

## Doping a fyzika

Jana Rybníčková\*, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Jak spolu souvisejí dvě zdánlivě nesourodá témata, uvedená v názvu tohoto článku? Fyziku, ač to někteří nefyzikové popírají, je možné najít v pozadí téměř jakéhokoliv lidského konání. Již roku 1972, ve kterém se konaly olympijské hry v Mnichově, bylo při antidopingových testech poprvé použito plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru, dvou složitých přístrojů, pracujících na poměrně jednoduchých fyzikálních principech, a od té doby „díky hmotnostní spektroskopii již nejedna olympijská medaile změnila svého majitele“ [4]. Dodejme, že i plynová chromatografie měla na tomto stěhování medailí lví podíl.

Chceme-li hovořit o dopingu, pokusme se nejprve tento pojem řádně definovat. Podle Mezinárodního olympijského výboru je doping „použití substancí ze skupiny zakázaných účinných látek a aplikace zakázaných metod ...“ [2]. Aktuální seznamy zakázaných látek a metod je možné najít na stránkách Mezinárodní antidopingové agentury [1] včetně rozdělení látek na jednotlivé skupiny a stručného popisu jejich pozitivního i negativního působení na lidský organismus (podobný komentář je připojen i k seznamu zakázaných metod). Na stránkách Institutu pro biochemii [2] lze najít i podrobný postup antidopingové kontroly a pravidla, podle nichž se postupuje, má-li být uznán dopingový nález jako pozitivní. V tomto článku nebudeme rozebírat medicínské a etické aspekty dopingu, ale soustředíme se na fyzikální metody, které se používají k odhalování přítomnosti zakázaných substancí ve vzorku a vysvětlíme si fyzikální principy základních přístrojů, používaných při analýze vzorku při antidopingové kontrole.

### PLYNOVÝ CHROMATOGRAF

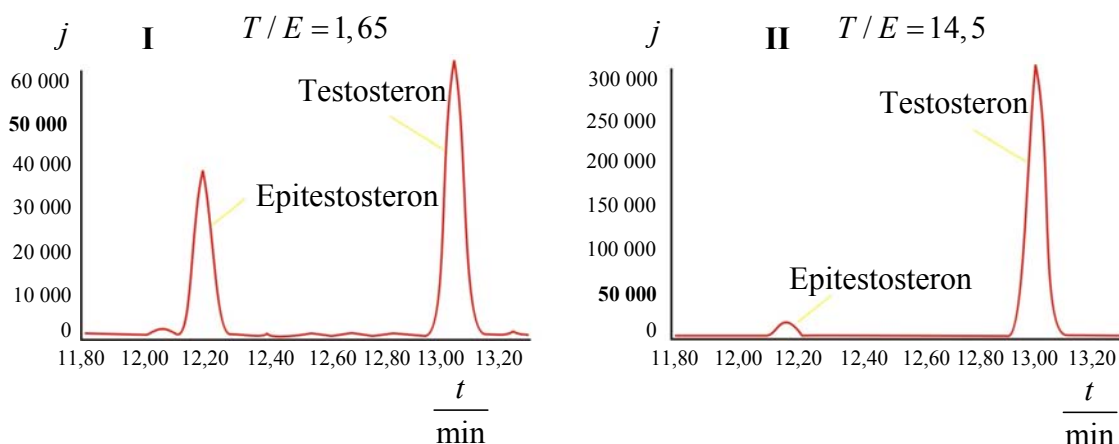
Tento přístroj je jedním ze zařízení, která se používají k dělení směsí látek. Principem chromatografie je „oddělení složek analyzované směsi na základě jejich rozdílné afinity k tzv. stacionární a mobilní fázi“ [3]. Příkladem chromatografické metody, který se již jistě každému z nás zdařilo nechtěně realizovat, je rozlité džusu či ještě lépe červeného vína na bílý látkový ubrus. Při bližším pozorování ubrusu zjistíme, že ubrus je mokrá i v místech, kde již není červeně zabarven – vlákna ubrusu fungovala jako stacionární fáze, voda obsažená ve víně se stala mobilní fází, která unášela červená barviva, a díky kapilárním jevům došlo k separaci jednotlivých barviv a ta se vyloučila na různých místech ubrusu.

U plynového chromatografu (GC – gas chromatograph (angl.)) dochází k separaci na základě rozdílné difúze složek vzorku do mobilní a stacionární fáze, ale může zde docházet i k jiným jevům: adsorpci, extrakci či elektrostatické interakci mezi vzorkem a fází. Separací proces probíhá v tzv. koloně – asi deset metrů dlouhé křemíkové kapiláře o vnitřním průměru 0,2 mm, potažené zevnitř i zvenku polymerem, který se při pracovní teplotě chromatografu (180 °C–250 °C) stává kapalným a slouží jako stacionární fáze. Mobilní fází je helium, které je poměrně lehké, nehořlavé, chemicky inertní a dá se získat velice čisté. Na začátek kolony se pomocí speciálního zařízení vstříkne vzorek analyzované látky a po dobu dvaceti až třiceti minut (rychlost průtoku mobilní fáze se vzorkem kolonou je  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) provádí zařízení připojené za kolonu analýzu separovaných složek vzorku. K analýze lze kromě hmotnostního spektrometru použít například i diferenční refraktometr, jehož princip je popsán v [3]. Nejdůležitější částí tohoto refraktometru je fotodetektor porovnávací intenzitu světla prošlého kapilárou s čistou mobilní fází a světla prošlého kapilárou s mobilní fází smíšenou se

\*janar@physics.muni.cz

vzorkem. Z těchto hodnot je možné určit jak rozdíl indexů lomu vzorku a čisté mobilní fáze (viz [3]), tak i koncentraci vzorku obsaženého v mobilní fázi.

Výsledky chromatografického měření při dopingové analýze jsou na obrázku 1 – retenční čas  $t_R$ , v němž je koncentrace látky maximální, je charakteristikou látky při daných podmínkách analýzy, totiž při zvoleném tlaku a teplotě. Tímto způsobem dokáže plynová chromatografie rozlišovat izomery, to je molekuly, které mají stejné sumární, ale rozdílné strukturální vzorce. Tyto molekuly mají tedy sice stejnou hmotnost, ale rozdílné optické a chemické vlastnosti, tudíž i rozdílný retenční čas. Na obrázku 1 jsou chromatogramy dvou izomerů hormonu testosteronu, a to testosteronu (T) a epitestosteronu (E). Organismus si dokáže testosteron sám syntetizovat a produkované množství je individuální, proto samotný nálezn testosteronu ve vzorku nelze považovat za doping. Měřeními v zdravé nedopující populaci však bylo zjištěno, že tělo syntetizuje oba izomery, testosteron (T) i epitestosteron (E), přičemž jejich poměr je konstantní ( $T/E = 1,65$ ) – viz vzorek I. Protože organismus nedokáže přeměnit testosteron na epitestosteron a naopak, je jasné, že vzorek II s mnohem vyšším poměrem izomerů ( $T/E = 14,5$ ) patří jedinci, do jehož organismu byl testosteron uměle dodáván jako doping.



Obrázek 1: Výsledky dopingového testu získané pomocí plynového chromatografu – převzato z [2] a upraveno. Obrázek potvrzuje výše uvedené tvrzení, že retenční čas  $t_R$  postačuje k rozlišení obou detekovaných látek. Koncentrace epitestosteronu je ve vzorcích I i II přibližně stejná, menší než 50 000 jednotek (autor obrázku nanáší na svislou osu nikoliv přímo koncentraci, ale rozdíl intenzit světla prošlého čistou mobilní fází a mobilní fází obsahující vzorek, bohužel však neuvádí jednotky, ve kterých měří). Koncentrace (intenzita) testosteronu je v případě II mnohem vyšší než v případě I, o pozitivitě dopingového nálezu však rozhoduje až poměr koncentrací (intenzit) testosteronu a epitestosteronu  $T/E$ .

## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR

Hmotnostní spektrometr (MS – mass spectrometer (angl.)) je přístroj, který určuje hmotnostní spektra zkoumaných látek, čili separuje ionty látek podle poměru hmotnosti  $m$  a náboje  $q$  (celočíslný násobek elementárního náboje  $e = 1,602\,177\,33 \cdot 10^{-19} \text{ C}$  [5]). Je-li náboj iontu znám, dostačuje k určení iontu pouze hmotnost, vyjádřená například jako relativní molekulová (resp. atomová) hmotnost  $M_r = \frac{m}{u}$ , kde  $m$  je hmotnost iontu a  $u = 1,660\,540\,2 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$  [5] je atomová hmotnostní jednotka. Hmotnostní spektrometrie je sice metoda destruktivní, protože při ní často dochází k fragmentaci zkoumaných látek, ale velmi citlivá – při spojení plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru (GC/MS) dokáže toto zařízení detekovat lát-

ku již při koncentraci  $10^{-9} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , při použití spektrometru s vysokým rozlišením při  $10^{-12} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$  [4].

## KONSTRUKCE A FUNKCE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU

Každý hmotnostní spektrometr obsahuje tři základní části: **ionizátor**, v němž dochází k ionizaci, někdy i fragmentaci původně neutrálních molekul zkoumané látky; **analyzátor**, v němž jsou ionty rozděleny podle hmotnosti a rychlosti, se kterou se pohybují, a **detektor**, který detekuje dopadající ionty a určuje intenzitu jednotlivých „čar“ ve spektru (čára odpovídá místu dopadu skupin iontů se stejnou hmotností a hybností).

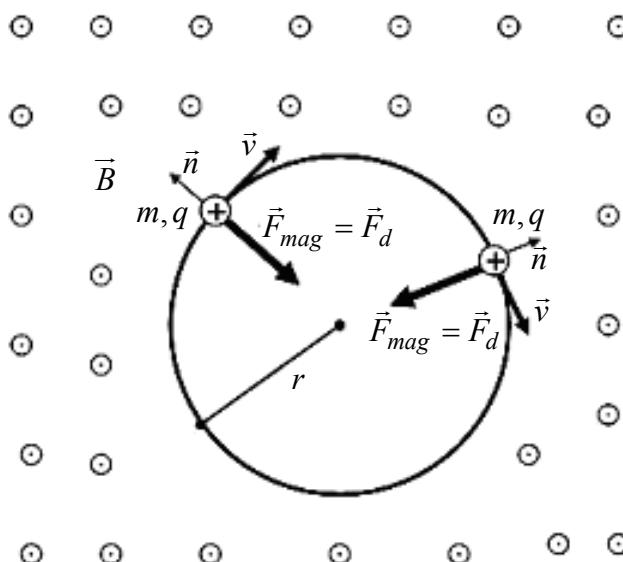
V ionizátoru dochází k odtržení elektronů z molekul při srážce s elektronovým paprskem. Kladné ionty jsou pak odpuzovány kladně nabitou repelentní elektrodou a procházejí mezi urychlovacími a zaostřovacími elektrodami do dalších částí spektrometru. K ionizaci se při spojení s plynovým chromatografem obvykle volí energie 20 eV ( $1 \text{ eV} = 1,60219 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  [5]), neboť při této energii ještě nedochází k ionizaci helia tvořícího mobilní fázi (ionizační energie helia je 24,57 eV [5]). Tím se zajistí, že se mobilní fáze v ionizátoru oddělí a do dalších částí spektrometru již nevstupuje.

Analyzátor využívá nejčastěji působení magnetického pole na nabitou částici. Vlétá-li iont o hmotnosti  $m$  s nábojem  $q$  do magnetického pole o indukci  $\vec{B}$  rychlostí  $\vec{v}$  kolmou na toto pole, pak magnetická síla  $\vec{F}_{mag} = q \cdot (\vec{v} \times \vec{B})$  působící na iont je silou dostředivou

$\vec{F}_d = m \cdot \frac{v^2}{r} \cdot (-\vec{n})$  (viz obrázek 2) a porovnáním předchozích vztahů dostaneme vyjádření pro velikost hybnosti  $p = m \cdot v$  iontu

$$m \cdot v = B \cdot q \cdot r, \quad (1)$$

kde  $r$  je poloměr zakřivení trajektorie iontu o hmotnosti  $m$  a náboji  $q$  v magnetickém poli.



Obrázek 2: Působení magnetického pole o magnetické indukci  $\vec{B}$  na nabitou částici o hmotnosti  $m$  a kladném náboji  $q$ , pohybující se rychlostí  $\vec{v}$  kolmou na směr pole. Velikost rychlosti ani magnetické síly se při pohybu nemění.

Z tohoto vztahu je zřejmé, že při stejné hodnotě magnetické indukce závisí zakřivení trajektorie iontu pouze na jeho hybnosti. Ionty byly urychleny v ionizátoru přiložením napětí  $U$ , získaly tedy kinetickou energii

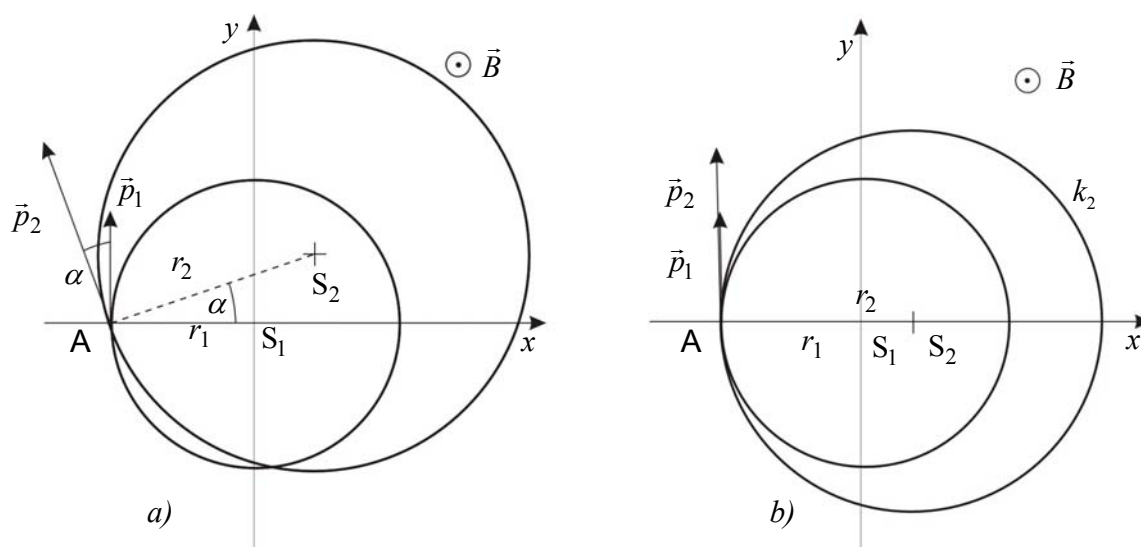
$$q \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v_y^2, \quad (2)$$

kde symbol  $v_y$  označuje průmět rychlosti do směru, ve kterém dochází k urychlení iontů elektrickým polem. Porovnáním rovnic (1) a (2) za předpokladu  $v = v_y$  (iont získal veškerou svou kinetickou energii a hybnost pouze v důsledku urychlení v ionizátoru) obdržíme výraz pro zakřivení  $r$  trajektorie iontu v závislosti na urychlovacím napětí  $U$ , velikosti magnetické indukce  $B$  a na hmotnosti  $m$  a náboji  $q$  iontu

$$r = \sqrt{\frac{2 \cdot m \cdot U}{q \cdot B^2}}. \quad (3)$$

Pokud jsou tedy parametry  $B$  a  $U$  pro spektrometr konstantní, dopadají ionty podle své hmotnosti na různá místa v sadě detektorů.

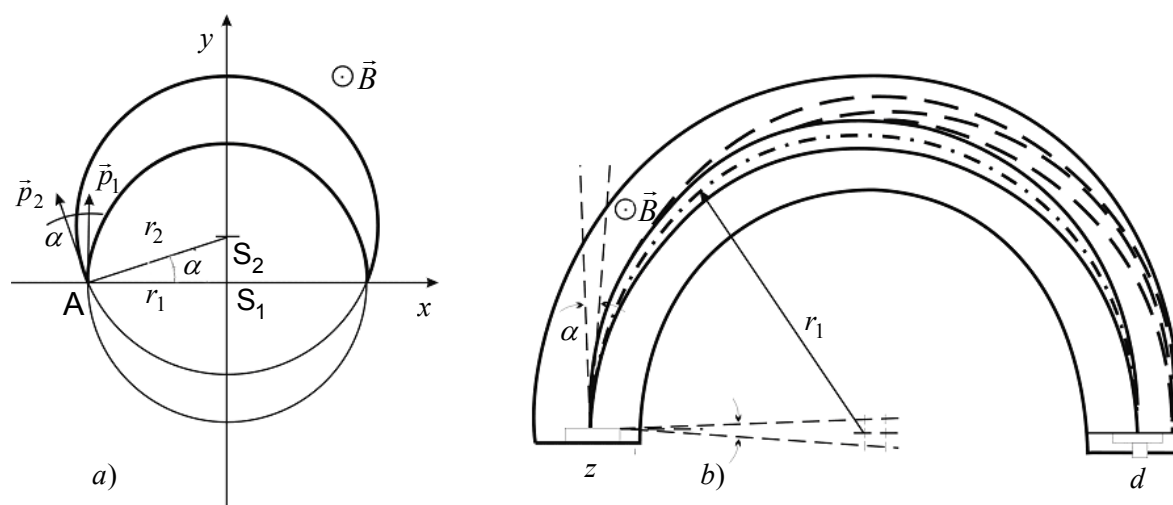
Věnujme se nyní otázce, kam takovouto sadu detektorů vlastně umístit. Podmínka  $v = v_y$  není ve skutečnosti vždy přesně splněna a i v této situaci musí být zajištěno, aby ionty různých hmotností byly separovány (tj. bez ohledu na svoji hybnost dopadaly na různá místa v sadě detektorů) a ionty téže hmotnosti byly fokusovány (tj. bez ohledu na svoji hybnost dopadaly do stejného místa). K vyřešení tohoto problému stačí pomocí jednoduché geometrické úvahy najít druhý průsečík kružnic o poloměrech  $r_1$  a  $r_2$  (daných vztahem (1) platným i při nesplnění podmínky  $v = v_y$ ), které se již protínají v bodě A – viz obrázek 3a). V tomto bodě ionty vstupují do magnetického pole s nenulovým průmětem hybnosti  $p_y = m \cdot v_y$  do směru osy  $y$  (směr, ve kterém byly ionty v ionizátoru urychleny přiložením elektrického pole). Rozložme tuto úlohu do několika kroků.



Obrázek 3: Pohyb dvou iontů v magnetickém poli – a) v obecném případě; b) pokud mají oba ionty stejný směr hybnosti. Situace b) může nastat dvojím způsobem: buď mají ionty stejné hmotnosti a rozdílné rychlosti, anebo stejné rychlosti a rozdílné hmotnosti. První uvedený případ je nežádoucí, ve druhém pak dochází k separaci iontů podle hmotností.

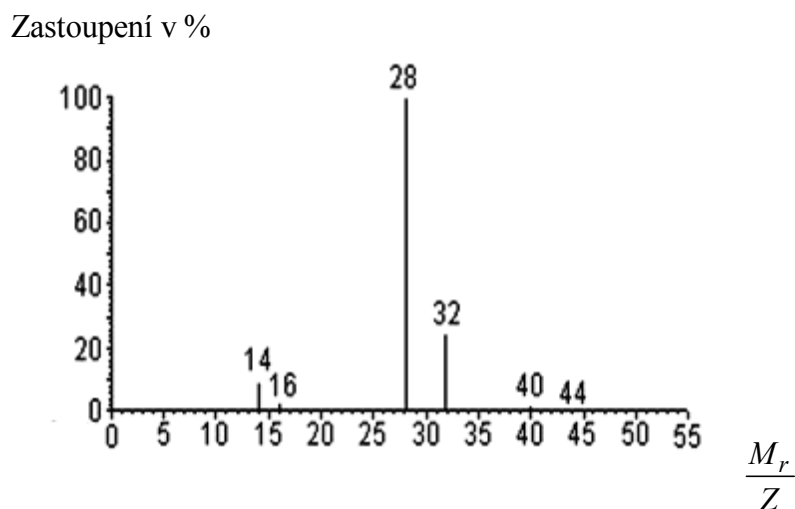
Nejprve uvažujme o situaci, kdy sledujeme dva ionty o různých hmotnostech  $m_1$  a  $m_2$ , které mají hybnosti stejného směru ( $\alpha = 0$ ). V tomto případě kružnice  $k_2$  bude mít střed v bodě  $S_2[r_2 - r_1, 0]$  a obě kružnice nebudou mít kromě bodu A žádný další společný bod – viz obrázek 3b). Detektory by tedy bylo možné umístit na libovolnou přímku procházející bodem A.

Nám však jde o nalezení takového místa pro detektor, v němž se protínají svazky iontů o stejných hmotnostech  $m_1 = m_2 = m$ , jejichž divergence je rovna  $\alpha$ . Pokud platí, že tyto ionty mají v bodě A stejný průmět hybnosti do směru osy  $y$ , čili  $p_1 = p_2 \cdot \cos \alpha$ , leží střed kružnice  $k_2$  na ose  $y$  v bodě  $S_2[0, r_2 \cdot \sin \alpha]$  a obě kružnice se protínají i v bodě  $[r_1, 0]$  – viz obrázek 4a), do nějž dorazí všechny ionty stejné hmotnosti. Sadu detektorů je tedy vhodné umístit na osu  $x$ . Praktická realizace takového detekčního zařízení je na obrázku 4b).



Obrázek 4: Trajektorie svazku iontů v magnetickém poli – a) situace pro ionty stejné hmotnosti mající stejný průmět hybnosti do osy  $y$  – b) realizace analyzátoru se  $180^\circ$  odklonem iontového svazku (převzato z [4]). Vysvětlivky:  $z$  – zdroj iontů,  $\alpha$  – úhel divergence svazku,  $d$  – detektor,  $\vec{B}$  – vektor magnetické indukce,  $r_1$  – poloměr trajektorie iontů o hmotnosti  $m_1$  (trajektorie svazku iontů o hmotnosti  $m_1$  jsou kresleny plnou čarou, trajektorie svazku iontů o hmotnosti  $m_2 \neq m_1$  jsou kresleny čárkovaně). Uspořádání zajišťuje pro ionty se stejným průmětem hybnosti do osy  $y$  jak separaci podle hmotnosti, tak i fokusaci iontů stejné hmotnosti do daného místa na přímce detektorů.

Jako detektor se používá například fotografická deska, častěji však takzvaný Faradayův hrnec, což je elektroda chráněná Faradayovou klecí, nebo fotonásobič. Detektory spolupracují úzce s počítačem, který hmotnostní spektrum upravuje do podoby, v němž se přiřadí nejvíce zastoupenému iontu hodnota 100 % a zastoupení ostatních iontů jsou přepočítány relativně k této hodnotě. Detekce a počítačové zpracování získaných hodnot jsou velmi rychlé – zpoždění signálu v počítači oproti skutečnosti je menší než jedna milisekunda, takže se výsledky analýzy na obrazovce počítače objevují „v reálném čase“. Jednoduchý příklad analýzy pomocí hmotnostního spektrometru je uveden na obrázku 5, na němž je spektrogram vzduchu.



Obrázek 5: Spektrogram vzduchu. Převzato ze [2] a upraveno. Čára 28 s největším zastoupením ve vzorku odpovídá dvouatomové molekule dusíku, čára 32 dvouatomové molekule kyslíku, čáry 40 a 44 argonu a oxidu uhličitému. Výklad čar 14 a 16 může být dvojí – buď se jedná o dvakrát ionizované molekuly kyslíku a dusíku, nebo o jednou ionizované atomy kyslíku a dusíku vzniklé fragmentací. Výška čar udává relativní zastoupení těchto molekul ve vzduchu (vůči dusíku).

## SPEKTROMETR S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM

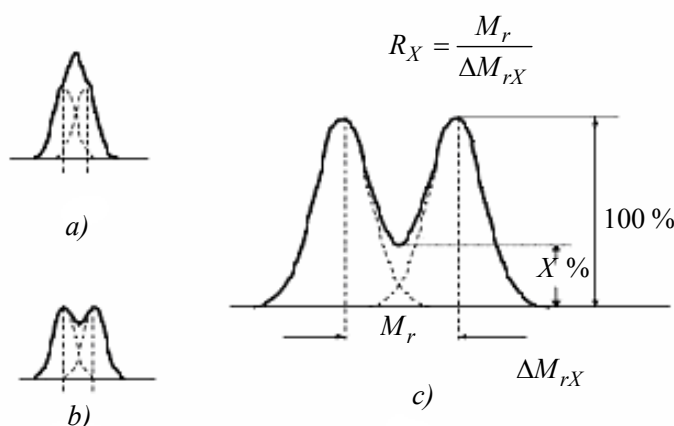
Běžné hmotnostní spektrometry dokáží rozlišit ionty pouze s přesností na jednotky relativní molekulové hmotnosti  $M_r$ . Proto některé skupiny iontů, například  $\text{OD}^+$  s  $M_r = 18,009\ 0$  a  $\text{H}_2\text{O}^+$  s  $M_r = 18,010\ 6$  nebo  $\text{NH}_4^+$  s  $M_r = 18,034\ 4$ , jsou pro běžný spektrometr neodlišitelné (dalšími příklady jsou skupiny iontů  $\text{C}_2\text{H}_6^+$ ,  $\text{CH}_2\text{O}^+$ , či  $\text{CH}_4\text{N}^+$ ). S pomocí takového zařízení dokážeme tedy pouze určit, kolik má zkoumaný iont celkem nukleonů, ale nezjistíme, jaké atomy či molekuly tyto částice tvoří.

Čím je způsobena nedokonalost běžných spektrometrů s nízkým rozlišením? Při popisu separace iontů v magnetickém poli jsme odvodili, že ionty se stejným nábojem a stejnou hybností se pohybují po stejné trajektorii (1). Všechny detekované ionty byly v ionizátoru urychleny stejným napětím, získaly zde tedy stejnou kinetickou energii (2) a ionty s tímž nábojem a hmotností tak získaly i stejnou hybnost. Problém je v tom, že v ionizátoru nebyly před urychlením jednotlivé molekuly v klidu, ale měly různé nenulové rychlosti, získané tepelným pohybem nebo při cestě kolonou plynového chromatografu, a při putování k detektoru hmotnostního spektrometru může ještě docházet k vzájemným srážkám a odpuzování iontů. Proto nemusejí ionty stejné hmotnosti mít stejnou hybnost (přesněji řečeno průmět hybnosti do osy  $y$  – viz obrázek 4a) a příslušný komentář), ale jejich hybnosti se mohou mírně lišit. Zopakujeme, že splnění podmínky stejného průmětu hybností do osy  $y$  bylo nutné pro protnutí trajektorií všech iontů stejné hmotnosti v jediném bodě na ose  $x$ . Jsou-li průměty hybností rozdílné, neprotínají se trajektorie těchto iontů v jediném bodě, ale v několika bodech neležících na ose  $x$ . Detektor umístěný na této ose pak neregistruje ostrou čáru, ale křivku odpovídající rozložení míst dopadu iontů – gaussovskou křivku o určité střední hodnotě a pološířce (šířka křivky odpovídající polovině maximální intenzity).

Zamysleme se, jak velká může být změna průmětu hybnosti do směru osy  $y$  v důsledku výše uvedených vlivů, z nichž nejvýraznější a nejsnáze popsatelný je tepelný pohyb. Podle takzvané-

ho ekvipartičního teorému lze každé molekule přiřadit kinetickou energii  $E_k = \frac{1}{2} \cdot n \cdot k \cdot T$ , kde  $k = 1,380\,658 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$  [5] je Boltzmannova konstanta,  $T$  je termodynamická teplota a  $n$  je počet stupňů volnosti molekuly. Odhadem kinetické energie tepelného pohybu pro libovolnou molekulu vycházející z plynového chromatografu a porovnáním s ionizační energií 20 eV zjistíme, že kinetická energie tepelného pohybu je řádově tisíckrát menší než energie získaná při ionizaci, relativní změna hybnosti v důsledku tepelného pohybu je proto řádu desetin až setin. Pološířka gaussovské křivky pro ionty stejné hmotnosti je tedy poměrně malá, a tak pro ionty, jejichž hmotnosti se liší o jednotky relativní molekulové hmotnosti, nedochází k překrytí gaussovských křivek a lze je snadno rozlišit. Pro ionty uvedené na začátku této kapitoly je situace o něco složitější.

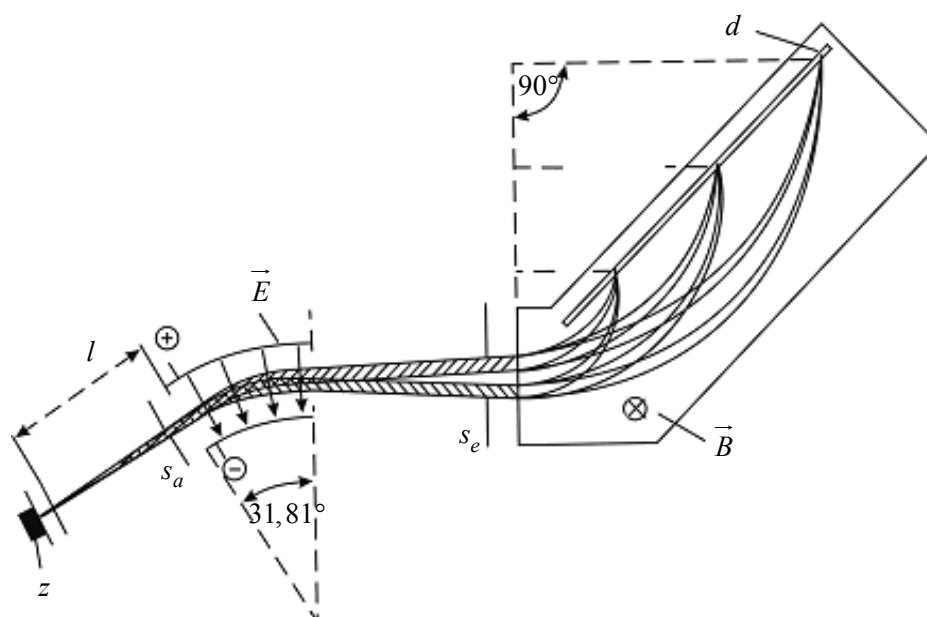
Dva ionty, jejichž relativní molekulové hmotnosti se liší méně než o jednotky relativní molekulové hmotnosti, považujeme za jednoznačně rozlišitelné, pokud společný překryv křivek odpovídajících těmto iontům o stejné intenzitě má výšku  $X\%$  maximální intenzity ( $X$  je určeno konvencí, obvykle se volí  $X = 10$  [4]) – viz obrázek 6.



Obrázek 6: Rozlišovací schopnost hmotnostního spektrometru a) nerozlišitelné ionty b) dva právě rozlišitelné ionty – lze rozeznat, že výsledná křivka vznikla překryvem dvou gaussovských křivek, ale tento překryv je vyšší než překryv dohodnutý konvencí c) pojmy potřebné pro definici rozlišení (převzato z [4] a upraveno).

Relativní molekulovou hmotnost zkoumaných iontů zaokrouhlenou na jednotky označme  $M_r$ , rozdíl relativních molekulových hmotností těchto iontů  $\Delta M_{rX}$ . Rozlišení pak definujeme jako  $R_X = \frac{M_r}{\Delta M_{rX}}$ . Běžné hmotnostní spektrometry (s nízkým rozlišením) jsou schopny rozlišení do pěti set. Určíme-li potřebné rozlišení pro skupiny  $\text{H}_2\text{O}^+$  a  $\text{NH}_4^+$ , získáme  $R_x = 750$ , pro skupiny  $\text{H}_2\text{O}^+$  a  $\text{OD}^+$  je  $R_x = 112\,50$  (viz [4]), pro rozlišení těchto skupin je tedy nutné konstrukci spektrometru upravit.

Jedna z konstrukcí analyzátoru spektrometru s vysokým rozlišením (HRMS – high resolution mass spectrometer (angl.)) je na obrázku 7.



Obrázek 7: Analyzátor hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením v Mattauchově-Herzegově uspořádání (převzato z [4] a upraveno). Jednotlivé symboly označují:  $z$  – iontový zdroj,  $s_a$  – štěrbina vymežující úhel divergence svazků,  $s_e$  – energetická clona,  $\vec{E}$  – pole elektrostatického analyzátoru,  $\vec{B}$  – pole magnetického analyzátoru,  $d$  – detektor.

Ionty, jejichž původně nenulová kinetická energie se v ionizátoru zvětšila o hodnotu úměrnou urychlovacímu napětí  $U$  (2), procházejí nejprve centrálně symetrickým elektrostatickým polem o elektrické intenzitě  $\vec{E}$ , takže elektrická síla  $\vec{F}_e = e \cdot \vec{E}$  působí jako síla dostředivá

$\vec{F}_d = m \cdot \frac{v^2}{R} \cdot (-\vec{n})$ . Trajektorie iontů se v poli zakříví, přičemž poloměr křivosti je

$$R = \frac{1}{E} \cdot \frac{m \cdot v^2}{e}, \quad (4)$$

dojde tedy k separaci iontového svazku podle energií, ionty s nejnižšími a nejvyššími kinetickými energiemi se přitom ocitnou na okrajích svazku. Po opuštění elektrostatického pole je svazku iontů vložena do cesty clona  $s_e$  určité šířky, která ionty s nejnižšími a nejvyššími energiemi odfiltruje. Do magnetického analyzátoru, konstruovaného obdobně jako u spektrometru s nízkým rozlišením, vcházejí proto pouze ionty téměř stejné kinetické energie. Ionty stejné hmotnosti  $m$  mají tedy i stejnou hybnost  $\vec{p}$  a po ohybu v magnetickém poli se zaostří do téhož místa na detektoru (viz obrázek 4 a příslušná diskuze). Na takových zařízeních lze dosáhnout rozlišovací schopnosti 50 000 až 100 000 [4]. Spektrometr s vysokým rozlišením dokáže tedy snadno od sebe odlišit i ionty  $\text{H}_2\text{O}^+$  a  $\text{OD}^+$  nebo ho lze použít pro rozlišování izotopů prvků, například uhlíku  $^{12}_6\text{C}$  a  $^{13}_6\text{C}$ , obsažených v často velmi složitých organických molekulách, pro něž je potřebná rozlišovací schopnosti již mimo možnosti hmotnostního spektrometru s nízkým rozlišením.

Identifikace iontu pomocí spektrometru s vysokým rozlišením je bezesporná, neboť relativní molekulová hmotnost každého iontu je jedinečná, přičemž odlišnosti se objevují obvykle až za desetinou čárkou. Jako příklad uveďme izotopy iontů vodíku  $\text{H}^+$  a  $\text{D}^+$  (následující číselné údaje jsou čerpány z [5]). Relativní atomová hmotnost protonu je 1,007 825, relativní atomová hmotnost neutronu je 1,008 665. Zdálo by se tedy, že relativní atomová hmotnost deuteria musí být rovna součtu relativních atomových hmotností protonu a neutronu, což je 2,016 490, ale ve



skutečnosti je relativní atomová hmotnost deuteria menší, pouze 2,014 100. Vzniklý hmotnostní deficit  $0,002390 \cdot u$  odpovídá jaderné vazebné energii. Obdobně hmotnost iontu molekulárního vodíku  $H_2^{++}$  není dvojnásobkem hmotnosti protonu, čili  $2,015650 \cdot u$ , ale je o  $0,002350 \cdot u$  nižší. K odlišení iontů  $D^+$  a  $H_2^{++}$  tedy musíme použít hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením ( $R_X = 2500$ ). Protože každý nuklid má jiný počet protonů a neutronů a jinou vazebnou energii, jeho přesně určená hmotnost jej jednoznačně identifikuje. Při antidopingových kontrolách se využívá spektrometrů s vysokým rozlišením právě ke konečnému ověření identifikace zkoumaných látek. Nejnovější aplikací spektrometru s vysokým rozlišením upraveného na rozlišování izotopů uhlíku jsou opět testosteronové testy – určením poměru izotopů uhlíku v metabolitech testosteronu lze prokázat, vznikl-li tento hormon v těle, nebo mu byl dodán jako doping [2].

### POSTUP PŘI ANTIDOPINGOVÉM TESTU A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

---

Jak tedy probíhá vlastní antidopingová zkouška? Po odběru vzorku moči sportovce provádí dopingový komisař dva jednoduché testy – určuje hustotu vzorku a jeho kyselost (pH). Pokud tyto výsledky neodpovídají normám, je podezření, že se sportovec pokusil zkoušku zmanipulovat – buď užíváním diuretik dosáhl zředění moči, a tedy i zakázaných látek v ní obsažených, nebo užíváním probenecidu změnil kyselost moči, a tak zabránil vyplavení anabolických steroidů z krve do kontrolovaného vzorku. Výsledky těchto měření mohou být vodítkem při vlastní analýze, prováděné pomocí plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru. Před odesláním do laboratoře rozdělí komisař v přítomnosti sportovce vzorek na dvě části A a B v poměru dvě ku jedné, nádobky uzavře a zapečetí. Nádobka se vzorkem A putuje do laboratoře, vzorek B zůstává uschován pro kontrolní analýzu.

Před vložením do kolony chromatografu se vzorek A nejprve chemicky upravuje (zbavuje tuků), vysouší, popřípadě i jinak čistí či modifikuje. Při průchodu plynovým chromatografem dojde k separaci vzorku na jednotlivé látky, přičemž každá z nich je již identifikována svým retenčním časem (viz obrázek 1). Poté molekuly látek vstupují do hmotnostního spektrometru (s nízkým, dnes však častěji i s vysokým rozlišením), kde je v každém časovém okamžiku získáno jejich spektrum a jsou identifikovány s konečnou platností včetně zastoupení ve vzorku (například viz obrázek 5).

Konkrétní výsledky takovéto dopingové analýzy je možné najít na internetových stránkách [2]. Pokud je nález pozitivní, opakuje se rozbor znovu, přičemž se použije uschovaný vzorek B. Cílem tohoto šetření je potvrdit přítomnost zakázaných látek a upřesnit jejich koncentraci ve vzorku. Proti verdiktu druhé analýzy není většinou odvolání (pokud sportovec neprokáže, že nalezené látky mu byly podány například v rámci lékařského ošetření, přičemž nebyla možná alternativní léčba).

### LITERATURA

---

- [1] <<http://www.wada-ama.org>> *World Anti-Doping Agency* (anglicky).
- [2] <<http://www.dshs-koeln.de/biochemie/index.html>> *Doping-Institut für Biochemie (DSHS Köln)* (německy).
- [3] Doležalová V.: *Chromatografické metody*. Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, Brno 1965.
- [4] Jonas J.: *Hmotnostní spektroskopie*. SPN, Praha 1985.
- [5] Mikulčák J. a kol.: *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. Prometheus, Praha 1995.