

HPLC-MS A CE-MS S IONIZACÍ ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU V ANALÝZE MORFINU A PŘÍBUZ- NÝCH LÁTEK

MICHAELA SMETKOVÁ^{a*}, PETER ONDRA^b
a KAREL LEMR^a

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Uni-
verzita Palackého, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc, ^bÚstav
soudního lékařství, Fakultní nemocnice Olomouc, Hněvo-
tínská 3, 775 09 Olomouc
lemr@prfnw.upol.cz

Došlo 15.10.03, přijato 2.2.04.

Klíčová slova: morfin, opiáty, kapalinová chromatografie,
kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, ionizace
za atmosférického tlaku

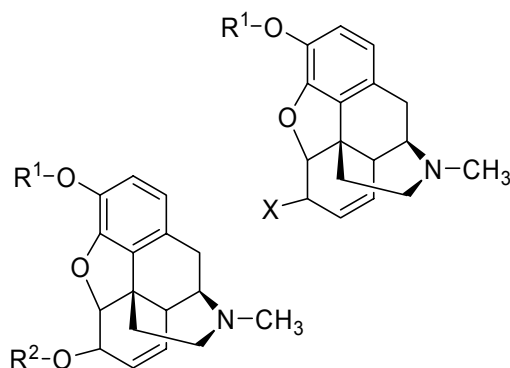
Obsah

1. Úvod
2. Kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií
s ionizací za atmosférického tlaku
3. Kombinace kapilární elektroforézy s hmotnostní spek-
trometrií s ionizací za atmosférického tlaku
4. Závěr

1. Úvod

Zneužívání drog je závažným problémem dnešního světa. Z ilegálního obchodu plynou producentům a pře-
kupníkům značné příjmy, přičemž užitím drogy je ohrožen
jak sám narkoman, tak i jeho okolí. Významnou skupinou
drog jsou opiáty, látky se strukturou blízkou morfinu¹.
Kromě morfinu se k nim řadí heroin, kodein, hydrokodon
a další. Struktury vybraných zástupců jsou zřejmé z obr. 1.
Své skupinové označení získaly tyto látky podle opia
obsaženého v máku setém (*Papaver somniferum*). Z jeho nařiz-
nutých nezralých makovic vytéká hnědá pryskyřice, která
na vzduchu usychá – surové opium. Surové opium obsahu-
je mnoho narkotických alkaloidů včetně morfinu (až 15 %) a
kodeinu (až 4 %). Legálně se opiáty používají
v lékařství jako silné léky tlumící bolest (analgetika) nebo
jako léky proti kašli (antitusika)¹.

Vzhledem k jejich značnému rozšíření a legálnímu
i nelegálnímu užívání, hraje analýza opiátů důležitou roli
v toxikologické praxi. Významnou analytickou metodou je
v této souvislosti hmotnostní spektrometrie. V osmdesá-



Název	R ¹	R ²	X
Morfin	H	H	–
Kodein	CH ₃	H	–
Ethylmorfin	C ₂ H ₅	H	–
6-Monoacetylmorfin	H	CH ₃ COO	–
Heroin	CH ₃ COO	CH ₃ COO	–
Hydrokodon	CH ₃	–	O=
Dihydrokodein	CH ₃	–	HO

Obr. 1. Struktury vybraných opiátů

tých letech minulého století se začalo zavádět spojení ply-
nové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)
do nejrůznějších laboratoří včetně toxikologických. GC-
MS poskytuje účinnou separaci, selektivitu i citlivost de-
tekce a umožňuje využít poměrně obsáhlých databází
dobře reprodukovatelných hmotnostních spekter získaných
po ionizaci analytu elektrony. K dispozici je velký počet
spekter nejrůznějších drog včetně opiátů. Při analýze opiátů
v biologických matricích však GC-MS vyžaduje hydro-
lyzu glukuronidů (obecněji konjugátů), čímž se ztrácí in-
formace o relativním zastoupení glukuronidu a volného
opiátu, a potřebné je i provedení derivatizace. Z hlediska
struktury opiátů a jejich konjugátů se jako vhodná alterna-
tiva nabízí analýza metodou HPLC-MS (spojení vysoko-
účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektro-
metrií) nebo CE-MS (spojení kapilární elektroforézy
s hmotnostní spektrometrií).

Dnes nejběžnějšími rozhraními pro zmíněná dvě spo-
jení jsou ionizace elektrosprejem (electrospray ionization
– ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku
(atmospheric pressure chemical ionization – APCI), které
patří do skupiny ionizačních technik souhrnně označova-
ných jako ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric

*Michaela Smetková získala 3. místo v soutěži O cenu firmy Merck v Pardubicích 28. 1. 2003 za nejlepší studentskou vě-
deckou práci v oboru analytické chemie.

pressure ionization – API, cit.^{2,3}). Obě patří mezi „měkké“ způsoby ionizace. Molekula analytu získává při ionizaci výrazně méně energie ve srovnání s ionizací elektrony. Důsledkem je obvykle intenzivní signál kvazimolekulárního resp. molekulárního iontu poskytující informaci o molekulové hmotnosti a malá nebo žádná fragmentace těchto iontů, což omezuje možnosti strukturální analýzy. Tuto nevýhodu API lze překonat pomocí kolizí indukované disociace (collision induced dissociation – CID) kvazimolekulárního resp. molekulárního iontu. Získané fragmentační spektrum pak často poskytuje důležité informace o struktuře analyzovaných látek, ale je třeba mít na paměti, že se může i velmi výrazně lišit od hmotnostního spektra získaného ionizací elektrony a dokonce i od spektra naměřeného pomocí CID na stejném přístroji. Uvedený fakt komplikuje porovnávání spekter, ale tato nevýhoda bývá vyvažována přednostmi separace v kapalně fázi, ke kterým patří možnost analýzy termolabilních nebo polárních či iontových látek bez potřeby jejich chemické modifikace před vlastní separací.

V našem přehledu se zaměřujeme na vybrané práce, které byly publikovány od roku 1998 a demonstrují možnosti spojení hmotnostní spektrometrie se separací v kapalně fázi (HPLC-MS, CE-MS) při analýze morfinu a příbuzných látek. Kromě samotných aplikací jsou v některých z nich porovnávány iontové zdroje pracující za atmosférického tlaku a hodnoceny experimentální parametry působící na účinnost ionizace studovaných látek. Zastoupeny jsou také práce orientované na otázky reprodukovatelnosti hmotnostních spekter získaných kolizí indukovanou disociací. Informace o průběhu ionizace a reprodukovatelnosti spekter publikované v níže citovaných pracích mohou být užitečné pro uživatele systémů HPLC-MS a CE-MS řešící problémy i mimo rámec analýzy opiátů.

2. Kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií s ionizací za atmosférického tlaku

Analýze opiátů v biologických tekutinách kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií věnovali svůj přehledový referát z roku 1999 Pichini a spol.⁴ Jejich publikace zahrnuje práce využívající jako rozhraní mezi kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií termosprej, ESI a APCI. Autoři uvedli základní informace o řadě analytických postupů (analyzované látky, typ vzorku, jeho předúprava, použitá kolona a rozhraní pro HPLC-MS, případně meze stanovitelnosti), ale také upozornili na nezbytnost pečlivé optimalizace instrumentálních parametrů, jako je teplota u termospreje nebo sprejovací napětí u elektrospreje. Závěrem konstatovali, že technika HPLC-MS je vhodná pro potvrzení přítomnosti analytu a pro kvantitativní měření (např. farmakokinetická), ale že je nutný další výzkum, aby dosáhla spolehlivosti a robustnosti srovnatelné s GC-MS.

V obsáhlém přehledu uplatnění HPLC-MS v toxikologické analýze popsali Marquet a Lachâtre řadu dříve

používaných iontových zdrojů i dva dnes nejrozšířenější – ESI a APCI (cit.⁵). Mezi typické aplikace HPLC-MS zařadili stanovení morfinu, jeho metabolitů a příbuzných látek. Autoři shrnuli základní informace o používaných analytických postupech (analyzované látky, postup úpravy vzorku, podmínky separace a hmotnostně spektrometrického měření, meze stanovitelnosti a detegovatelnosti). Citované práce podle autorů ukázaly, že ESI i APCI jsou vhodné pro analýzu morfinu a jeho metabolitů, ale je nutné optimalizovat mobilní fázi jak z hlediska separace, tak z hlediska ionizace. Potvrdily rovněž, že tandemová hmotnostní spektrometrie nabízí oproti použití jednoduchého hmotnostního analyzátoru lepší poměr signál/šum i selektivitu. Autoři předpověděli, že by se HPLC-MS s ionizací za atmosférického tlaku (ESI nebo APCI) mohla uplatnit při screeningu neznámých látek jako komplementární metoda ke GC-MS.

Relativně novějším způsobem ionizace za atmosférického tlaku je tzv. „sonic“ sprej („zvukový“ sprej). K tvorbě nabitých kapek, z nichž jsou po jejich zmenšení emitovány ionty analytu, je zde využíváno rozprašování kapalných vzorků, např. eluátu z chromatografické kolony, proudem plynu s mírně podzvukovou rychlostí. Zhodnocením upotřebitelnosti tohoto iontového zdroje pro HPLC-MS analýzu heroinu se zabýval Dams a spol.⁶ Tuto techniku srovnávali s ionizací elektrosprejem. Popsali vliv organických rozpouštědel, těkavých kyselin a pufrů v mobilní fázi na účinnost ionizace. Přítomnost rozpouštědel podporovala účinnost ionizace, zatímco zvyšující se obsah těkavých kyselin a pufrů vedl k významnému potlačení signálu u obou iontových zdrojů. Na analýze sedmi hlavních opiátových alkaloidů autoři demonstrovali použitelnost „sonic“ spreje a označili ho za alternativu k APCI a ESI. Chromatografická separace byla provedena v systému obrácených fází na monolitické koloně gradientem mobilní fáze (voda - acetonitril) s průtokem 5 ml.min⁻¹. Za kolonou byl tok mobilní fáze dělen a do iontového zdroje hmotnostního spektrometru pokračovala cca jedna dvacetina. Jeden cyklus od nástřiku do dalšího nástřiku trval maximálně 7 min. Metoda byla validována a při mezích stanovitelnosti od 5 do 40 ng.ml⁻¹ bylo navrženo její uplatnění při měření profilu nečistot v zabavených vzorcích heroinu.

Autoři předcházející práce publikovali další studii zaměřenou na srovnání tří iontových zdrojů (ESI, APCI a „sonic“ sprej) z hlediska účinnosti ionizace morfinu⁷. Vyhodnocovali vliv organického rozpouštědla (methanol, acetonitril), přísady těkavých kyselin (kyselina mravenčí a octová) a pufrů (mravenčan a octan amonný) na průběh ionizace. Potvrdili obecný předpoklad, že složení mobilní fáze ovlivňuje ionizaci u všech tří zdrojů. Pro elektrosprej a „sonic“ sprej získali vyšší odezvu při vyšším obsahu organického rozpouštědla, další testované složky mobilní fáze způsobovaly potlačení ionizace. V případě APCI pozorovali vždy zlepšení ionizace. Zjištěnou odlišnost přisoudili skutečnosti, že u prvních dvou zdrojů se při ionizaci uplatňují děje odehrávající se v kapalně fázi, zatímco u APCI probíhá ionizace v plynně fázi. Podrobněji diskutovali i rozdíl v odezvě analytu způsobené změnou složky

ní mobilní fáze při ionizaci jednotlivými technikami. U elektrospreje např. použití acetonitrilu místo methanolu vedlo k vyššímu výtěžku ionizace, přičemž optimum bylo nalezeno při 90 % acetonitrilu. Zvýšení jeho obsahu na 100 % již odezvu snižovalo. Autoři vysvětlili tento fakt uplatněním dvou konkurenčních dějů. Vyšší obsah organického rozpouštědla zlepšoval sprejování v důsledku snižování viskozity a povrchového napětí, ale zároveň rostlo potlačení ionizace v důsledku přenosu protonu z iontu analytu na molekulu rozpouštědla v plynné fázi. Podobně byly hodnoceny i další vlivy. Závěrem pro analýzu morfinu doporučili APCI jako robustnější techniku méně ovlivňovanou tekavými aditivami.

Bogusz publikoval rozsáhlejší práci zaměřenou na rutinní využití spojení kapalínové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v soudních vědách⁸. Vzhledem k omezenému množství vzorku a současnému zneužívání různých drog byl stupeň předseparace založen na běžné extrakci tuhou fází (solid phase extraction – SPE), která je aplikovatelná pro všechny skupiny bazických drog. Sorbent C₁₈ byl promýván methanolem, vodou a pufr (uhličitan amonný, 0,01 mol.l⁻¹, pH 9,3), elučním činidlem byla směs methanolu a 0,5 mol.l⁻¹ kyseliny octové (9 : 1). Zpracovávány byly vzorky séra, krve, moče aj. Mobilní fáze pro HPLC separaci na obrácených fázích obsahovala stále dvě stejné složky – acetonitril a pufr (50 mM-HCOONH₄, pH 3,0). Pro různé skupiny drog se měnil pouze jejich poměr. U morfinu, kodeinu a jejich metabolitů byl tento poměr 10 : 90 (acetonitril : pufr). K detekci analytů byl využíván jednoduchý kvadrupól s chemickou ionizací za atmosférického tlaku pracující v kladném módu. APCI je podle autora ve srovnání s ESI univerzálnější a obecně zaručuje vyšší citlivost při analýze drog (vyjma drog velmi polárních). Sledovány byly kvazimolekulární ionty a alespoň jeden charakteristický fragment získaný kolizí indukovanou disociací ve zdroji (nejde tedy o tandemovou hmotnostní spektrometrii). Výjimkou byly morfin, kodein a dihydromorfin, u kterých vzhledem k nevhodné fragmentaci byl monitorován pouze kvazimolekulární ion. Jako vnitřní standardy sloužily deuterovaná analoga některých drog. Kromě opiátů byla metoda aplikována při průkazu kokainu a jeho metabolitů, amfetaminu a methylenedioxyamfetaminu („extáze“), benzodiazepinů a halucinogenů. Autor považuje HPLC-APCI-MS za vhodnou alternativu dnes široce se uplatňujícího spojení GC-MS při prokazování a stanovování určitého cílového analytu. Z praktického hlediska zdůrazňuje, že není nutné provádět derivatizaci a že HPLC-MS rozšiřuje spektrum analyzovatelných látek i do oblasti polárních sloučenin jako jsou např. některé metabolity. Pro potřeby toxikologického monitorování však stále za nejvhodnější metodu označuje GC-MS s ionizací elektrony, která má k dispozici obsáhlé databáze reprodukovatelných spekter. I když jsou budovány databáze hmotnostních spekter získaných technikou API-MS, stále ještě existuje problém s jejich reprodukovatelností mezi různými laboratořemi. Až po jeho vyřešení by se nejvhodnější metodou mohla stát technika HPLC-API-MS.

Reprodukovatelnost spekter získaných kolizí indukovanou disociací ve zdroji hodnotil Bogusz a spol. na základě výsledků získaných ve třech laboratořích pro morfin-3-glukuronid, 6-monoacetylmorfin, kodein, diethylamid kyseliny lysergové a methylenedioxyamfetamin⁹. Měření byla prováděna na systémech HPLC-API-MS, přičemž k ionizaci analytů sloužil elektrosprej i chemická ionizace za atmosférického tlaku a hmotnostním analyzátozem byl jednoduchý kvadrupól. Spektra získaná v jedné laboratoři v krátkém časovém období byla vcelku reprodukovatelná, ale v delším časovém období byly pozorovány rozdíly při použití APCI. Spektra naměřená při ionizaci elektrosprejem (v téže laboratoři a na daném přístroji) byla dobře reprodukovatelná i v delším časovém období. Mohla by tedy sloužit pro tvorbu databáze, ale pouze pro účely dané laboratoře, neboť při porovnávání spekter z různých laboratoří nebylo dosaženo vyhovující shody ani u jedné z ionizačních technik. Spektra z různých laboratoří získaná za jinak stejných podmínek na stejném typu přístroje vykazovala různý stupeň fragmentace. Měření na různých přístrojích, byť konstrukčně blízkých, vedlo ke spektrům, u kterých se neměnil pouze poměr intenzit jednotlivých fragmentů, ale byly pozorovány dokonce i různé fragmenty resp. adukty. Mezilaboratorní rozdíly autoři vysvětlují různou kolizní energií při aktivaci iontů. I když byla v jednotlivých laboratořích použita její nominálně stejná hodnota, byly podle autorů ionty různě aktivovány v důsledku rozdílných napětí nastavovaných při ladění přístrojů a v důsledku odlišného tlaku v oblasti kolizní aktivace iontů. Změny ve složení mobilní fáze (obsah organického rozpouštědla, koncentrace pufru) neovlivnily reprodukovatelnost fragmentace významnou měrou.

Vlivy působící na vzhled ESI spekter drog generovaných kolizí iontů ve zdroji byly studovány i dalšími autory¹⁰. Pozornost byla zaměřena na složení mobilní fáze (např. použité rozpouštědlo, pufr, jejich koncentrace, pH), ale nebyl zjištěn jeho významný vliv na vzhled spekter a na optimalizaci fragmentačního napětí. Obecně větší napětí je potřebné k fragmentaci větších molekul a toto napětí musí kromě přiměřené fragmentace zajišťovat transport iontů přes kolizní oblast přístroje. Z těchto důvodů aplikovali autoři při záznamu hmotnostních spekter rostoucí fragmentační napětí. Vytvořené knihovny spekter při následných testech umožnily pozitivní identifikaci ve více než devadesáti pěti procentech případů. Z publikace je zřejmé, že pro úspěšnou identifikaci je nezbytný dostatečný signál analytu v hmotnostním spektrometru, což je podmíněno i zpracováním reálného vzorku a použitou chromatografickou separací.

Zlepšení reprodukovatelnosti spekter lze očekávat při měření tandemovou hmotnostní spektrometrií, kdy se kolizí indukovaná disociace uskutečňuje po izolaci iontu prekurzoru, i když i v tomto případě je porovnávání spekter komplikovanější než při ionizaci elektrony. Tento přístup byl zvolen při vývoji metody pro rychlou identifikaci užitím knihovny spekter a pro kvantifikaci drog¹¹. Po separaci vysokoúčinnou kapalínovou chromatografií na monolitické koloně s gradientovou změnou mobilní fáze následova-

la tandemová hmotnostní spektrometrie realizovaná po ionizaci elektrosprejem v iontové pasti. Elektrosprej byl zvolen z důvodu menší fragmentace kvazimolekulárních iontů ve srovnání s APCI. Jako prekurzory pro kolizí indukovanou disociaci byly izolovány protonované molekuly látek. K identifikaci sloužila knihovna spekter a retenčních časů vytvořená v laboratoři autorů. Nebylo provedeno mezilaboratorní porovnávání kolizních spekter. Současné užití spekter a retenčních časů zvýšilo úspěšnost identifikace.

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií je využíváno při analýze opiátů poměrně často. V následujícím textu je uvedeno pouze několik příkladů.

Ve spojení s několikaminutovou separací vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií byla tato technika použita při stanovení opiátů v moči, plazmě a krvi¹². Bylo dosaženo meze stanovitelnosti opiátů 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a linearity od 10 do 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Vývoj a validaci citlivé metody HPLC-ESI-MS-MS pro stanovení hydromorfonu v lidské plazmě popisuje práce Naidonga a spol.¹³ Předúprava vzorku byla založena na extrakci v systému kapalina-kapalina. Zajímavé je, že separace byla prováděna na silikagelové koloně s mobilní fází acetonitril : voda : kyselina mravenčí (80 : 20 : 1, v/v/v). Pro daný účel je podle autorů uvedený chromatografický systém výhodnější než systém s nepolární stacionární fází a to jak z hlediska separace, tak ionizace analytů. Dosáhnout separace hydromorfonu a jeho metabolitů, hydromorfon-3-glukuronidu, bylo zásadní pro eliminaci falešně pozitivních výsledků, neboť glukuronid snadno fragmentuje v iontovém zdroji před vstupem do hmotnostního analyzátoru za vzniku protonovaného hydromorfonu. Fragmentace glukuronidů v iontovém zdroji je poměrně snadná a kvalitní separace opiátů (obecněji jakékoli látky metabolizující se na glukuronid) a jeho glukuronidu je nezbytná, mají-li být obě látky kvantifikovány odděleně. Autoři pracovali s deuterovaným hydromorfonem jako vnitřním standardem a svoji metodu validovali v koncentračním rozsahu 0,05–10 ng.ml^{-1} plazmy.

Spojením HPLC s tandemovým hmotnostním spektrometrem (kvadrupól – analyzátor z doby letu, Q-TOF) vybaveným ionizací elektrosprejem stanovovali Mortier a spol. ve slinách současně opiáty (morfin, kodein), amfetaminy (amfetamin, methamfetamin, extáze aj.), kokain a benzoylgonin¹⁴. Na problematiku analýzy slin se zaměřili také Dams a spol.¹⁵ Rychlá příprava vzorků spočívala pouze ve vysrážení proteinů. Analytickou koncovkou bylo spojení HPLC-APCI-MS-MS. Autoři nepozorovali negativní vlivy matrice a považují sliny za vhodnou alternativní matici pro monitorování studovaných látek.

Tandemová hmotnostní spektrometrie se uplatnila dále např. při analýze morfinu a jeho glukuronidů v lidském séru^{16,17}, při identifikaci řady drog včetně opiátů v moči¹⁸ nebo při testování vhodnosti komerčních SPE sorbentů pro screening drog¹⁹. V literatuře lze najít i další příklady úspěšného využití přístrojů s jednoduchým hmotnostním analyzátozem při analýze opiátů např. v tělních

tekutinách²⁰, v lidské krvi²¹ nebo stěvním obsahu novorozence²².

3. Kombinace kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií s ionizací za atmosférického tlaku

Kapilární elektroforéza (CE) dosahuje vysoké účinnosti separace a je komplementární technikou ke kapalinové chromatografii. Není proto překvapivé, že existuje i snaha o její využití ve spojení s hmotnostní spektrometrií při analýze opiátů. Publikovaných prací zaměřených na tuto problematiku je výrazně méně oproti těm, ve kterých se uplatňuje HPLC-MS, přesto lze na výsledcích získaných v laboratoři W. Thormanna ukázat aplikovatelnost CE-MS v diskutované oblasti. V práci z roku 2000 autoři popisují analýzu kodeinu, dihydrokodeinu a jejich glukuronidů v lidské moči metodou založenou na kombinaci imunoanalýzy a kapilární elektroforézy, která dovoluje prokázat přítomnost některých opiátů²³. Identifikaci konkrétního analytu v moči (po jejím zpracování SPE) však prováděli na základě hmotnostně spektrálních dat získaných technikou CE-MS s hydrodynamickým dávkováním. Tělavým základním elektrolytem byl roztok octanu amonného (25 mmol.l^{-1}) upravený na pH 9 (1 M- NH_3). Iontovým zdrojem byl elektrosprej, do kterého byla spolu se základním elektrolytem vytékajícím ze separační kapiláry zaváděna pomocná kapalina (methanol : voda : kyselina octová = 60 : 39 : 1, v/v/v) průtokem 3 $\mu\text{l.min}^{-1}$, který zajišťoval vhodné průtokové podmínky ve zdroji. Ionizací byly produkovány protonované molekuly analytů. Jejich následnou kolizí indukovanou disociací v iontové pasti byla získávána tandemová hmotnostní spektra 2. a 3. stupně. Metoda dovoluje identifikovat studované látky na koncentračních hladinách 100 až 200 ng.ml^{-1} .

V další práci byly analyzovány vzorky moče zpracované extrakcí tuhou fází, jako tomu bylo v předchozím případě, nebo extrakcí kapalina-kapalina, ale i vzorky neupravené nebo jenom zředěné²⁴. U těch umožnila CE-MS monitorovat sledované opiáty pouze na koncentračních hladinách vyšších než 2 až 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Výrazné zlepšení citlivosti bylo dosaženo elektrokinetickým dávkováním, které vede k nástřiku většího množství analytu zkoncentrovaného do úzké zóny v separační kapiláře²⁵. Některé ze studovaných opiátů byly prokazovány přímo ve vzorku zředěné moči, ale kombinace CE-MS s předúpravou vzorku extrakcí tuhou fází vedla k pozitivní identifikaci většího počtu analytů. Alternativní přístup k analýze morfinu v moči metodou CE-MS založený na hydrodynamickém dávkování velkého množství vzorku publikoval Tsai a spol.²⁶ Wey a Thormann aplikovali CE-MS s měřením hmotnostních spekter až do stupně MS^4 při identifikaci oxykodonu a jeho hlavních metabolitů v lidské moči²⁷. Souhrnně jsou některé příklady z výše zmíněných přístupů k analýze morfinu a příbuzných látek uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Výbrané příklady analýzy morfinu a příbuzných látek technikou HPLC-API-MS popř. CE-API-MS

Analyzované látky	Vzorek	Úprava vzorku	Separace	MS	Lit.
Morfin, kodein, dihydrokodein a jejich metabolity, methadon, buprenorfin, kokain a jeho metabolity, amfetaminy aj.	sérum, krev, moč aj.	SPE ^a	RP-HPLC (acetonitril a 50 mM-HCOONH ₄ , pH 3)	APCI-MS	8
Morfin-6-glukuronid, 6-monoacetylmorfin, kodein, diethylamid kyseliny lysergové, methylenedioxyamfetamin	plazma	LLE ^b	RP-HPLC (acetonitril a 50 mM-HCOONH ₄ , pH 3)	ESI/APCI-MS	9
Morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid, ethylamid kyseliny lysergové, metabolity kokainu	plazma	LLE ^b	HPLC (org. fáze: různá konc. methanolu nebo acetonitrilu a pufru: různá konc. kyseliny octové, mravenčí, octanu amonného a mravenčanu amonného)	ESI-MS	10
Hydromorfon, hydromorfon-3-glukuronid, hydromorfon-6-glukuronid	plazma	LLE ^b	NP-HPLC (acetonitril : voda : kyselina mravenčí, 80:20:1, v/v/v)	ESI-MS ²	13
Morfin, kodein, amfetaminy, kokain, benzoylkegonin	sliny	SPE ^a	RP-HPLC (voda a methanol s mravenčanu amonným (10 mmol.l ⁻¹ , pH 5))	ESI-MS ²	14
Opiáty, methadon a jeho metabolity	sliny	vysrážení proteinů: acetonitril	RP-HPLC (10 mM mravenčanu amonný ve vodě, 0,001% kyselina mravenčí (pH 4,5) a acetonitril)	APCI-MS ²	15
Morfin, morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid	sérum	SPE ^a	RP-HPLC (acetonitril - mravenčanu amonný, 6:94, v/v s 1% kyselina mravenčí)	ESI-MS ²	16
Morfin, morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid	plazma	SPE ^a	RP-HPLC (voda : org. fáze, s 1% (v/v) kyselina mravenčí a 0,01% (v/v) kyselina trifluoroctová)	ESI-MS ²	17
Morfin, benzoylkegonin, kodein, strychnin, ethylmorfin, nalorfin, kokain, diazepam, methadon, oxazepam aj.	moč	SPE ^a , LLE ^b	RP-HPLC (voda - methanol - acetonitril s octanem amonným, 5 mmol.l ⁻¹ , gradient)	ESI-MS ²	19
Morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid, kodein, kodein-glukuronid, 6-monoacetylmorfin	krev	SPE ^a	RP-HPLC (1 mM-HCOONH ₄ (pH 3) - acetonitril, gradient)	ESI-MS ²	21
Morfin, morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid, kodein, kokain, 6-monoacetylmorfin, benzoylkegonin	sřevní obsah	SPE ^a	RP-HPLC (1% CH ₃ COOH - acetonitril, gradient)	ESI-MS	22
Kodein, kodein-6-glukuronid, dihydrokodein, dihydrokodein-6-glukuronid, morfin, morfin-3-glukuronid, ethylmorfin	moč	SPE ^a	CE (octan amonný, 25 mmol.l ⁻¹ , pH 9, upraveno 1 M-NH ₃)	ESI-MS ² , MS ³	23
Morfin, morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid, kodein, kodein-6-glukuronid, 6-monoacetylmorfin, dihydrokodein, methadon	moč	SPE ^a , LLE ^b	CE (25 mmol.l ⁻¹ octan amonný a NH ₃ , pH 9)	ESI-MS ² , MS ³	24
Dihydrokodein, nordihydrokodein, dihydromorfin, nordihydromorfin, kodein, normorfin, norkodein, morfin	moč	SPE ^a , LLE ^b	CE (25 mmol.l ⁻¹ octan amonný a 1 M-NH ₃ , pH 9)	ESI-MS ² , MS ³	25

^aSPE – extrakce tuhou fází, ^bLLE – extrakce v systému kapalina-kapalina

4. Závěr

V rutinních laboratořích zabývajících se analýzou morfinu a příbuzných látek má stále významné postavení plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Mají-li se stát významnějšími alternativami separace v kapalně fázi spojené s hmotnostní spektrometrií pomocí ionizace za atmosférického tlaku, musí být dořešeny především otázky reprodukovatelnosti hmotnostních spekter získávaných kolizí indukovanou disociací protonovaných molekul. Úspěšné řešení by nebylo prospěšné pouze pro oblast analýzy opiátů, ale mělo by dopad všude tam, kde by bylo užitečné porovnávat naměřená spektra se spektry v databázi. Usilují o něj jak výzkumné laboratoře, tak výrobci přístrojů (např. ve snaze docílit srovnatelnosti spekter na stejném typu přístroje v různých laboratořích^{28,29}). Vyřešení tohoto problému by dovolilo plně využít předností separačních technik v kapalně fázi, které oproti plynové chromatografii jsou příhodnější pro analýzu velmi polárních nebo termolabilních látek. Z literatury je zřejmé, že v souvislosti s analýzou opiátů bylo HPLC-MS věnováno mnohem více pozornosti než CE-MS. Dnes lze totiž spojení HPLC-MS považovat za technicky dobře zvládnuté a vhodné k rutinním aplikacím. Metoda CE-MS vyžaduje obezřetnější přístup při svém použití a její robustnost je menší. U obou technik lze očekávat další pronikání do analytických laboratoří a jejich uplatnění při doposud obtížně řešitelných úkolech. I přes použití těchto sofistikovaných technik by však neměly být opomíjeny ostatní stupně analytického postupu, jakým je například úprava vzorku. Ta může být rozhodující pro úspěch analýzy i při nasazení HPLC-MS nebo CE-MS.

Práce vznikla za podpory MŠMT ČR (grant MSM 153100013).

LITERATURA

1. Drummer O. H., Odell M.: *The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*. Arnold, London 2001.
2. Niessen W. M. A.: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker, Basel 1999.
3. Holčapek M., Jandera M.: Chem. Listy 92, 278 (1998).
4. Pichini S., Altieri I., Pellegrini M., Zuccaro P., Pacifici R.: Mass Spectrom. Rev. 18, 119 (1999).
5. Marquet P., Lachâtre G.: J. Chromatogr., B 733, 93 (1999).
6. Dams R., Benijts T., Günther W., Lambert W., De Leenheer A.: Anal. Chem. 74, 3206 (2002).
7. Dams R., Benijts T., Günther W., Lambert W., De Leenheer A.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 1072 (2002).
8. Bogusz M. J.: J. Chromatogr., B 748, 3 (2000).
9. Bogusz M. J., Maier R. D., Krüger K. D., Webb K. S., Romeril J., Miller M. L.: J. Chromatogr., A 844, 409 (1999).
10. Lips A. G. A. M., Lameijer W., Fokkens R. H., Nibbering N. M. M.: J. Chromatogr., B 759, 191 (2001).
11. Pihlainen K., Sippola E., Kostianen R.: J. Chromatogr., A 994, 93 (2003).
12. Cailleux A., Le Bouil A., Auger B., Bonsergent G., Turcant A., Allain P.: J. Anal. Toxicol. 23, 620 (1999).
13. Naidong W., Jiang X., Newland K., Coe R., Lin P., Lee J.: J. Pharm. Biomed. Anal. 23, 697 (2000).
14. Mortier K. A., Maudens K. E., Lambert W. E., Clauwaert K. M., Van Bocxlaer J. F., Deforce D. L., Van Peteghem C. H., De Leenheer A. P.: J. Chromatogr., B 779, 321 (2002).
15. Dams R., Murphy C. M., Choo R. E., Lambert W. E., De Leenheer A. P., Huestis M. A.: Anal. Chem. 75, 798 (2003).
16. Blanchet M., Bru G., Guerret M., Bromet-Petit M., Bromet N.: J. Chromatogr., A 854, 93 (1999).
17. Shou W. Z., Pelzer M., Addison T., Jiang X., Naidong W.: J. Pharm. Biomed. Anal. 27, 143 (2002).
18. Fitzgerald R. L., Rivera J. D., Herold D. A.: Clin. Chem. 45, 1224 (1999).
19. Decaestecker T. N., Coopman E. M., Van Peteghem C. H., Van Bocxlaer J. F.: J. Chromatogr., B 789, 19 (2003).
20. Bogusz M. J., Maier R. D., Krüger K. D., Kohls U.: J. Anal. Toxicol. 22, 549 (1998).
21. Dienes-Nagy A., Rivier L., Giroud Ch., Augsburg M., Mangin P.: J. Chromatogr., A 854, 109 (1999).
22. Pichini S., Pacifici R., Pellegrini M., Marchei E., Pérez-Alarcón E., Puig C., Vall O., García-Algar O.: J. Chromatogr., B 794, 281 (2003).
23. Wey A. B., Čáslavská J., Thormann W.: J. Chromatogr., A 895, 133 (2000).
24. Wey A. B., Thormann W.: J. Chromatogr., A 916, 225 (2001).
25. Wey A. B., Thormann W.: J. Chromatogr., A 924, 507 (2001).
26. Tsai J. L., Wu W. S., Lee H. H.: Electrophoresis 21, 1580 (2000).
27. Wey A. B., Thormann W.: J. Chromatogr., B 770, 191 (2002).
28. Lopez L. L., Tiller P. R., Senko M. W., Schwartz J. C.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 663 (1999).
29. Brombacher S., Volmer D. A.: J. Mass Spectrom. 38, 687 (2003).

M. Smetková^a, P. Ondra^b and K. Lemr^a
^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc ^bInstitute of Forensic Medicine, Faculty Hospital, Czech Republic): **HPLC-MS and CE-MS with Atmospheric Pressure Ionization in Analysis of Morphine and Related Compounds**

The review refers to the selected literature published since 1998 that concerns analysis of morphine and related compounds by liquid chromatography or capillary electrophoresis with mass spectrometry. The cited papers describe application of HPLC/MS and CE/MS in analysis of

opiates but also discuss usefulness of various atmospheric pressure ionization sources (electrospray, atmospheric pressure chemical ionization and sonic spray) as well as the influence of experimental parameters on ionization efficiency of these sources. The reproducibility of mass

spectra obtained using collision-induced dissociation is also an important topic. The reproducibility is essential for HPLC-MS to become an alternative to routine and widespread GC-MS. In comparison with HPLC-MS, CE-MS is less robust and so far has been less frequently used.

The 2004 Younger European Chemists' Conference

25 to 29 August 2004

at Villa Gualino, Torino, Italy

and in association with
Società Chimica Italiana, Royal Society of Chemistry and Università degli Studi di Torino

Keynote Talks: Professor Richard R. Ernst (Nobel Laureate); Professor Leiv K. Sydnes (IUPAC)

Competition for and Award of the Europa Medal and €1,000 Prize for Europe's Top Young Chemist, and Runner-Up Awards

Scope of Conference: From fundamental molecular-level chemistry right through to large-scale chemical processing technology and for younger chemists (approx. 21 to 35 years)
Posters and Short Talks

Details: At website <http://www.setforeurope.org> or <http://www.s-f-e.org> and at navigation box **Torino 2004**. Application solely by electronic means at **Electronic Submission**

Deadline for Applications: Friday, 25 June 2004

Contact: Dr Eric Wharton, Director and Co-ordinator: SET for EUROPE/CHEMISTRY 2004, Place Cottage, 1 The Green, Chilton, Didcot, OXON OX 11 OSD United Kingdom,
E: ericw@setforeurope.org or ew@s-f-e.org