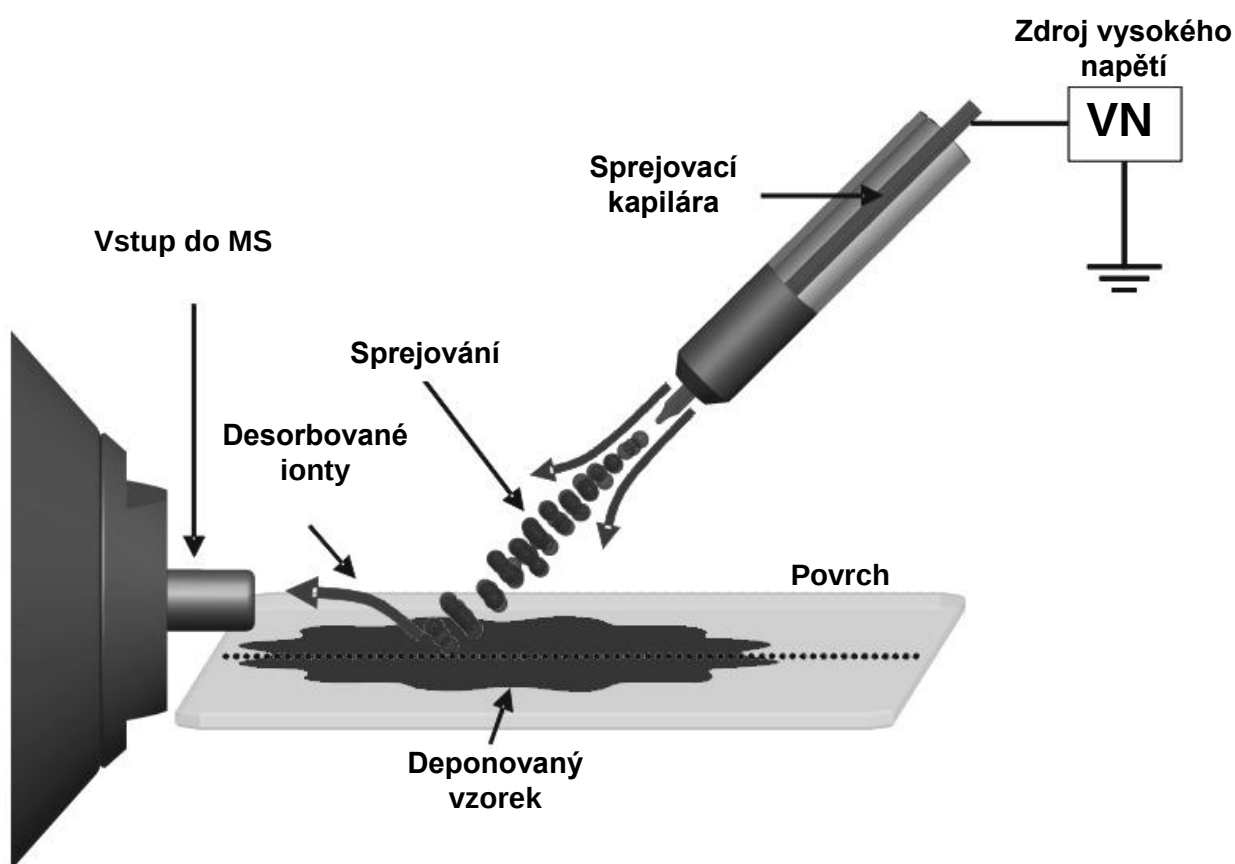
Obr. 4 – snímky filtrů ze skelných mikrovláken pořízené pomocí TEM



Obr. 5 – snímky filtrů ze skelných mikrovláken s nanesenou krví pořízené pomocí TEM

4.4 Analýza hmotnostní spektrometrií (nanoDESI-MS)

Desorpční nano-elektrosprejová ionizace patří mezi ionizační metody pracující na principu desorpce a ionizace analytů za atmosférického tlaku. Sprejovací médium je aplikováno nano-elektrosprejem na zkoumaný povrch kde dochází k desorpci iontů analytu vlivem interakcí s ionty média vzniklých v nano-elektrospreji. Takto vznikají protonizované ionty analytu, které následně vstupují do hmotnostního analyzátoru. Zjednodušené schéma nanoDESI-MS je popsáno na obrázku č. 6. Samotný mechanismus desorpce pomocí nanoDESI-MS je stále předmětem zkoumání [43,45].



Obr. 6 - Schéma nanoDESI-MS. Převzato a upraveno z [45]

Studované modelové analyty byly předem změřeny bez přítomnosti matrice a byla získána hmotnostní (MS) a fragmentační (MS/MS) spektra, která sloužila k identifikaci zkoumaných látek v krevní stopě. Poté byly postupně naneseny na vzorkovací povrchy samotná krev a krev obsahující modelové látky. Jednotlivé parametry nastavení iontového zdroje a hmotnostního spektrometru, včetně kolizních energií a významných fragmentů iontů, jsou uvedeny u každé analyzované látky.

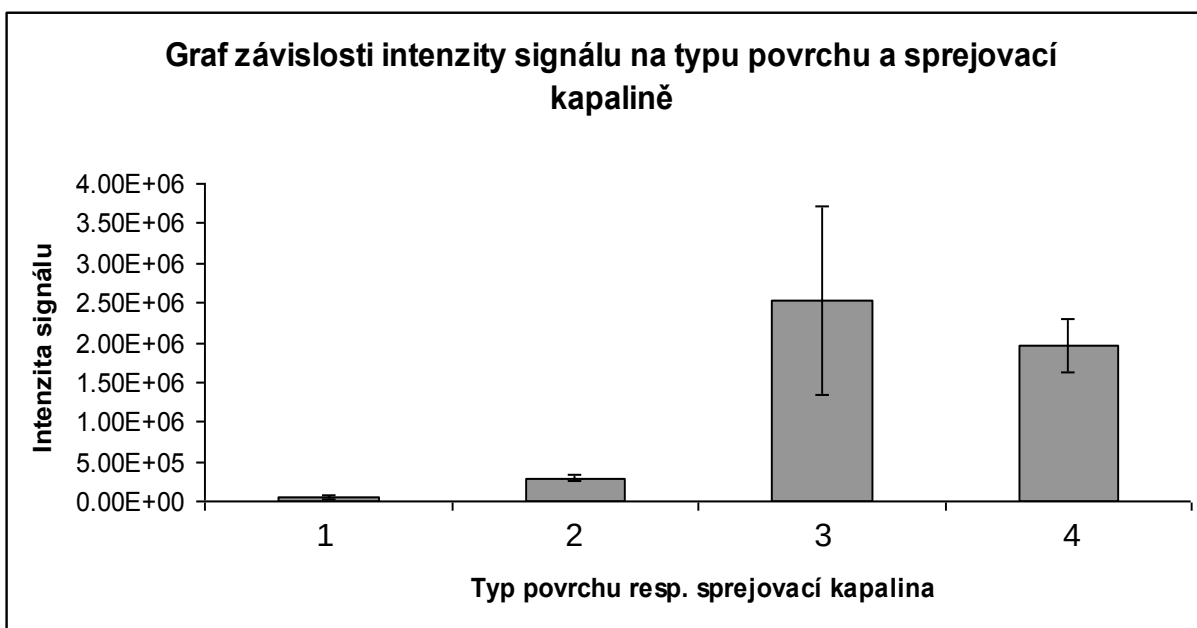
5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Volba podmínek analýzy

Z experimentálních výsledků, které shrnuje tabulka VII., bylo patrné, že vyšší intenzitu signálu poskytovala směs acetonitrilu a vody (ACN/voda), která byla oproti směsi methanolu a vody (MeOH/voda) až o dva řády vyšší (obr. 7). Testování intenzity bylo provedeno na sérii šesti měřeních, každé o délce 30 sekund. Intenzita signálu byla sledována pomocí standardu nikotinu o koncentraci 0,1 mg/ml, jako absolutní intenzita základního píku m/z 163.

Tabulka VII. –Výsledky měření intenzity signálu jednotlivých sprejovacích kapalin a povrchů

Typ povrchu a spej. kapalina	Intenzita signálu iontu m/z 163 v jednotlivých měřeních						Průměrná intenzita	Směrodatná odchylka	% RSD
	1	2	3	4	5	6			
Sklo, MeOH:voda	$8,26 \times 10^4$	$5,17 \times 10^4$	$5,41 \times 10^4$	$4,98 \times 10^4$	$4,09 \times 10^4$	$2,68 \times 10^4$	$5,10 \times 10^4$	18426,9	36,14 %
Filtr, MeOH:voda	$3,45 \times 10^5$	$2,42 \times 10^5$	$3,11 \times 10^5$	$2,88 \times 10^5$	$2,82 \times 10^5$	$3,01 \times 10^5$	$2,95 \times 10^5$	34114,0	11,57 %
Sklo, ACN:voda	$4,56 \times 10^6$	$3,31 \times 10^6$	$2,38 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$	$1,76 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$	$2,53 \times 10^6$	1193707,1	47,15 %
Filtr, ACN:voda	$1,33 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$2,21 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	$2,09 \times 10^6$	$2,16 \times 10^6$	$1,96 \times 10^6$	328856,6	16,75 %



Obr. 7 – Závislost intenzity signálu na typu povrchu a sprejovací kapalině

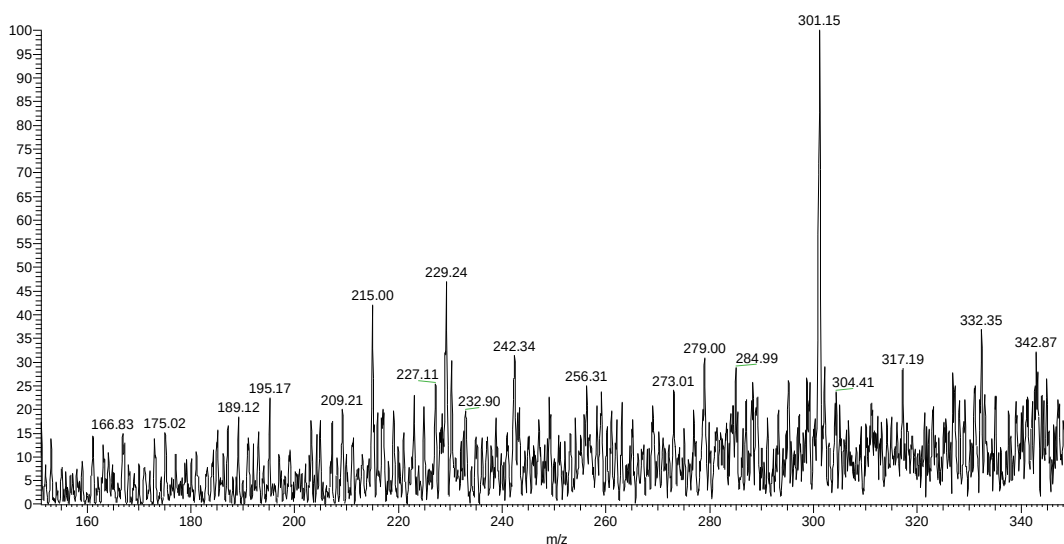
(1 – MeOH/voda, sklo; 2 – MeOH/voda, FSM; 3 – ACN/voda, sklo; 4 – ACN/voda, FSM)

Jak je vidět z výsledků v tabulce VII. a ze srovnání na obr. 7, nejvyšší průměrné intenzity signálu sledovaného iontu bylo dosaženo při použití zdrsňeného skla a sprejovací kapaliny na bázi ACN/voda. Avšak vzhledem ke kolísání signálu a vysoké relativní směrodatné odchylce (RSD) v sérii měření (47,15 %) nebyl tento povrch zvolen jako nejvhodnější pro další analýzy. Povrch z filtrů ze skelných mikrovláken vykazoval sice nepatrně nižší průměrnou intenzitu signálu (přibližně o 22 % oproti zdrsňenému sklu), zároveň však s výrazně vyšší opakovatelností. Jako vhodné modelové povrchy pro další analýzy pomocí nanoDESI-MS byly po vyhodnocení experimentálních dat zvoleny filtry ze skelných mikrovláken, se sprejovací kapalinou tvořenou směsí ACN/voda.

5.2 Analýza vzorků

Referenční biologická matrice

Aby byla doložena správnost výsledků analytické metody, musí být ověřen i vliv samotné matrice vzorku. Je nutné zejména doložit absenci hledaného signálu za pomoci referenční biologické matrice. Biologický vzorek bez obsahu hledaných látek je nutné podrobit stejnému postupu analýzy jako vzorek. Plná lidská krev bez obsahu studovaných analytů byla nanášena na zkoumaný povrch (FSM) a analyzována stejným postupem a metodou, které byly využity v analýze ostatních vzorků, včetně reálných. Získaná spektra krve neobsahovala signál žádného ze zkoumaných analytů (obr. 8), což bylo potvrzeno i MS/MS fragmentačními spektry.



Obr. 8 – MS spektrum plné krve bez obsahu studovaných analytů (povrch FSM)

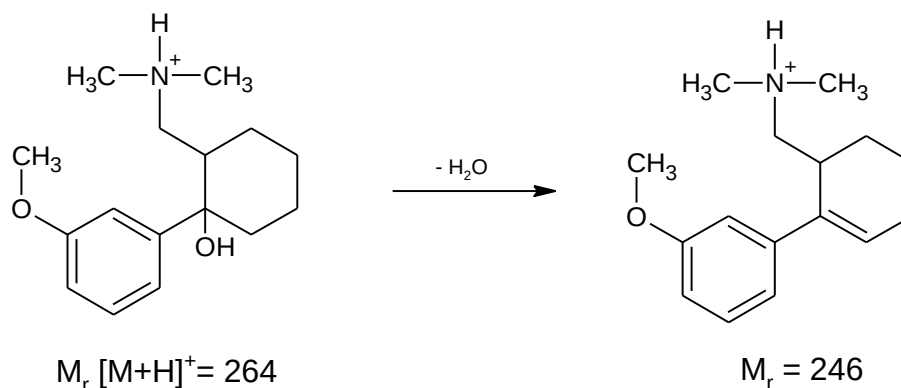
Případová studie I. – analýza tramadolu v krvi

Vyvinutá metoda nanoDESI-MS analýzy byla aplikována na analýzu reálných vzorků obsahujících studované analyty. Jako reálný vzorek byla analyzována plná krev pacienta, která obsahovala tramadol. Na obrázku č. 9 a 10 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum standardu tarmadolu deponovaného na filtru ze skelných mikrovláken. V tabulce VIII. jsou uvedeny další parametry analýzy.

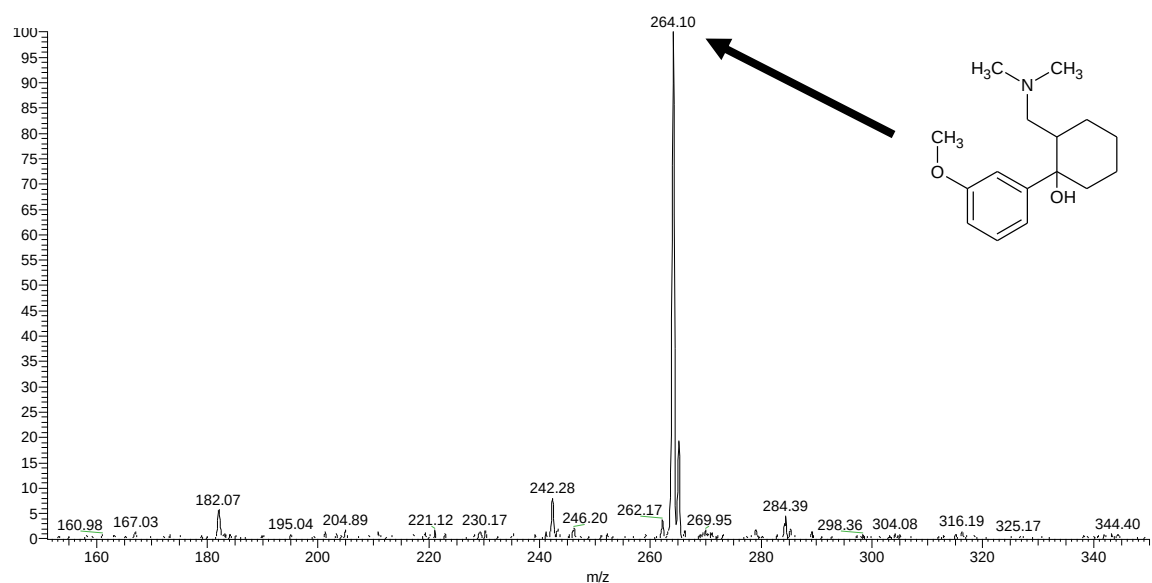
Tabulka VIII. – analyzované vzorky obsahující tramadol

Vzorek	Koncentrace analytu	Sprejovací kapalina	m/z $[M+H]^+$	Sprejovací napětí U [kV]	Kolizní energie [%]
a) Standard	1 mg/ml	ACN/voda	264	+ 2,5	28
b) Krev	-	ACN/voda	264	+ 2,5	30

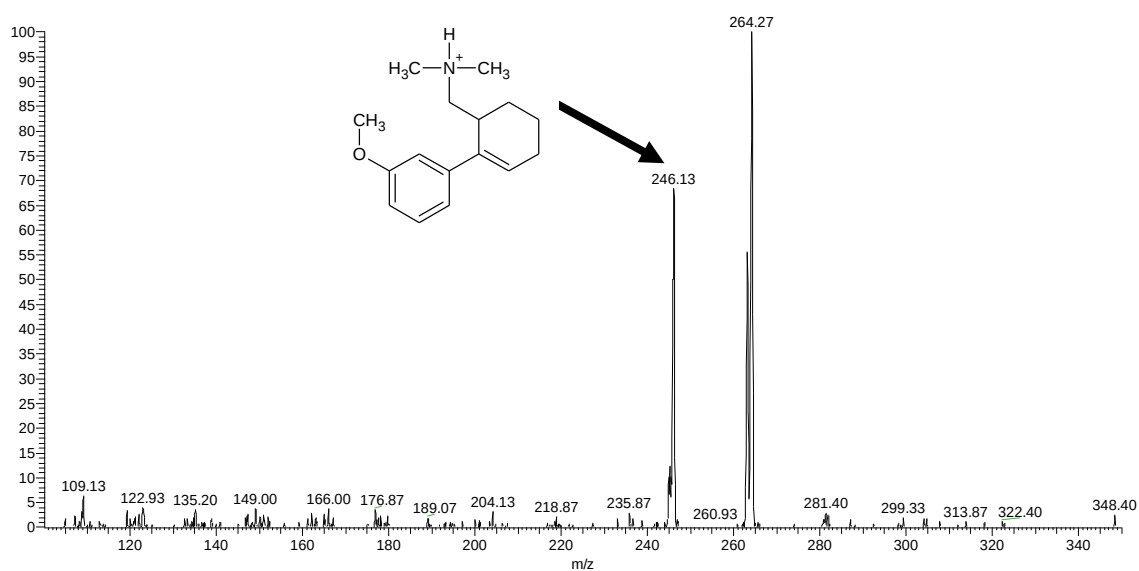
Významné fragmentační ionty:



a) analýza standardu tramadolu

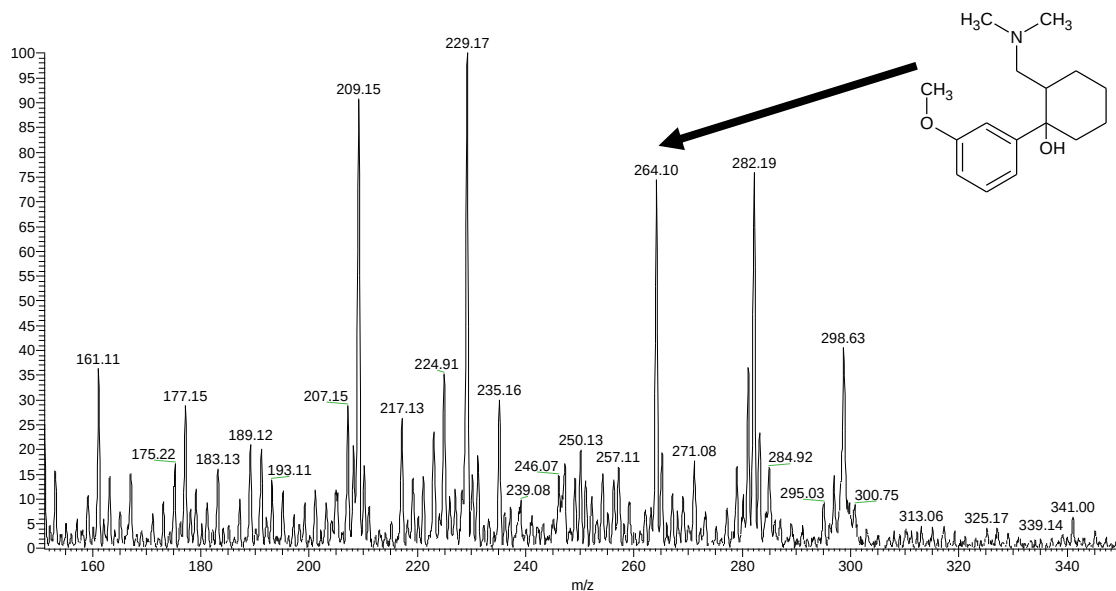


Obr. 9 – nanoDESI-MS spektrum standardu tramadolu (1 mg/ml, povrch FSM)

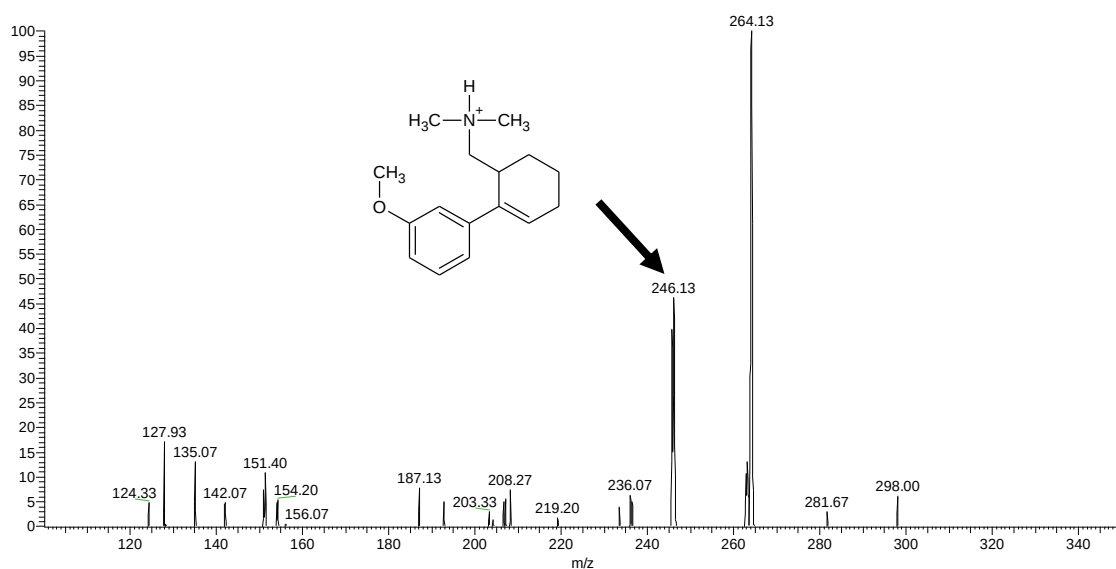


Obr. 10 – nanoDESI-MS/MS spektrum standardu tramadolu (1 mg/ml, povrch FSM)

b) analýza krevní stopy obsahující tramadol deponované na FSM



Obr. 11 – nanoDESI-MS spektrum plné krve obsahující tramadol



Obr. 12 – nanoDESI-MS/MS spektrum iontu tramadolu v krvi s významným fragmentem na m/z 246

Na obrázku č. 11 a 12 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum plné krve obsahující tarmadol deponované na filtru ze skelných mikrovláken. Přítomnost tramadolu byla potvrzena shodou fragmentačních MS/MS spekter, získaných analýzou krve, s fragmentačními MS/MS spektry standardu.

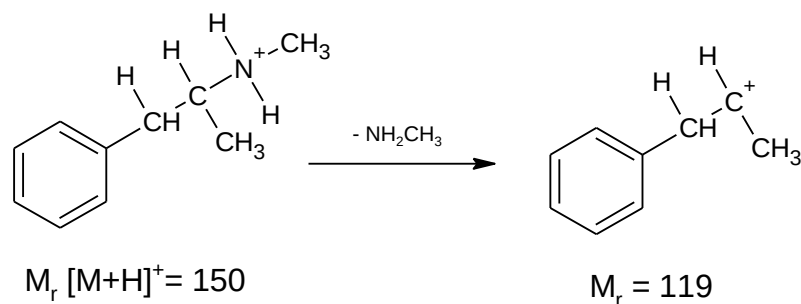
Případová studie II. – analýza metamfetaminu v krvi

Stejně jako v předešlém případě byla provedena analýza plné krev pacienta obsahující metamfetamin. Na obrázku č. 13 a 14 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum standardu metamfetaminu deponovaného na filtru ze skelných mikrovláken. V tabulce IX. jsou uvedeny další parametry analýzy

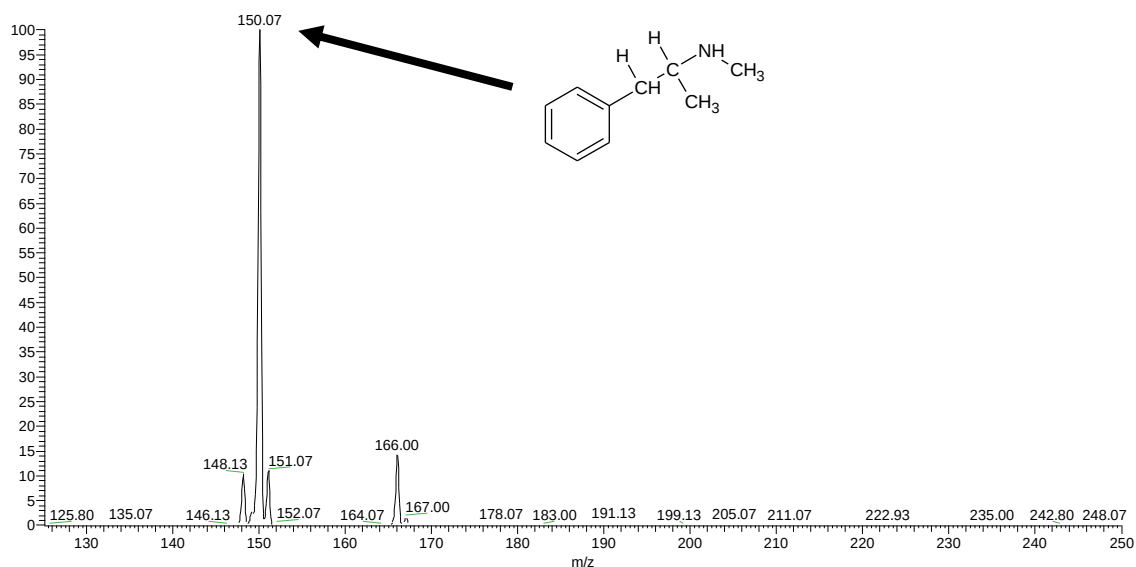
Tabulka IX. – analyzované vzorky obsahující metamfetamin

Vzorek	Koncentrace analytu	Sprejovací kapalina	m/z $[M+H]^+$	Sprejovací napětí U [kV]	Kolizní energie [%]
a) Standard	1 mg/ml	ACN/voda	150	+ 2,5	25
b) Krev	-	ACN/voda	150	+ 2,5	25

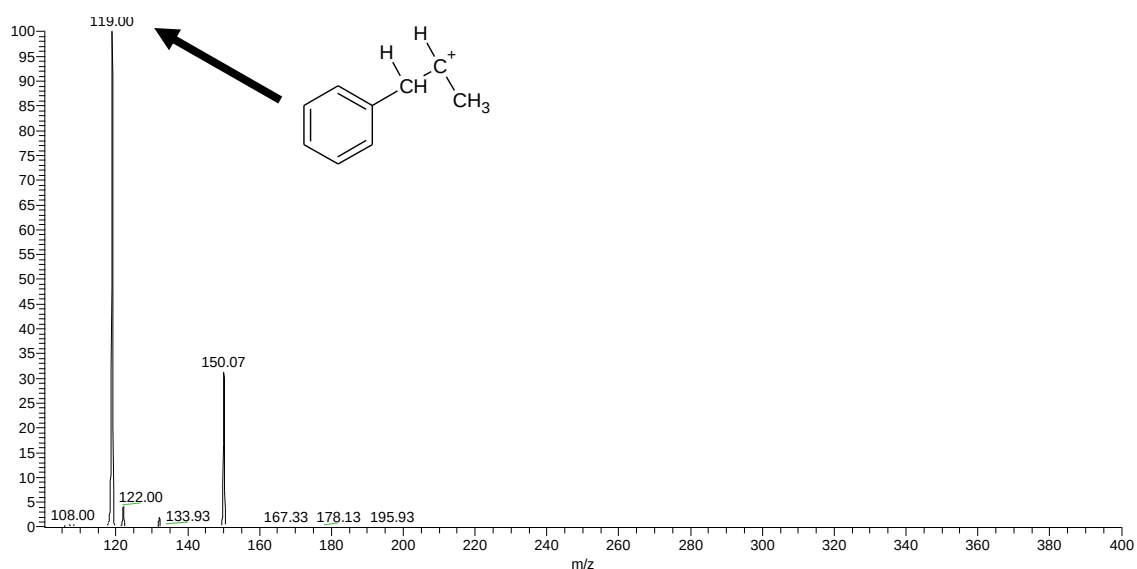
Významné fragmentační ionty [47]:



a) analýza standardu metamfetaminu

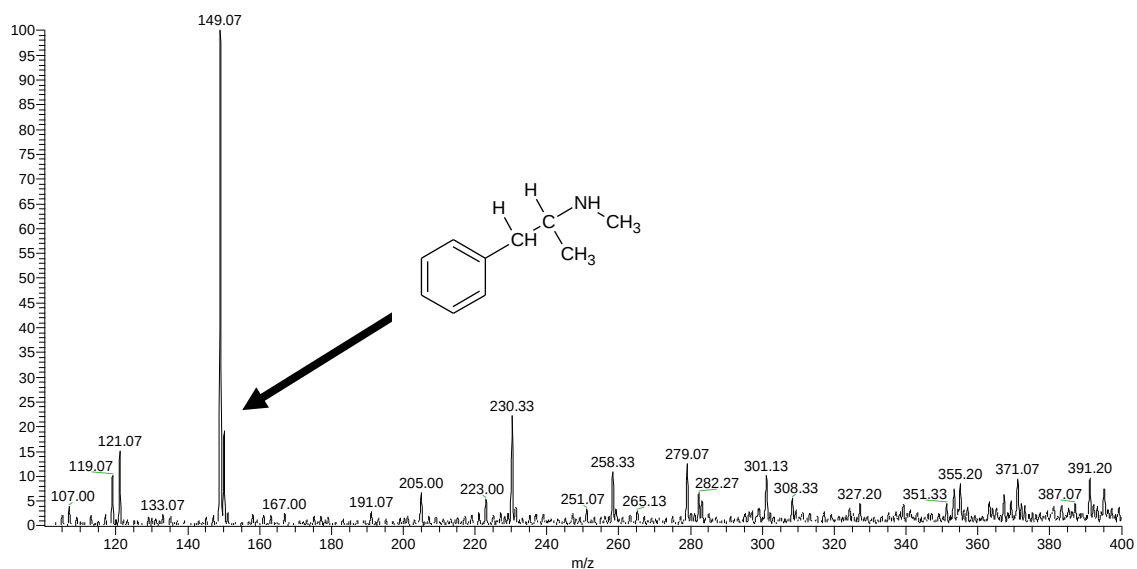


Obr. 13 – nanoDESI-MS spektrum standardu metamfetaminu (1 mg/ml, povrch FSM)

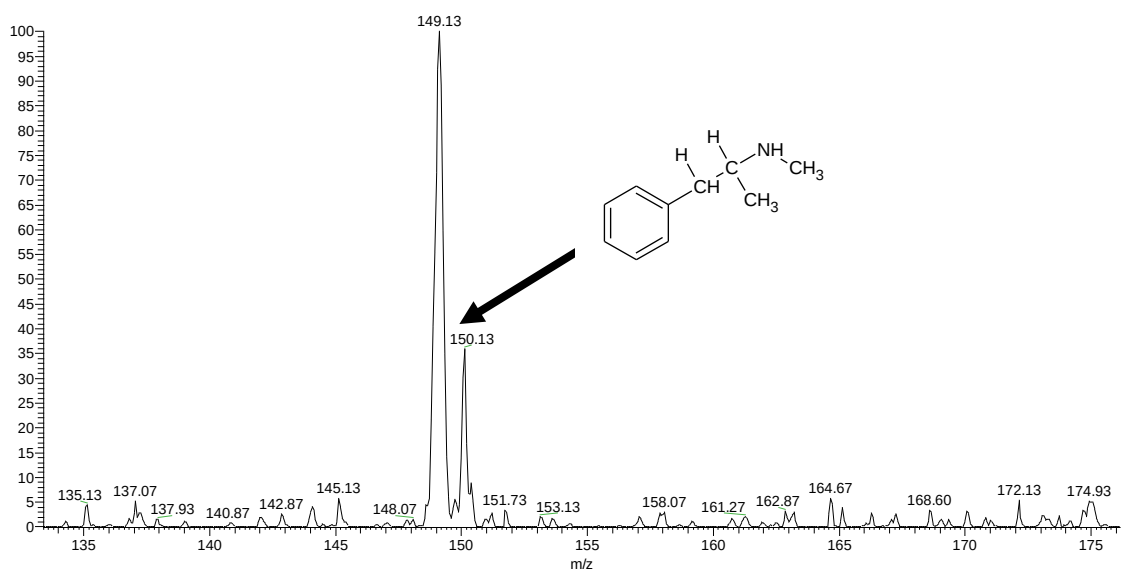


Obr. 14 – nanoDESI-MS/MS spektrum standardu metamfetaminu (1 mg/ml, povrch FSM)

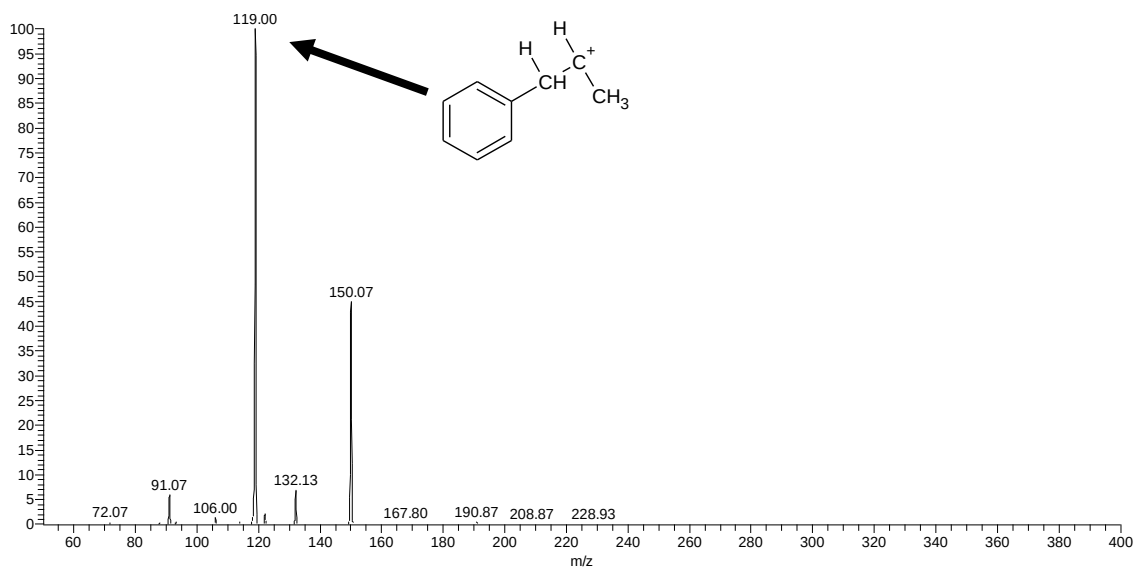
b) analýza krevní stopy obsahující metamfetamin deponované na FSM



Obr. 15 – nanoDESI-MS spektrum plné krve obsahující metamfetamin



Obr. 16 – zvětšená část spektra z obr. 14 – patrný iont metamfetaminu na m/z 150



Obr. 17 – nanoDESI-MS/MS spektrum iontu metamfetaminu v krvi s významným fragmentem na m/z 119

Na obrázku č. 15, 16 a 17 jsou uvedena MS spektra a fragmentační MS/MS spektrum plné krve obsahující metamfetamin deponované na filtru ze skelných mikrovláken. Pro překryv iontem na m/z 149 není iont metamfetaminu patrný. Vybraná část spektra byla zvětšena na obrázku č. 16 a přítomnost metamfetaminu byla potvrzena fragmentačními spektry a jejich srovnání s fragmentačními spektry standardu.

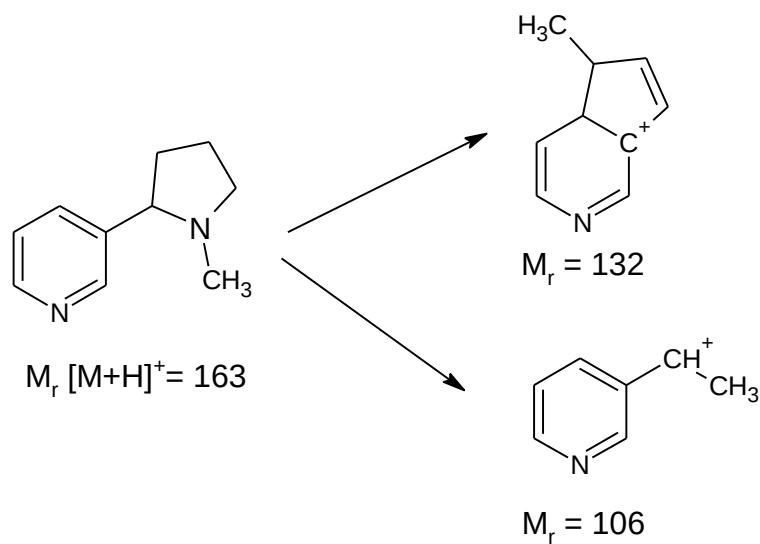
Případová studie III. – analýza nikotinu v krvi kuřáka

Obdobným způsobem byla pomocí nanoDESI-MS analyzována i krev kuřáka. Na obrázku č. 18 a 19 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum standardu nikotinu deponovaného na filtru ze skelných mikrovláken. V tabulce X. jsou uvedeny další parametry analýzy.

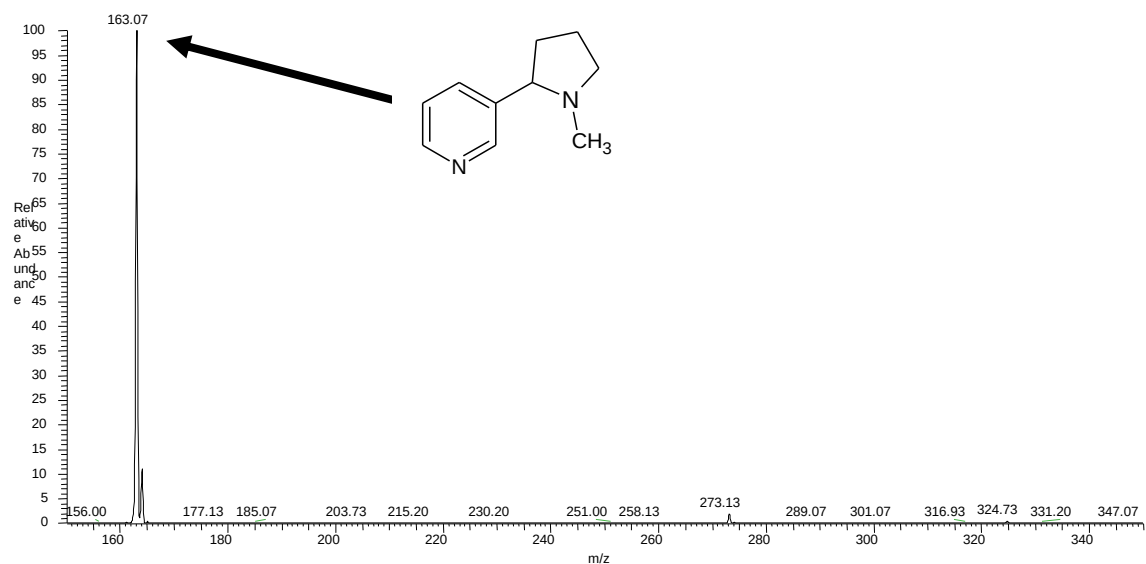
Tabulka X. – analyzované vzorky obsahující nikotin

Vzorek	Koncentrace analytu	Sprejovací kapalina	m/z $[M+H]^+$	Sprejovací napětí U [kV]	Kolizní energie [%]
a) Standard	1 mg/ml	ACN/voda	163	+ 2,5	25
b) Krev	-	ACN/voda	163	+ 2,5	25

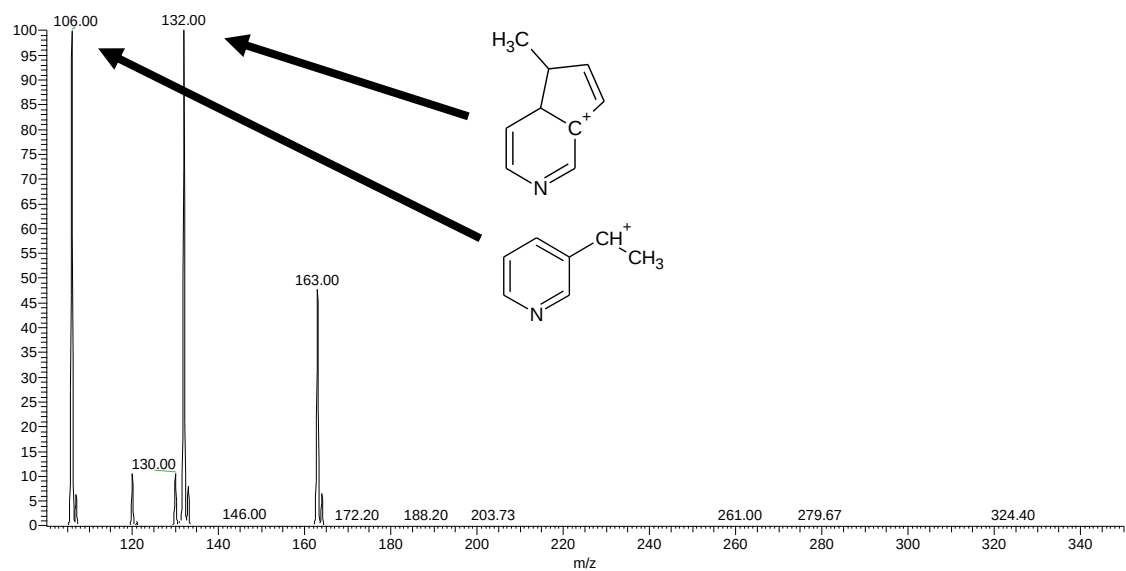
Významné fragmentační ionty [46]:



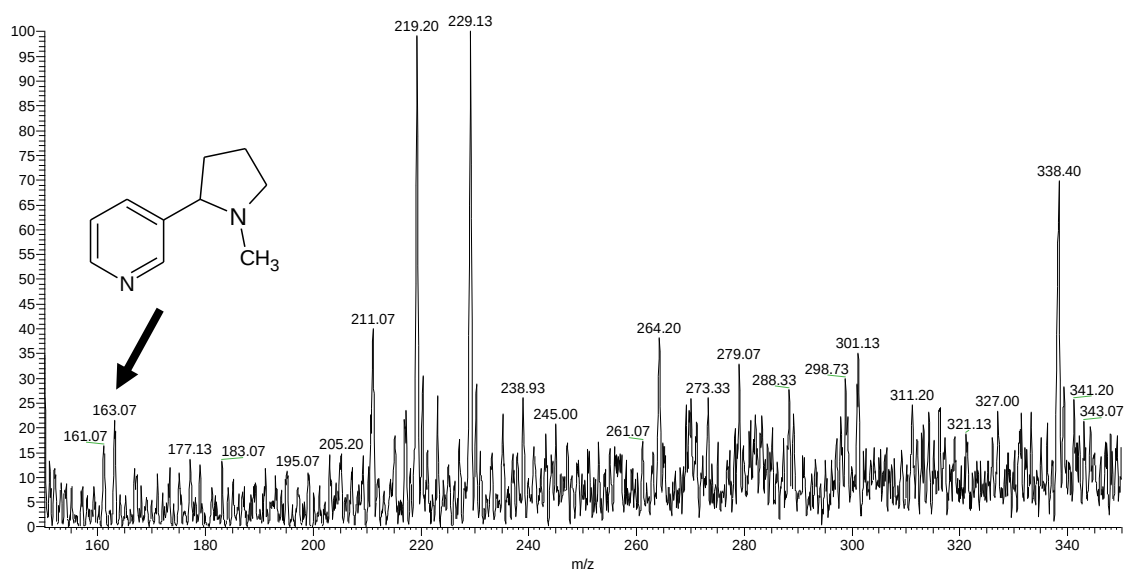
a) analýza standardu



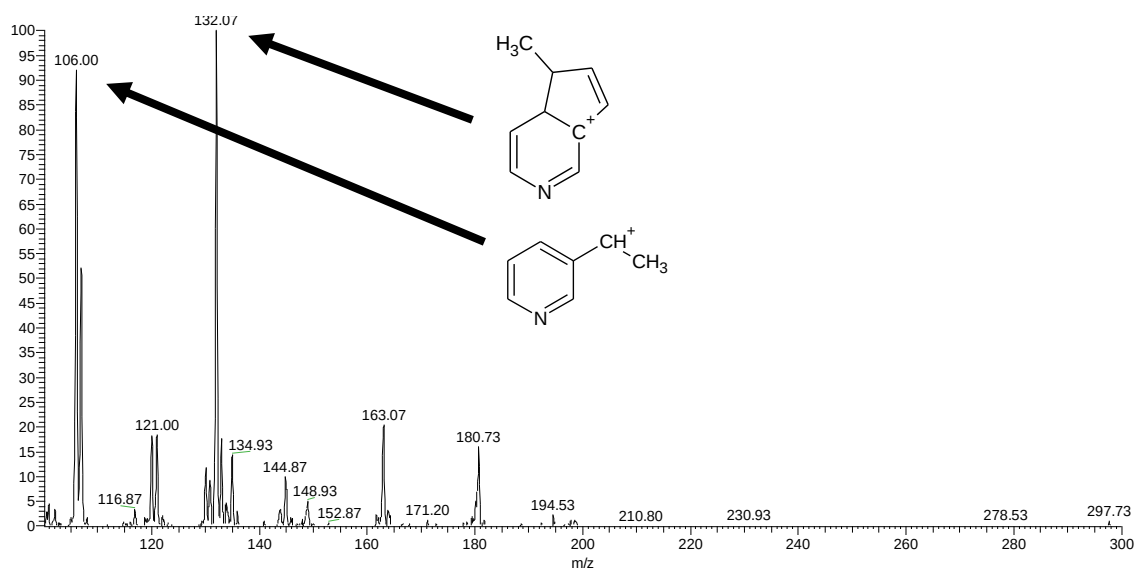
Obr. 18 - nanoDESI-MS spektrum standardu nikotinu (1 mg/ml, povrch FSM)



obr. 19 – nanoDESI-MS/MS spektrum standardu nikotinu (1 mg/ml, povrch FSM)



Obr. 20 – nanoDESI-MS spektrum plné krve obsahující nikotin



Obr. 21 – nanoDESI-MS/MS spektrum iontu nikotinu v krvi s významnými fragmenty na m/z 106 a 132

Na obrázku č. 20 a 21 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum plné krve obsahující nikotin deponované na filtru ze skelných mikrovláken. Přítomnost nikotinu byla potvrzena shodou fragmentačních MS/MS spekter, získaných analýzou krve, s fragmentačními MS/MS spektry standardu.

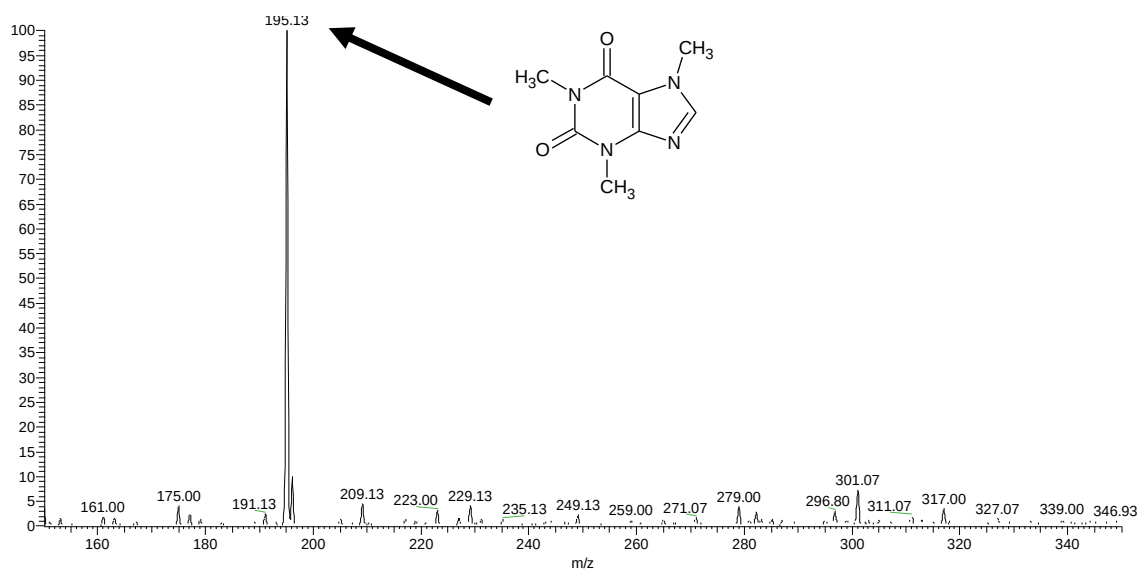
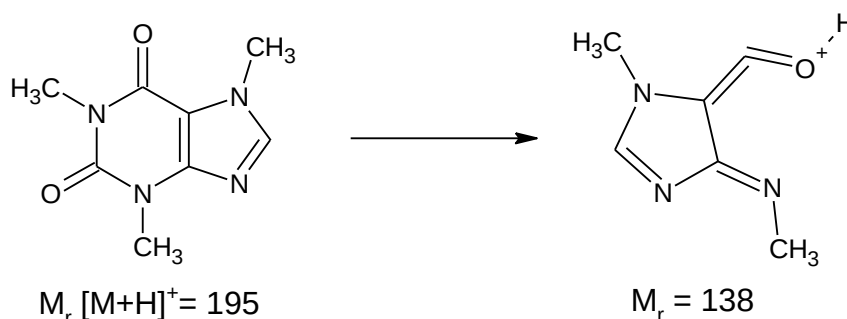
Analýza ostatních vzorků – kofein v krvi

Ostatní vzorky krve s obsahem biologicky aktivní látky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4. Analýza pomocí nanoDESI-MS byla provedena obdobným způsobem jako v předchozích případech. Na obrázku č. 22 a 23 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum standardu kofeinu deponovaného na filtru ze skelných mikrovláken. V tabulce XI. jsou uvedeny další parametry analýzy.

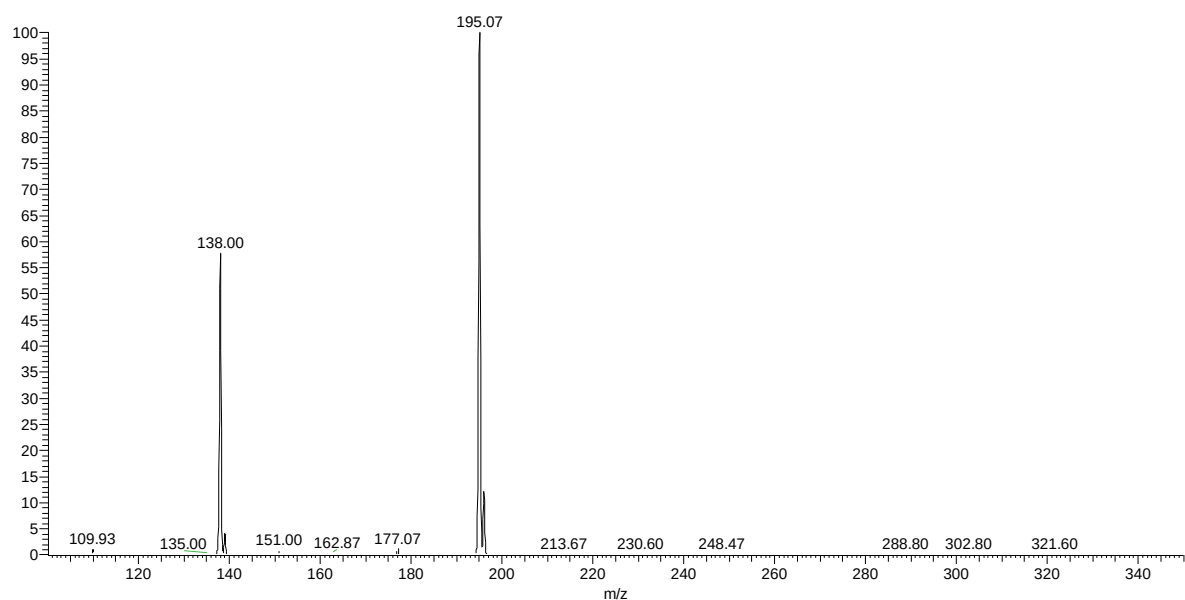
Tabulka XI. – analyzované vzorky obsahující kofein

Vzorek	Koncentrace analytu	Sprejovací kapalina	m/z $[M+H]^+$	Sprejovací napětí U [kV]	Kolizní energie [%]
a) Standard	1 mg/ml	ACN/voda	195	+ 2,5	30
b) Krev	0,1 mg/ml	ACN/voda	195	+ 2,5	30

Významné fragmentační ionty [46]:

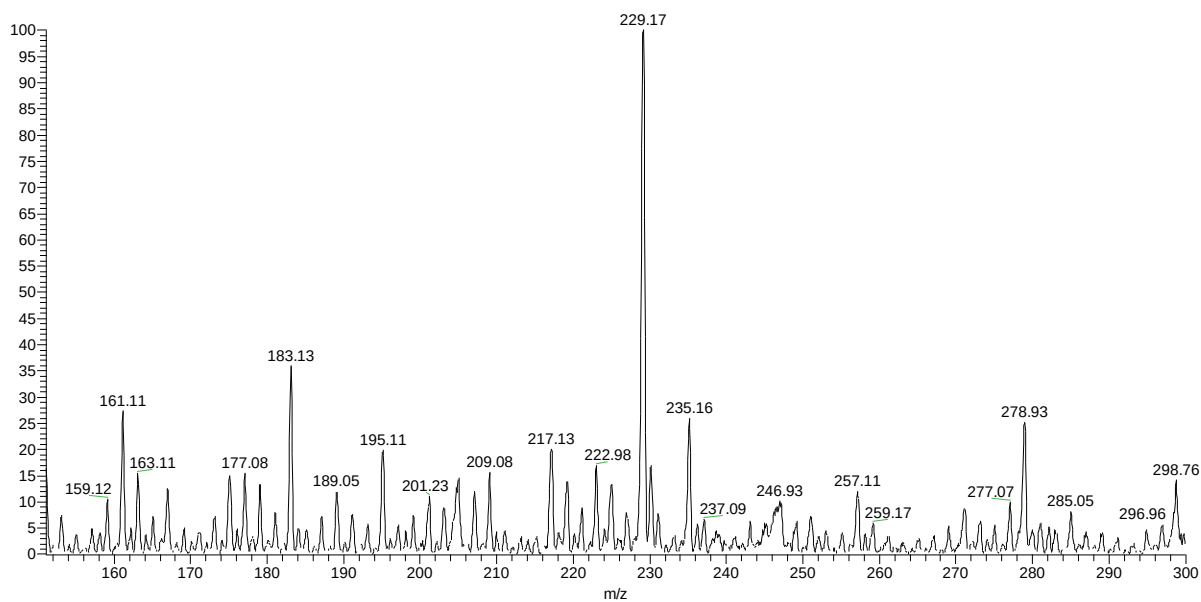


Obr. 22 – nanoDESI-MS spektrum standardu kofeinu (1 mg/ml, povrch FSM)

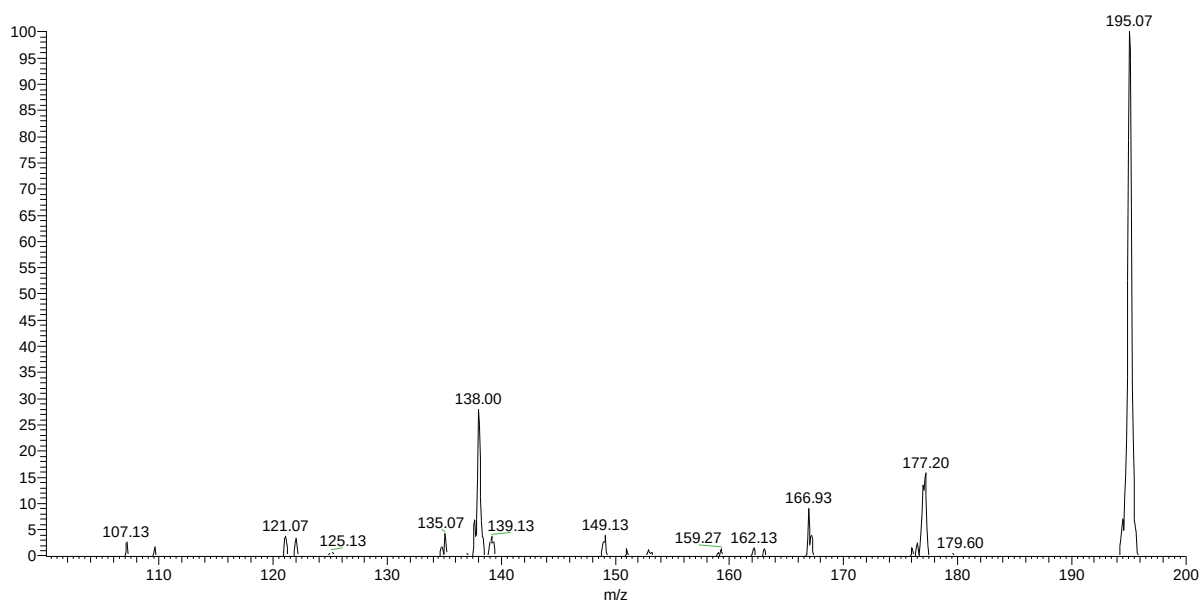


Obr. 23 – nanoDESI-MS/MS spektrum standardu kofeinu (1 mg/ml, povrch FSM)

S významným fragmentem na m/z 138



Obr. 24 – nanoDESI-MS spektrum plné krve obsahující kofein (0,1 mg/ml, povrch FSM)



Obr. 25 – nanoDESI-MS/MS spektrum plné krve obsahující kofein (0,1 mg/ml, povrch FSM) s významným fragmentem na m/z 138

Na obrázku č. 24 a 25 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum plné krve obsahující kofein deponované na filtru ze skelných mikrovláken. Přítomnost kofeinu byla potvrzena shodou fragmentačních MS/MS spekter, získaných analýzou krve, s fragmentačními MS/MS spektry standardu.

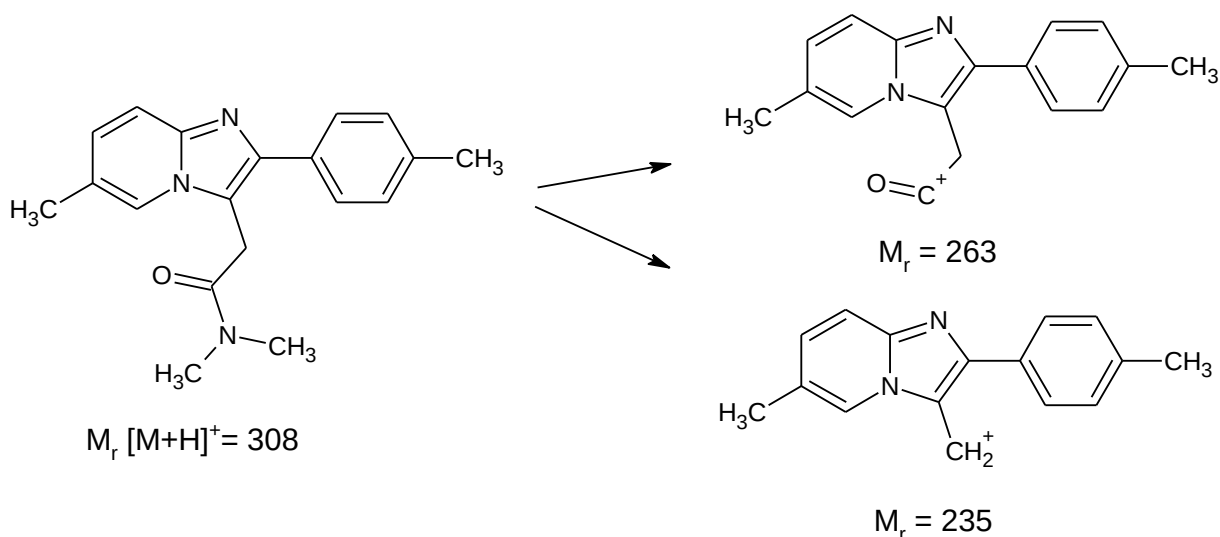
Analýza ostatních vzorků – zolpidem v krvi

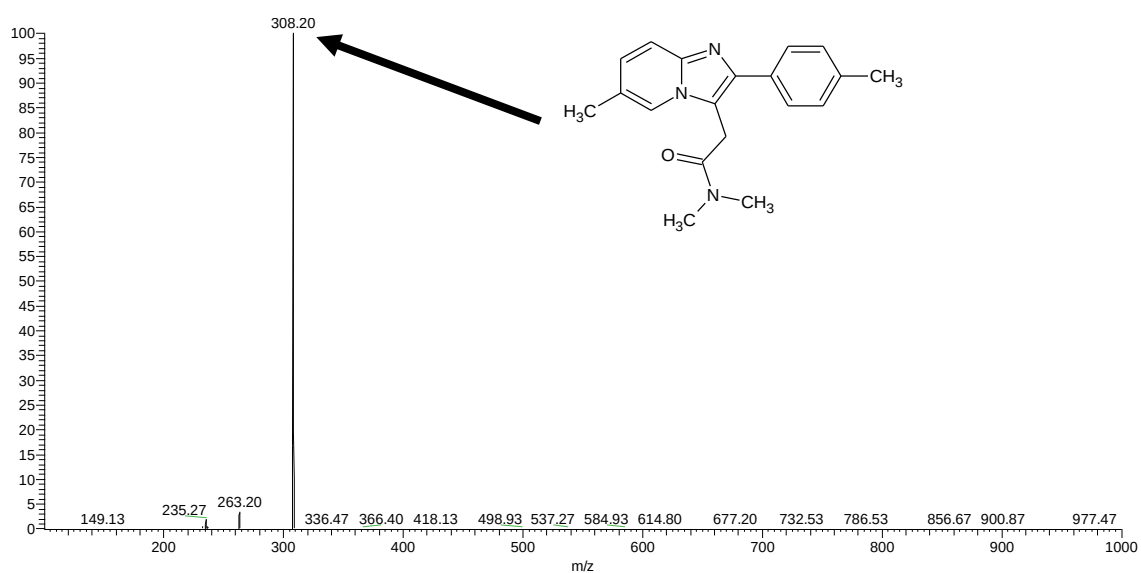
Krev s obsahem zolpidemu byla připravena postupem uvedeným v kapitole 4. Analýza pomocí nanoDESI-MS byla provedena obdobným způsobem jako v předchozích případech. Na obrázku č. 26 a 27 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum standardu zolpidemu deponovaného na filtru ze skelných mikrovláken. V tabulce XII. jsou uvedeny další parametry analýzy.

Tabulka XII. – analyzované vzorky obsahující zolpidem

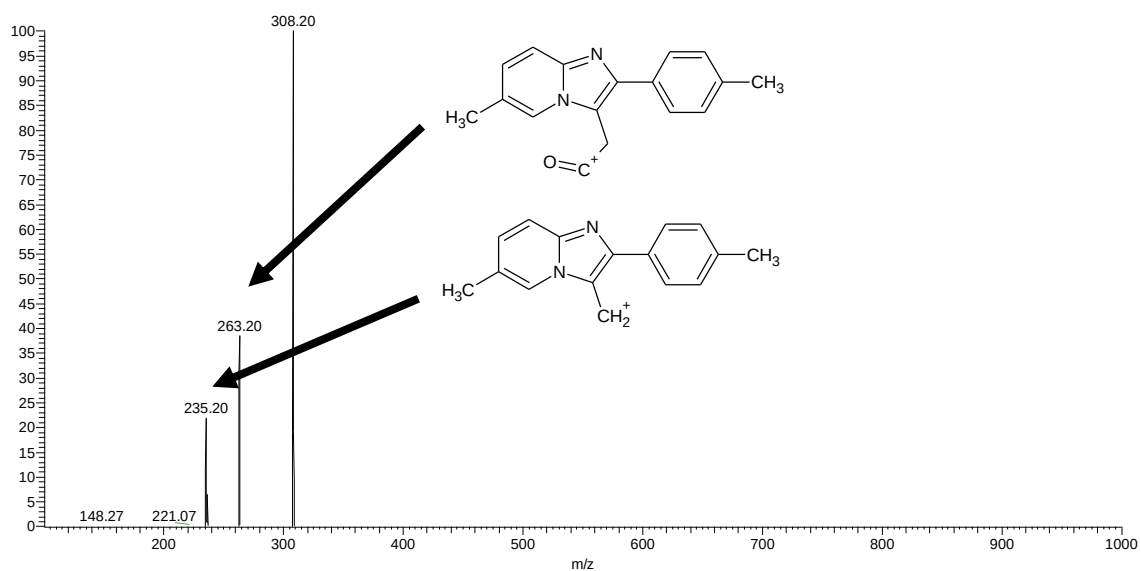
Vzorek	Koncentrace analytu	Sprejovací kapalina	m/z $[M+H]^+$	Sprejovací napětí U [kV]	Kolizní energie [%]
a) Standard	1 mg/ml	ACN/voda	308	+ 2,5	35
b) Krev	0,1 mg/ml	ACN/voda	308	+ 2,5	35

Významné fragmentační ionty [48]:

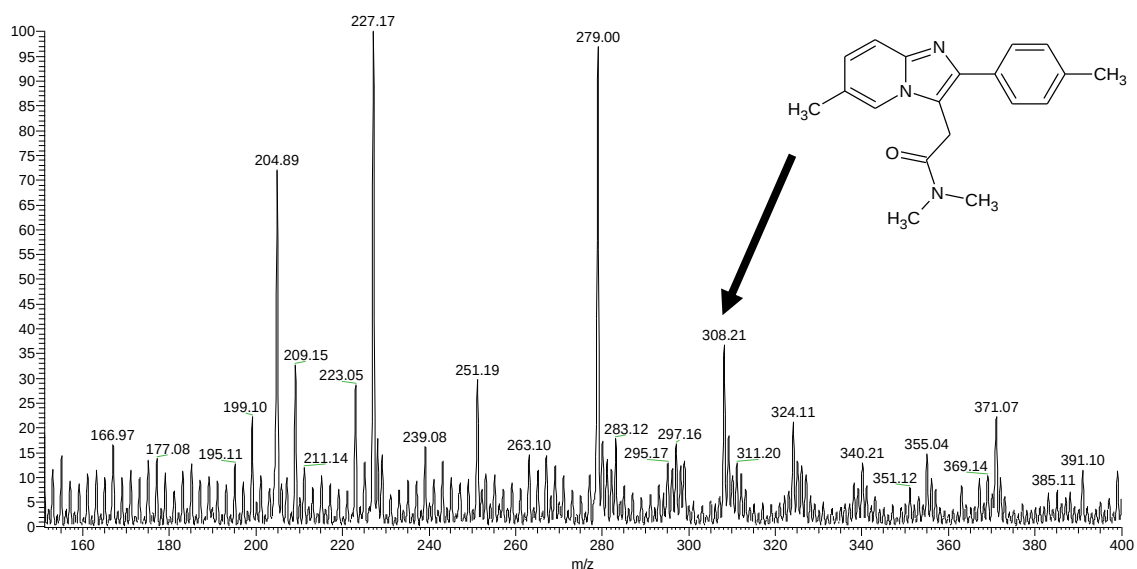




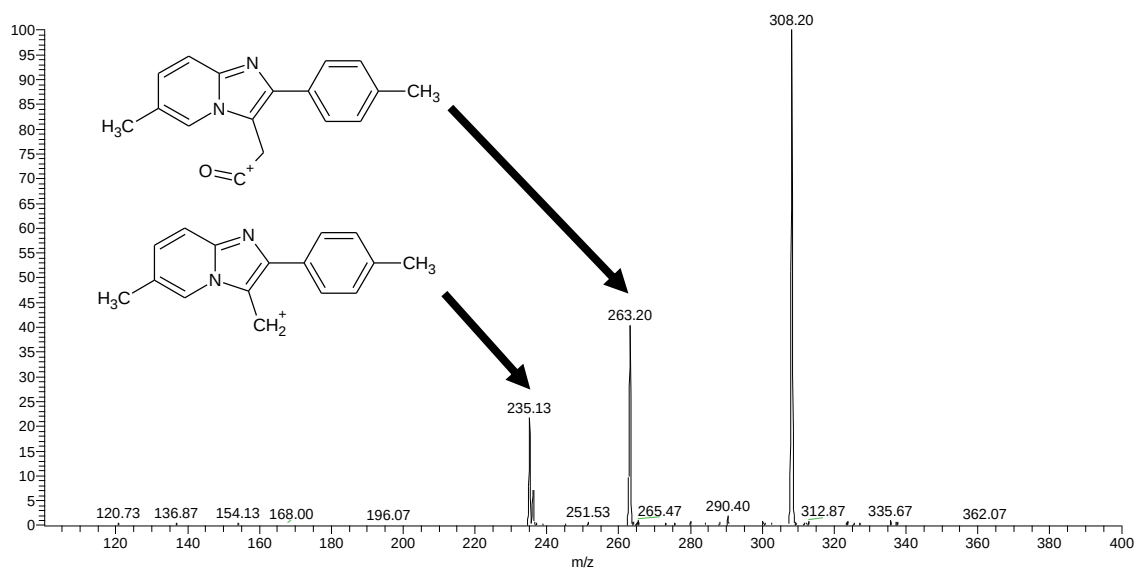
Obr. 26 – nanoDESI-MS spektrum standardu zolpidemu (1 mg/ml, povrch FSM)



Obr. 27 – nanoDESI-MS/MS spektrum standardu zolpidemu (1 mg/ml, povrch FSM)



Obr. 28 – nanoDESI-MS spektrum plné krve obsahující zolpidem (0,1 mg/ml, povrch FSM)



Obr. 29 – nanoDESI-MS/MS spektrum plné krve obsahující zolpidem (0,1 mg/ml, povrch FSM), s významnými fragmenty na m/z 263 a 235

Na obrázku č. 28 a 29 je uvedeno MS spektrum a fragmentační MS/MS spektrum plné krve obsahující zolpidem deponované na filtru ze skelných mikrovláken. Přítomnost zolpidemu byla potvrzena shodou fragmentačních MS/MS spekter, získaných analýzou krve, s fragmentačními MS/MS spektry standardu.

6. ZÁVĚR

Z dosažených výsledků je patrný potenciál vyvinuté metody hmotnostní spektrometrie s ionizací desorpčním nano-elektrosprejem pro toxikologické a forenzní účely. Byly studovány desorpční povrchy k dosažení vyšší intenzity a stability signálu. Jako nejvhodnější byl zvolen filtr ze skelných mikrovláken, který výrazně zvyšoval intenzitu signálu i opakovatelnost jednotlivých měření. Metoda umožňuje identifikaci cílových analytů v plné krvi s minimem nutných úprav před analýzou či bez předchozí extrakce anebo separace analytů. Výhodou metody je rovněž její rychlost a jednoduchost. Uvedené výsledky dokládají možnost využití metody pro identifikaci studovaných analytů, jejich kvantifikace je však vzhledem ke složité matici obtížnější. Také limity detekce jsou, ve srovnání s běžně používanými analytickými technikami (např. GC-MC, LC-MS), výrazně vyšší. I přes uvedené nedostatky je metoda vhodná pro rychlý screening akutní i letální intoxikace studovanými látkami. Další postupy vedoucí ke snížení detekčních limitů a k detailnějšímu zkoumání mechanismu ionizace budou předmětem dalšího studia.

7. REJSTŘÍK POUŽITÝCH POJMŮ A ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
ACN	Acetonitril
AES	Atomová emisní spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
CE	kapilární elektroforéza
DESI	Ionizace desorpčním elektroprejem
ESI	Ionizace elektrosprejem
FA	Kyselina mravenčí
FSM	Filtry ze skelných mikrovláken
GC	Plynová chromatografie
Hb	Hemoglobin
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ID	vnitřní průměr
ITP	izotachoforéza
IR	Infračervené spektroskopie
LC	Kapalinová chromatografie
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
nanoDESI	Ionizace desorpčním nano-elektroprejem
POD	Peroxidasa
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
TLC	Tenkovrstevná chromatografie
TOF	Detekce pomocí doby letu
TMB	Tetramethylbenzidin (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin)
UV/VIS	Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Páleníček T., Kubů P., Mravčík V.: *Nové syntetické drogy*, Úřad vlády ČR, Praha (2004).
2. Nakashima K.: J. Health Sci. 51 (2005) 272-277.
3. Balíková M.: *Forenzní a klinická toxikologie*, Galén, Praha (2007) .
4. Trojan S., et al.: *Lékařská fyziologie*, Grada, Praha (2003).
5. Poletti A.: J. Chrom. B. 733 (1999) 47-63.
6. Giorgi M., Del Carlo S., Saccomanni G., Lebkowska-Wieruszewska B., Kowalski, C.: The Veterinary Journal 180 (2009) 253-255.
7. Giorgi M., Saccomanni G., Lebkowska-Wieruszewska B., Kowalski, C.J.: Vet. Res. Commun. 33 (2009) 875-885.
8. Moffat A.C., Osseltan, M.D., Widdap B., Editors: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, vol. 2, Pharmaceutical Press, London (2004).
9. Luminol Product Info No. A8511, Sigma-Aldrich (1996).
10. Barni F., Lewis W.S., Berti A., Miskelly G.M., Lago G.: Talanta 72 (2007) 896-913.
11. Creamer J., Quickeden T.I., Crichton L.B., Robertson P., Ruhayel R.A.: Luminiscence 20 (2005) 411-413.
12. Garner D.D., Cano K.M., Peimer R.S., Yeshion T.E.: J. For. Sci. 21 (1976).
13. Wendel R., Hoegg U., Zavon M.: J Urol. 111 (1974) 607-610.
14. Chromý V., Fischer J., Havel J., Votava M.: *Bioanalytika – analytická chemie v laboratorní medicíně*, MU Brno (2002).
15. Yinon J. (Editor): *Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry*, CRC Press, USA (2004).
16. Rendle D.F.: *Advances in Chemistry Applied to Forensic Science*, Chem. Soc. Rev. 34 (2005) 1021-1030.
17. Coulter C., Tuyay J., Taruc M., Moore Ch.: For. Sci. Int. 196 (2010) 70-73.
18. Smyth W.F.: Electrophoresis 27 (2006) 2051-2062.
19. Smyth W.F., Brooks P.: Electrophoresis 25 (2004) 1413-1446.
20. Drummer O.H.: J. Chrom. B. 733 (1999) 27-45.
21. Spektroskopická Společnost J. M. Marci.: *Organická hmotnostní spektrometrie*, Praha (1996).

22. McGrew-Hill Handbooks.: *Dean's Analytical Chemistry*, Second Edition (2004).
23. Alnajjar A., Butcher J.A., McCord B.: *Electrophoresis* 25 (2004) 1592-1600.
24. Bell S.: *Forensic Chemistry*, Pearson Prentice Hall, NJ, USA (2006).
25. Arinobu T., et al.: *Forensic. Toxicol* 27 (2009) 1-6.
26. Dome P., Lazary J., Kalapos M.P., Rihmer Z.: *Neu. Bio. Rev.* 34 (2010) 295-342.
27. Solarino B., Riessmann B., Buschmann C.T., Tsokos M.: *For. Sci. Int.* 194 (2010) e17-e19.
28. Solarino B., Rosenbaum F., Riessmann B., Buschmann C.T., Tsokos M.: *For. Sci. Int.* 195 (2010) e19-e22.
29. Jirovský D., Lemr K., Ševčík J., Smysl B., Stránský Z.: *For. Sci. Int.* 96 (1998) 61-70.
30. Shima N., Katagi M., Tsuchihashi H.: *J. Health Sci.* 55 (2009) 495-502.
31. Kim J.Y., Ho Shin S., Kyo In M.: *For. Sci. Int.* 194 (2010) 108-114.
32. Chinaka S., Iio R., Takayama N., Kodama S., Hayakawa K.: *J. Health Sci.* 52 (2006) 649-654.
33. Weisser K.: *Biologicky aktivní organické látky*, Gaudeamus, Hradec Králové (2004).
34. Becker P.M., Sattar M.: *Current Treatment Options in Neurology* 11 (2009) 349-357.
35. Jones A.W., Kugelberg F.C., Holmgren A., Ahler J.: *For. Sci. Int.* 181 (2008) 40-46.
36. Hempel G., Blaschke G.: *J. Chrom. B.* 675 (1996) 131-137.
37. Miyaguaschi H. et al.: *For. Sci. Int.* 157 (2006) 57-70.
38. Gunnar T., Ariniemi K., Lillsunde P.: *J. Chrom. B.* 818 (2005) 175-189.
39. Tramadol AL 100 inj., Souhrn údajů u přípravku, Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv (SÚKL) Praha, staženo z webu <http://www.sukl.cz> dne 28.2.2010.
40. Gergov M., Nokua P., Vuori E., Ojanpera I.: *For. Sci. Int.* 186 (2009) 36-43.
41. Paterson S., Codero R., Burlinson S.: *J. Chrom. B.* 813 (2004) 323-330.
42. De Decker K., Cordonnier J., Jacobs W., Coucke V., Schepens P., Jorens P.G.: *For. Sci. Int.* 175 (2008) 79-82.
43. Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K.: *Chem. Listy* 101 (2007) 524-529.
44. Švidrnoch M., Ranc V., Hartmanová L., Maier V., Havlíček V., Lemr K.: *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Rerum Natur.* 49s (2010) 149-150.
45. Wiseman J.M., Laughlin B.C.: *Desorption Electrospray Ionization (DESI) Mass Spectrometry: A brief introduction and overview*, Prosolia Inc., Indianapolis, USA (2008).

46. Williams J.P., Nibbering N.M.M., Green B.N., Petl P.J., Scrivens J.H.: J. Mass Spectrom. 46 (2006) 1277-1286.
47. Fuh M.-R..S., Lu, K.-T.: Talanta 48 (1999) 415-423.
48. Smyth W.F., Joyce C., Ramachandran V.N., O’Kane E., Coulter D.: Anal. Chim. Acta: 506 (2004) 203-214.