



# Zastosowanie analizatorów czasu przelotu w kryminalistyce

Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński\*

Analizy chromatograficzne wykonywane w laboratoriach kryminalistycznych należą do jednych z najtrudniejszych z powodu bardzo skomplikowanej matrycy, którą bardzo często stanowią płyny ustrojowe, materiał ludzki w postaci tkanki oraz w wyniku trudnego do ustalenia składu próbki, np. biały proszek niewiadomego pochodzenia. W związku z tym przeprowadzane są tzw. analizy nieukierunkowane, które mają na celu określenie możliwie największej ilości składników w próbce, nawet tych występujących na śladowym poziomie stężeń. Wszystkie badania muszą być wykonywane rzetelnie i z dużą dokładnością, ponieważ od ich wyniku zależy np. dalsze postępowanie karne. Istotny jest też czas prowadzenia analiz, który powinien być skrócony do minimum, ale z zachowaniem wszystkich procedur związanych z przechowywaniem próbki, jej przygotowaniem, aż po wnioskowanie dotyczące otrzymanych wyników. Dlatego dużym wyzwaniem jest opracowanie szybkiej i kompleksowej metody oznaczania wszystkich substancji w próbce. Dąży się również do tego, aby metody przygotowania próbek były jak najmniej skomplikowane a przy tym

szybkie i tanie. Dodatkowym atutem jest możliwość pełnej automatyzacji procesu przygotowania i podawania próbek do chromatografu.

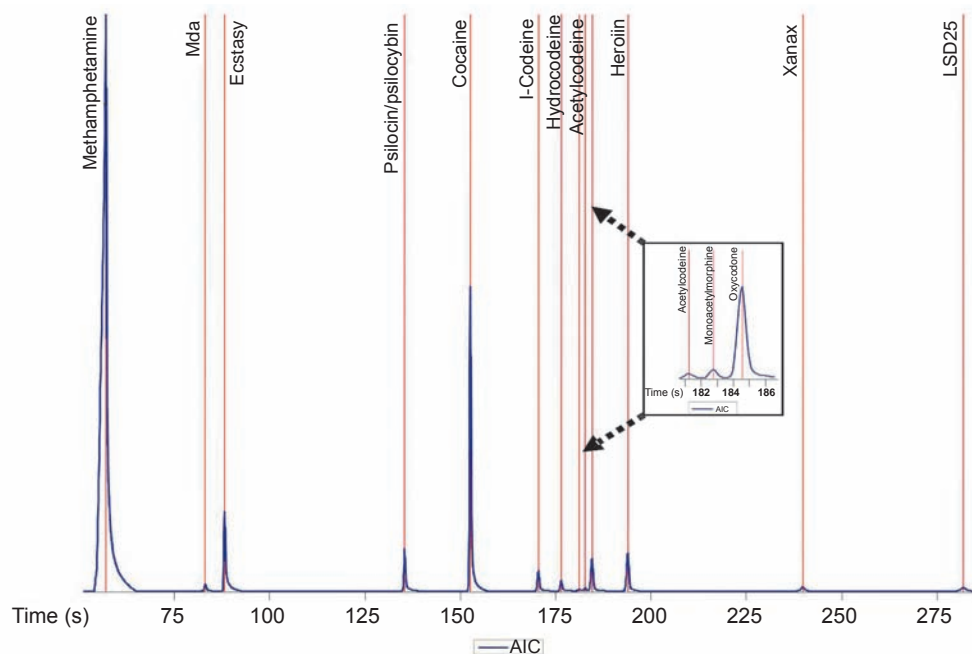
Najpopularniejszymi metodami stosowanymi w analizach toksykologicznych są techniki sprzężone, najczęściej jest to chromatografia gazowa (GC) lub cieczowa (LC) połączona ze spektrometrią mas (MS) [1]. Coraz częściej w laboratoriach spotyka się układy tandemowe (MSMS, MS<sup>n</sup>), które pozwalają na jednoznaczną identyfikację analitów na podstawie widm masowych jonów fragmentacyjnych utworzonych w wyniku fragmentacji określonego jonu macierzystego (ang. parent ion) np. jonu molekularnego. Jednakże technika ta przeznaczona jest wyłącznie do analiz ukierunkowanych, w celu analizowania substancji o znanej masie cząsteczkowej. Takie tandemowe sprzężenie spektrometrii mas z chromatografią gazową zostało wykorzystane w laboratorium kryminalistycznym do oznaczenia kilkunastu różnych środków wybuchowych, głównie pochodnych nitroloenu [2].

Bardzo rozpowszechnioną metodą badawczą w laboratoriach kryminalistycznych jest połączenie GC/MS wykorzy-

stujące analizatory kwadru-polowe (ang. quadrupole, Q). Analizatory kwadru-polowe są popularne przede wszystkim ze względu na niską cenę, ich stosowanie pozwala na wykonywanie zarówno analiz jakościowych jak i ilościowych, a dzięki wykorzystaniu trybu rejestrowania wybranych jonów (ang. selected ion monitoring, SIM) można zwiększyć czułość aparatu. Jest to jednak analizator skanujący, przez co jego szybkość akwizycji danych jest niska, co powoduje zmianę wyglądu widm masowych rejestrowanych w ciągu pików chromatograficznego. W takim przypadku korzystniejsze jest stosowanie analizatora czasu przelotu (TOF), który jest analizatorem nieskanującym, charakteryzującym się dużą szybkością rejestrowania danych (do 500 pełnych widm masowych w ciągu sekundy), dzięki czemu możliwe jest wykorzystanie dekonwolucji oraz automatycznego wyszukiwania pików [3]. Wymienione opcje dotyczą oprogramowania i stanowią doskonałe narzędzie pracy, które skraca i znacznie ułatwia proces przetwarzania i obróbki otrzymanych danych. Dlatego też analizatory TOF obecnie cieszą się coraz większą popularnością i są

stosowane w wielu gałęziach przemysłu, np. w przemyśle petrochemicznym do oceny składu chemicznego produkowanej benzyny, w ochronie środowiska do oszacowania stopnia zanieczyszczenia gleby, powietrza i wody. Stosuje się je w przemyśle spożywczym do badania składu surowców i produktów żywnościowych, w celu wykrycia substancji szkodliwych jak, np. środki ochrony roślin, których liczba stale rośnie. Coraz częściej wykorzystuje się je również w kryminalistyce do analizy źródła pochodzenia narkotyków na podstawie składu zawartych w nich zanieczyszczeń lub też obecności środków odurzających w płynach ustrojowych. Pojawia się także konieczność ciągłego ulepszania aparatury analitycznej w celu wykrycia coraz to nowszych substancji uzależniających występujących w postaci czystej lub też materiale biologicznym często na śladowym poziomie stężeń.

W odniesieniu do łatwości określenia warunków rozdzielania oraz identyfikacji analitów, szybkości wykonywania analiz, rzetelności i powtarzalności otrzymanych wyników znakomitym rozwiązaniem wydają się być stosowanie chromatografii



Rys. 1. Chromatogram GC/TOF-MS mieszaniny 12 narkotyków i acetylokodeiny rozdzielonych w ciągu niespełna 5 minut. Na zbliżeniu zaprezentowano 3 koelujące piki acetylokodeiny, monoacetylmorfiny i oksytocyny [4]

gazowej sprężonej ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu (GC/TOF-MS) w celu prowadzenia analiz ukierunkowanych i nieukierunkowanych w laboratoriach kryminalistycznych. W literaturze specjalistycznej opublikowanych zostało wiele sposobów szybkiego wykrywania narkotyków. Jednym z nich było zastosowanie układu GC/TOF-MS (Pegasus HT) o dużej przepustowości do wykrywania nielegalnych substancji w laboratorium kryminalistycznym, bez ich wcześniejszej derywatywacji [4]. Próbkę do badań przygotowano przez rozpuszczenie mieszaniny środków odurzających w metanolu. Dokonano rozdzielania 12 różnych narkotyków należących do czterech różnych klas substancji chemicznych w ciągu

4.9 minuty. Chromatogram analizy narkotyków i acetylokodeiny (zanieczyszczenia heroiny) zaprezentowano na rysunku 1. Do obróbki danych wykorzystano oprogramowanie ChromaTOF™. Efektywna identyfikacja analitów była możliwa dzięki dużej szybkości akwizycji danych układu GC/TOF-MS i rejestracji pełnych widm masowych z zachowaniem ciągłości spektralnej, które dostarczają jednoznacznej informacji na temat analizowanych substancji. Do obróbki uzyskanych danych wykorzystano funkcje dekonwolucji (**True Signal Deconvolution®**) i automatycznego wyszukiwania pików na podstawie widm masowych (**Automated Peak Find®**). Identyfikacja analitów została wykonana automatycznie, a tożsamość narko-

tyków potwierdzona poprzez porównanie z biblioteką widm masowych NIST. Podobieństwo uzyskanych widm masowych analitów z biblioteką widm wynosiło od 870 do 999. Dzięki dużej szybkości akwizycji danych, analizatory TOF z powodzeniem mogą być wykorzystywane w układach dwuwymiarowych. Taki sys-

Tabela 1. Poziomy wykrywalności poszczególnych narkotyków w moczu analizowane techniką SPME-GCxGC/TOF-MS [5]

Nazwa	Stężenie [ng/mL]	Podobieństwo z biblioteką NIST 05
Metamfetamina	0,212	820
Ekstazy	0,145	917
Kokaina	0,038	909
Kodeina	0,065	948
Oksykodon	0,277	926
Heroina	0,082	920
LSD 25	9,830	796

tem GCxGC/TOF-MS o nazwie Pegasus 4D zastosowano do wykrywania śladowych ilości narkotyków i ich pochodnych [5]. Do załadowania analitów wykorzystano mikroekstrakcję do fazy stałej (ang. solid phase microextraction, SPME). Przeprowadzono analizę SPME-GCxGC/TOF-MS substancji uzależniających w moczu, bez derywatywacji oznaczanych substancji. Metamfetamina, kokaina, diacetylmorfina, kodeina, oksykodon, ekstazy, acetylokodeina, monoacetylmorfina, hydrokodon oraz LSD zostały automatycznie zidentyfikowane przez porównanie z biblioteką NIST. W wyniku analizy chromatograficznej wykryto dziesięć różnych narkotyków i ich metabolitów w moczu. W tabeli 1 zamieszczono poziomy wykrywalności oraz podobieństwo widm masowych z biblioteką NIST sześciu narkotyków. Badanie to wykazało, że zastosowanie Pegasus'a 4D umożliwia doskonale chromatograficzne rozdzielanie wszystkich substancji w próbce moczu, zaś zastosowanie oprogramowania ChromaTOF™ z funkcją True



Signal Deconvolution® ich identyfikację bez stosowania czasochłonnej derywatywacji. W próbce moczu do badań (zawierającej narkotyki i ich metabolity) metodą SPME-GCxGC/TOF-MS zidentyfikowano ponad 9000 różnych związków chemicznych przy założonym stosunku poziomu sygnału do szumu (S/N) 50. Fakt ten świadczy o złożoności tego typu próbek, dużej trudności ich chromatograficznej analizy oraz interpretacji uzyskanych danych. Jednakże stosowanie układu dwuwymiarowego, który posiada znacznie większą pojemność pikową niż układ jednowymiarowy, pozwala na bardzo dobre rozdzielanie analitów i łatwiejszą interpretację chromatogramów. Stosowanie układów 2D powoduje, że nie ma konieczności stosowania kosztownych i pracochłonnych metod przygotowania próbki w analizie złożonych mieszanin. Dwuwymiarowy chromatogram mieszaniny narkotyków w moczu przedstawiono na rysunku 2.

Grupa badawcza pod przewodnictwem S.M. Song'a dokonała rozdzielania oraz identyfikacji 78 nielegalnych substancji w krwi za pomocą GCxGC/TOF-MS [6]. Badania te potwierdzają ogromne możliwości układów dwuwymiarowych sprzężonych ze spektrometrami mas. Widoczne jest tu wzajemne uzupełnianie się zwiększonej pojemności pikowej układu 2D i dużej szybkości akwizycji danych przez analizatory TOF z możliwością automatycznej identyfikacji analitów.

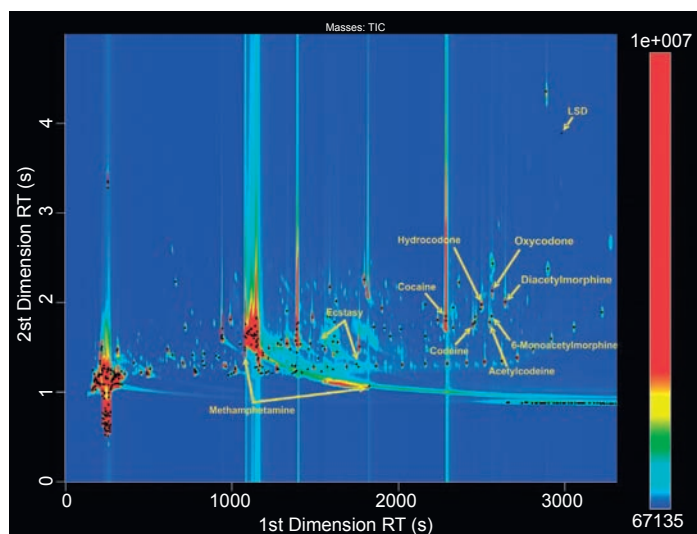
W laboratorium kryminalistycznym wykonuje się również badania autentyczności banknotów na podstawie składu fazy nadpowierzchniowej (ang. headspace, HS) tuszu stosowanego do druku banknotów. Przeprowadzono taki eksperyment z wykorzystaniem Pegasus'a 4D stosując mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) jako metodę przygotowania próbki [7]. W fazie nadpowierzchniowej banknotu zidentyfikowano ponad 300 różnych związków organicznych (ang. volatile organic compounds, VOCs) w ciągu 27 minut trwania analizy. Wykorzystano tu funkcję grupowania **Peak Grouping®** (klasyfikacji) zidentyfikowanych substancji należących do tej samej grupy związków chemicznych poprzez zaznaczenie na chromatogramie obszaru, z którego piki mają zostać pogrupowane. Takie grupowanie wizualnie znacznie ułatwia interpretację chromatogramów (patrz rysunek 3).

W celu przeprowadzenia dalszej klasyfikacji związków zastosowano opcję **Mass Spectral Scripts®**, za pomocą której spośród wszystkich zidentyfikowanych związków chemicznych, wytypowane zostały wszystkie alkohole zidentyfikowane w próbce. Wynik takiej klasyfikacji otrzymuje się w postaci tabeli zawierającej wszystkie niezbędne lub też określone przez analityka informacje chromatograficzne.

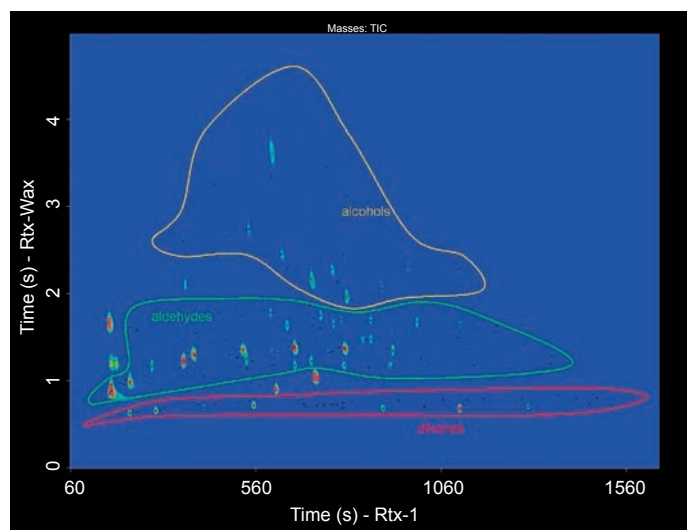
W kanonie analiz kryminalistycznych znajdują się również badania związane z ustaleniem przyczyn zgonu.

Przyczynę nieumyślnej śmierci człowieka lub popełnienia samobójstwa można określić np. badając skład soków żółdkowych. Badania ustalenia przyczyny zgonu przeprowadzono u osoby zmarłej prawdopodobnie w wyniku spożycia środka czyszczącego w gospodarstwach domo-

wych [8]. W tym celu zbadano skład ekstraktu z pobranej treści żołądka oraz skład detergentu. Analizy wykonano przy użyciu Pegasus'a HT (GC/TOF-MS). Zastosowano tu unikalną funkcję oprogramowania ChromaTOF™ - porównywania próbek (**Sample Comparisons®**), która umożliwia automatyczne



Rys. 2. Dwuwymiarowy chromatogram mieszaniny narkotyków i ich metabolitów w próbce moczu wykonany metodą SPME-GCxGC/TOF-MS [5]



Rys. 3. Chromatogram GCxGC obrazujący wykorzystanie funkcji Peak Grouping® dla alkanów, aldehydów i alkoholi zidentyfikowanych w fazie nadpowierzchniowej banknotów. Czarne punkty na chromatogramie, to substancje, które zostały wykryte w zaznaczonych obszarach [7]

Tabela 2. Substancje wytypowane przez oprogramowanie ChromaTOF™ w wyniku stosowania funkcji Sample Comparisons®

Pik	Nazwa	Czas retencji [s]	Podobieństwo z NIST	Zmierzona masa
41	benzaldehyd	378,05	730	106
46	alkohol benzylowy	402,35	859	108
50	1,1'-oksybis-2-propanol	431,35	943	89
58	glikol dipropylenowy	469,20	793	59
65	naftalen	517,40	880	128
66	ester benzylowy kwasu octowego	522,75	773	108
87	piperonal (aldehyd 3,4-metylenodioksybenzoesowy)	663,35	591	149
100	α-izometylojonon	751,00	653	135
103	lilial (3-(4-tert-butylofenylo)-2-metylopropanal)	765,00	781	189
104	2H-1-benzopiran-2-on	768,20	842	118
122	mirystynian izopropylu	895,10	769	228
178	trans-farnesol	1260,20	854	69

porównanie chromatogramów w celu wyszukania różnic w całkowitym prądzie jonowym (ang. total ion current, TIC), znajdujących się nawet poniżej linii bazowej. Wynikiem zastosowania opcji porównania składu próbek, jest tabela, w której znajdują się wszystkie substancje wspólne lub różniące (w zależności od ustawień użytkownika) dwie grupy badanych próbek. Przeprowadzone badanie wykazało obecność 12 substancji w żołądku, które pochodziły ze środka czyszczącego (patrz Tabela 2). Wynik badania potwierdził podejrzenie, że zgon badanej osoby nastąpił w wyniku spożycia detergentu.

Stosowanie w laboratorium kryminalistycznym chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu (Pegasus HT i Pegasus 4D)

umożliwia szybkie i wydajne prowadzenie analiz, między innymi poprzez wyeliminowanie skomplikowanego procesu przygotowania próbki. Dzięki takim systemom wyposażonym w oprogramowanie ChromaTOF™, identyfikacja substancji oraz przetwarzanie danych wykonywane są automatycznie i nie stanowią problemu nawet w przypadku bardzo złożonych mieszanin.

#### Literatura

- [1] Huestis, M. A.; Smith, M. L., Modern analytical technologies for the detection of drug abuse and doping. *Drug Discovery Today: Technologies* 2006, 3, 49-57
- [2] Perr, J. M.; Furton, K. G.; Almirall, J. R., Gas chromatography positive chemical ionization and tandem mass spectrometry for the analysis of organic high explosives. *Talanta* 2005, 67, 430-436

[3] Binkley, J.; Libarondi, M., Comparing the capabilities of time-of-flight and quadrupole mass spectrometers. *Current Trends in Mass Spectrometry* 2010, 1-5

[4] Heim, J.; Binkley, J., Rapid Drug Screening Method by GC-TOFMS Analysis with the Pegasus HT for 12 Drugs of Abuse in Under 5 Minutes. *LECO Application Notes No. 203-821-350* 2008, 6/08

[5] Heim, J., Forensic Toxicology Analysis of Non-derivatized Drugs in Urine by Automated Solid Phase Microextraction (SPME) GCxGC-TOFMS. *LECO Application Notes No. 203-821-357* 2008, 12/08

[6] Song, S. M.; Marriott, P.; Kotsos, A.; Drummer, O. H.; Wynne, P., Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) for drug screening and confirmation. *Forensic*

*Science International* 2004, 143, 87-101

[7] LECO Corporation, Analysis of Currency with SPME and GCxGC-TOFMS-Advanced Data Processing with Classifications. *LECO Application Notes No. 203-821-285* 2008, 2/08

[8] LECO Corporation, The Compare Feature of ChromaTOF – Its Use in Forensic Chemistry to Assist with the Determination of the Cause of Death. *LECO Application Notes No. 203-821-256* 2008, 4/08

\* Agnieszka Ulanowska, Grzegorz Strączyński; LECO Polska Sp. z o.o., Tychy, e-mail: leco@leco.com.pl

