

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**Analýza vybraných opioidů voltametrií a HPLC
s elektrochemickou a UV detekcí**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Jan Mádr

Studijní program:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

2024 Olomouc

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Jan Mádr
Název práce: Analýza vybraných opioidů voltametrií a HPLC s elektrochemickou a UV detekcí
Typ práce: Diplomová práce
Pracoviště: Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok odevzdání práce: 2024

Anotace:

Diplomová práce se zabývá vývojem analytických metod vhodných pro zjišťování přítomnosti fentanylu a jeho degradačního produktu norfentanylu ve směsích s dalšími opioidy (kokain, heroin a morfin). Teoretická část je zaměřena na voltametrickou a chromatografickou analýzu uvedených opioidů. V praktické části byly vyvinuty dvě analytické metody pro detekci fentanylu využívající adsorptivní cyklickou square-wave voltametrii (AdsCSWV) na dvou typech komerčních sítotiskových uhlíkových elektrod (typy C110 a 110CNT od firmy Metrohm DropSens). Testována byla opakovatelnost měření (jako relativní směrodatná odchylka) fentanylu (0,1 mmol/l) metodou AdsCSWV na elektrodách stejného typu, která představovala 7-8 % u elektrod typu 110CNT a 21-23 % u elektrod typu C110. Pro obě elektrody byly z regresních kalibračních přímek zjištěny meze detekce a meze stanovitelnosti fentanylu. Metoda AdsCSWV pro C110 elektrody byla úspěšně testována na směsných roztocích fentanylu s heroinem nebo kokainem. V chromatografické části práce byly nalezeny dva separační systémy, využívající CN-kolonu a duální spektrofotometrickou a coulometrickou detekci, vhodné pro analýzu studovaných opioidů.

Klíčová slova: fentanyl, heroin, kokain, opioidová krize, SWV, HPLC
Počet stran: 83
Počet příloh: 10
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Jan Mádr
Title: Analysis of selected opioids by voltammetry and HPLC with electrochemical and UV detection
Type of thesis: Master's thesis
Department: Department of Analytical Chemistry
Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
The year of submission: 2024

Annotation:

The Master's thesis deals with the development of analytical methods suitable for the detection of fentanyl and its degradation product norfentanyl in their mixtures with other opioids (cocaine, heroin and morphine). The theoretical part is focused on voltammetric and chromatographic analysis of these opioids. In the practical part, two analytical methods were developed for the detection of fentanyl using adsorptive cyclic square-wave voltammetry (AdsCSWV) on two types of commercial screen-printed carbon electrodes (SPE, type C110 and 110CNT from Metrohm DropSens). The repeatability (as relative standard deviation) of the measurement of fentanyl (0,1 mmol/l) by AdsCSWV method was tested on the electrodes of the same type. It was 7-8 % for the 110CNT and 21-23 % for the C110 SPEs. For both electrodes, the limits of detection and the limits of quantification for fentanyl were determined from regression calibration lines. The AdsCSWV method for SPE C110 was successfully tested on mixed solutions of fentanyl with heroin or cocaine. In the chromatographic part, were found two separation systems with CN-column and dual spectrophotometric and coulometric detection suitable for analysis of studied opioids.

Keywords: fentanyl, heroin, cocaine, opioid crisis, SWV, HPLC
Number of pages: 83
Number of appendices: 10
Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 26. 4. 2024

.....

Podpis

Poděkování

Tímto chci velice poděkovat vedoucí své diplomové práce, paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D., za její odborné vedení, předané zkušenosti, její čas a trpělivost jak při psaní této práce, tak i během experimentální části. Také chci poděkovat své rodině, přítelkyni a blízkým za jejich schovívavost, pevné nervy a podporu během studia.

Velký dík patří také Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UP, jelikož bez jejího vybavení a personálu by nebylo možné tuto práci zrealizovat.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (projekty IGA_PrF_2023_027 a IGA_PrF_2024_026) a Grantovou agenturou České republiky (projekt 20-07350S).

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Voltametrie	11
2.1.1 Elektrody	12
2.1.2 Square wave voltametrie (SWV)	12
2.1.3 Miniaturizace	13
2.1.4 Voltametrická analýza opioidů	15
2.2 HPLC	19
2.2.1 RP-HPLC	19
2.2.2 CN-kolona	19
2.2.3 HPLC analýza opioidů	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Vybavení	24
3.1.1 Chemikálie	24
3.1.2 Přístroje a pomůcky	24
3.2 Pracovní postupy	25
3.2.1 Příprava reagensů	25
3.2.2 Příprava elektrod	28
3.2.3 Voltametrická měření	28

3.2.4	Kapalinová chromatografie	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1	Voltametrická měření.....	32
4.1.1	Porovnání různých typů tištěných elektrod.....	32
4.1.2	Optimalizace metody pro SPE C110.....	38
4.1.3	Optimalizace metody pro SPE 110CNT	42
4.1.4	Kalibrační závislosti.....	46
4.1.5	Směsné roztoky	50
4.2	Chromatografická měření	57
4.2.1	C ₁₈ kolona.....	58
4.2.2	CN-kolona (NaH ₂ PO ₄)	60
3.2.3	CN-kolona (HCOONH ₄ + KCl)	62
3.2.4	CN-kolona ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	65
5	ZÁVĚR.....	69
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
7	PŘÍLOHY.....	75

Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
AD	amperometrická detekce
AdsCSWV	adsorpční cyklická square-wave voltametrie
AdsCSWV-I	adsorpční cyklická square-wave voltametrická metoda bez elektrolýzy roztoku
AdsCSWV-II	adsorpční cyklická square-wave voltametrická metoda s elektrolýzou roztoku
ASSWV	anodická rozpouštěcí square-wave voltametrie
BDD	borem dopovaný diamant
BIA	analýza dávkováním (z ang. batch injection analysis)
BRP	Britton-Robinsonův pufr
CSWV	cyklická square-wave voltametrie
CV	cyklická voltametrie
DAD	detektor s diodovým polem
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
ECD	elektrochemická detekce
ESI	elektrosprejová ionizace
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HDME	visící kapková rtuťová elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
k_i	retenční faktor
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NFC	komunikace v blízkém poli
PBS	fosfátový pufr se solí
PCB	tištěná spojovací deska
PoC	v místě péče (o pacienta)
RP	reverzní fáze

R\$	real, brazilská měna
SCE	nasycená kalomelová elektroda
SPCE	tištěná uhlíková elektroda
SPE	tištěná elektroda
SPGE	tištěná grafenová elektroda
SWV	square-wave voltametrie
t_M	mrtvý čas
t_R	retenční čas
$w_{h/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
USD	americký dolar
UV	ultrafialové záření/ultrafialová oblast
ZE	základní elektrolyt

1 ÚVOD

V posledních desetiletích je celosvětově pozorován znepokojující nárůst zneužívání drog a s ním související rostoucí počet fatálních intoxikací zejména syntetickými opioidy. Krize způsobená rozsáhlým nadužíváním či zneužíváním opioidových léčiv v USA je označována jako opioidová epidemie. V USA se projevila ve třech vlnách. První začala předepisováním opioidů v 90. letech, druhá heroinová probíhala od roku 2010 a třetí způsobená nefarmaceutickým fentanylem (od 2013). Následné přimíchávání fentanylu k heroinu vedlo k výraznému nárůstu počtu předávkování. V roce 2021 bylo v USA evidováno více než 80 000 úmrtí ve spojitosti s opioidy (7,5násobný nárůst oproti roku 2015). Rizikovou skupinou jsou jedinci čerstvě propuštění z vězení, u kterých je riziko smrtelného předávkování 129krát vyšší než u běžné populace. [1, 2]

V posledních letech byla definována čtvrtá vlna drogové krize v USA, způsobená metamfetaminem a kokainem jak s přidaným fentanylem, tak jimi samotnými. Mezi lety 2010 až 2021 došlo k 50násobnému zvýšení počtu úmrtí z důvodu předávkování metamfetaminem (více než 60 % analyzovaných vzorků obsahovalo fentanyl). V případě kokainu bylo navýšení menší (trojnásobné mezi 2013 a 2019). Přibližně 75 % analyzovaných vzorků kokainu obsahovalo fentanyl. [3]

Existuje několik strategií, jak potlačovat závislost na opioidech. První z nich je distribuce naloxonu, který může v případě včasného podání vhodné dávky zachránit jedince před předávkováním. Druhou možností je podporovat léčbu závislosti na opioidech využitím látek jako buprenorfin, metadon a naltrexon, nebo významně snížit množství předepisovaných opioidů. [4]

Celosvětová epidemie vyvolává potřebu vyvíjet nové metody pro analýzu drog, zejména zaměřené na detekci opioidů jako fentanyl a jeho analoga. Tyto metody by měly být schopny účinně zachytit neustálý vývoj jeho nových, často mnohokrát účinnějších derivátů (např. ohmefentanyl, který je 20 000 – 50 000× účinnější než morfin). [5, 6]

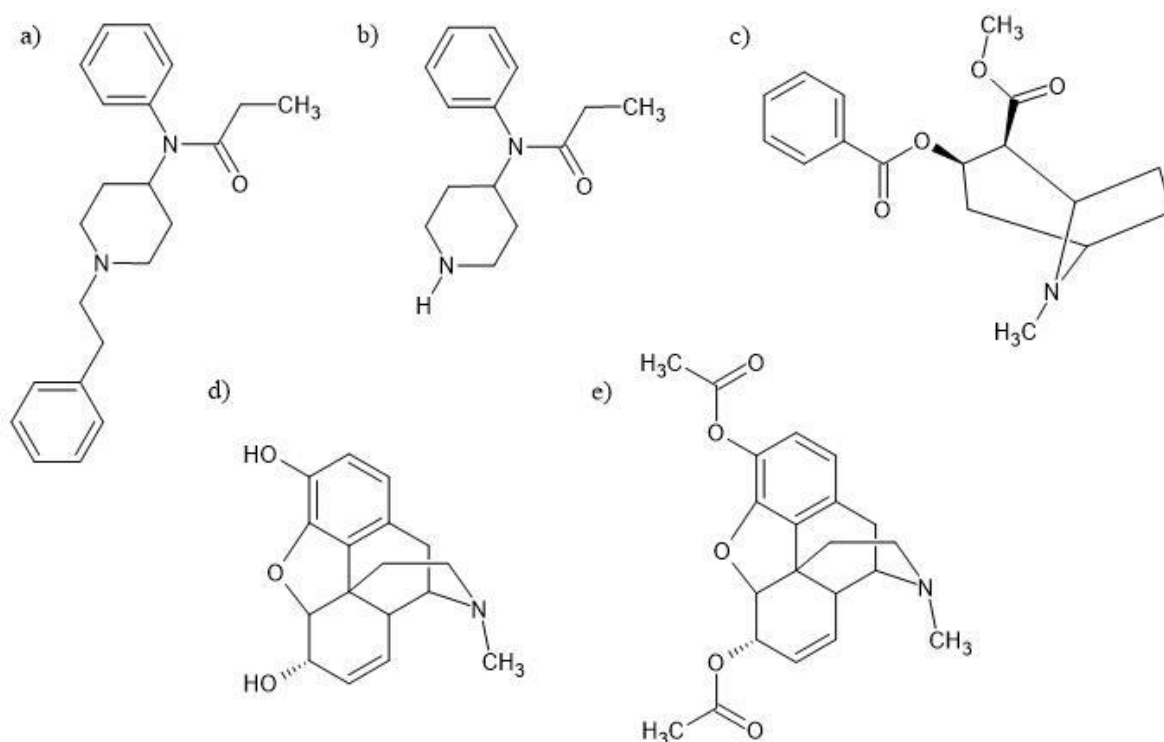
Cílem této diplomové práce bylo vyvinout levnou a rychlou screeningovou metodu pro detekci fentanylu s možným využitím mimo laboratoř. Proto byla zvolena voltametrická elektroanalytická technika na tištěných uhlíkových elektrodách. Dalším cílem bylo vyvinout kontrolní metodu HPLC-UV-ECD pro detekci fentanylu ve směsných vzorcích opioidů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Studované látky (norfentanyl, fentanyl, kokain, morfin a heroin), jejichž strukturní vzorce zobrazuje Obr. 1, disponují podobnými vlastnostmi. Zde byly vybrány dvě (Tab. I), kyselá disociační konstanta (pK_a) a rozdělovací koeficient v systému oktanol/voda ($\log P$). Další charakteristiky těchto látek byly shrnuty v citovaných pracích. [7, 12]

Tabulka I: Vybrané vlastnosti studovaných opioidů, pK_a – disociační konstanta, $\log P$ – rozdělovací koeficient oktanol/voda, převzato z [7], hodnoty pro kokain [8]

	Norfentanyl	Fentanyl	Kokain	Morfin	Heroin
pK_a	9,81	8,92	8,61	8,25	7,93
$\log P$	1,40	4,00	2,30	1,77	2,20



Obrázek 1: Strukturní vzorce studovaných opioidů; a) fentanyl, b) norfentanyl, c) kokain, d) morfin, e) heroin; vytvořeno v ACD/ChemSketch

2.1 Voltametrie

Jedná se o elektrochemickou analytickou metodu, využívající elektrolytický člunek (ve dvou nebo tříelektrodovém zapojení), ve kterém se na pracovní elektrodu vkládá potenciál, který se s časem mění v určitém rozsahu. Zaznamenává se proudová odezva jako funkce aplikovaného potenciálu – voltamogram. Jestliže se v analyzovaném roztoku základního elektrolytu vyskytuje látka (analyt), která se může při daném potenciálu na pracovní elektrodě oxidovat nebo redukovat, ve voltamogramu se tento děj zobrazí jako tzv.

voltametrická vlna (anodická pro oxidaci, katodická pro redukci látky). Výška pozorované vlny představuje kvantitativní údaj, poloha na potenciálové ose kvalitativní údaj. [9, 10, 11]

2.1.1 Elektrody

V závislosti na uspořádání článku jsou použity buď pracovní a referentní elektroda, anebo v tříelektrodovém zapojení pracovní, pomocná a referentní elektroda. V průběhu voltametrického měření jsou vždy ve styku s roztokem elektrolytu či analytu v elektrolytu. [12]

Jako pracovní mohou být použity elektrody rtuťové (samostatný vědní obor, polarografie; 1959 Nobelova cena, prof. Jaroslav Heyrovský), či elektrody z tuhých materiálů. Využívá se například zlata, platiny a různých forem uhlíku jako skelný uhlík (GCE, z ang. glassy carbon electrode), grafit, pyrolytický grafit, uhlíková pasta nebo borem dopovaný diamant (BDD). Obecně lze říct, že rtuťové elektrody jsou vhodnější pro redukce, a naopak tuhé elektrody pro oxidace. [10, 11, 13]

S referentními elektrodami, jejichž potenciál je konstantní a nezávislý na složení analyzovaného roztoku, se porovnává potenciál vkládaný na pracovní elektrodu. Nejčastěji v praxi využívanými referentními elektrodami jsou elektrody druhého druhu, jako kalomelová (SCE), argentchloridová či merkurosulfátová. Funkci pomocné elektrody zastávají elektrody z inertních elektricky dobře vodivých materiálů (platina, uhlík). [12, 14, 15]

Zvláštním typem elektrod jsou tištěné elektrody (SPE, z ang. screen-printed electrode). Jsou vhodné pro analýzu in situ, tedy přímo v terénu. Díky možnosti jednoduché průmyslové výroby těchto jednorázových elektrod jsou i levné. Jedná se o keramické nebo plastové destičky, na které se z 80 % sítotiskem nebo inkoustovým tiskem nanese vodivé materiály sloužící jako elektrody. Mezi nejčastější materiály pracovní elektrody na SPE patří různé modifikace uhlíku (grafit, grafen, mnohostěnné či jednostěnné nanotrubičky). Výhodou je, že lze pracovní povrch s využitím elektrochemických mediátorů případně nanomateriálů modifikovat, čímž je možné SPE připravit pro různé aplikace. Dalším možným materiálem pracovní elektrody je zlato, stříbro, platina či oxid ruthenia. Pomocná elektroda se nanáší platinová nebo stříbrná. Referentní elektrodu tvoří nejčastěji stříbro. [12, 16, 17]

2.1.2 Square wave voltametrie (SWV)

SWV je jednou z variant pulzní voltametrie, ve které je na elektrody aplikován s časem se lineárně měnící potenciál ve formě pravoúhlých pulzů o nastavitelné frekvenci

a amplitudě pulzu. Dalšími nastavitelnými parametry jsou potenciálový rozsah, rychlost skenování, doba trvání pulzu a potenciál kroku. [11, 18]

Záznamem je voltametrická křivka, jako výsledek rozdílu proudů, tzv. dopředného (měřen na konci pulzu) a zpětného proudu (měřen před vložením pulzu). Přítomnost analytu se projeví jako voltametrická vlna s gaussovským profilem. Právě z důvodu záznamu proudové odezvy ve velmi krátkém časovém intervalu, řádově jednotky ms, a zisku dvou proudových křivek s opačnou orientací a jejich následného odečtení (výška výsledné vlny je větší) se metoda stává citlivější a selektivnější. [11, 13, 18, 19]

Je to nízkonákladová, citlivá, selektivní metoda rychlé analýzy, vhodná pro zkoumání farmaceutických substancí, neurotransmiterů a jiných látek v různých vzorcích, jako jsou biologické tekutiny, půdy nebo odpadní vody. SWV lze považovat, z hlediska *LOD*, za metodu srovnatelnou s chromatografickými či spektroskopickými metodami, ne-li citlivější. [18]

2.1.3 Miniaturizace

Neustálý vývoj elektroniky, miniaturizace výpočetních čipů a obecně zmenšování přístrojového vybavení poskytlo příležitost přesunu elektrochemických technik do nových prostorů (kontrola potravin, životního prostředí, klinická sféra, analýza drog, ...). [20, 21]

Právě point of care (PoC) biosenzory, propojující analytickou chemii a elektrochemické inženýrství, posunují zdravotnictví o další krok vpřed. Tato zařízení jsou schopna v reálném čase snímat, vyhodnocovat i hlásit momentální stav sledovaného jedince, čímž se významným způsobem urychluje možnost úpravy či zavedení vhodné medikace, bez nutnosti čekání na výsledky z laboratoří. [20, 22]

Skupina okolo Scotta D. Adamse [20] se zabývala vývojem nízkonákladového miniaturizovaného potenciostatu (MiniStat) schopného přesné analýzy, srovnatelné se stolními potenciostaty. Vytvořili přístroj se standardním tříelektrodovým zapojením schopný zaznamenávat proudy od nA do μA , který je napájen z dobíjecí jednočládkové lithium-polymerové baterie. Potenciostatický obvod přístroje se skládá ze tří hlavních částí. Prvním je analogový výstupní stupeň, který vkládá přesně definované napětí na elektrochemický článek (umožňuje použití spektra elektrochemických technik). Druhým je analogový vstupní stupeň převádějící proud na digitální data. Posledním je stupeň digitálního ovládní, který převádí registrovaný proudový signál jako funkci napětí nebo času. Přístroj pracuje s open-source softwarem, což znamená, že lze pro analýzu měřenou

MiniStatem použit jakýkoliv počítač, který je schopen se propojit přes rozhraní USART-USB. Velikost zkonstruovaného zařízení MiniStat PCB (tištěná spojovací deska, z ang. printed circuit board) je 20 mm × 27 mm (cena cca 5 USD). [20]

Zařízení bylo testováno třemi experimenty. Cyklickou voltametrií (3mm GCE, Ag|AgCl, Pt) byla testována odezva 1 mmol/l ferrikyanidu (1 mol/l KCl) v porovnání s daty získanými stolním potenciostatem Autolab PGSTAT204 (cca 8000 USD, Metrohm). Ve druhém experimentu byla sledována amperometrická odezva glukózy s využitím testovacích proužků. Třetí porovnání proběhlo metodou ASSWV (anodická rozpouštěcí SWV) na 2mm zlaté elektrodě, proti zlaté referentní, měření mědi připravené se skalice modré. Výšky píků v CV se lišily maximálně o 10 %, zároveň byl porovnán difuzní koeficient v použití obou potenciostatů, který se lišil o 0,1 $\mu\text{cm}^2/\text{s}$. Amperometrická i ASSWV měření vyšla v očekávaném rozsahu. Mimo jiné porovnali vyvinutý MiniStat s jinými minimalizovaným systémy pro elektrochemické měření. Z práce vyplývá, že byl vytvořen miniaturizovaný, přenosný potenciostat s minimálními pořizovacími náklady, který poskytl srovnatelné výsledky se stolním přístrojem. [20]

Další oblastí vývoje přenosných systémů pro elektrochemická měření je využití chytrých telefonů ve spojení např. s biosenzory nebo SPE. Rozvoj v této oblasti je opodstatněn studií, podle které více než 60 % světové populace (přesněji 68 %, hodnoceno 2018) vlastní a používá mobilní telefon (z toho 45,4 % chytrý telefon). Smartphone lze s měřicím zařízením propojit několika způsoby. [21, 22, 23]

Jestliže je modul připojen drátovou formou, s využitím USB-B, USB-C (u zařízení s operačním systémem Android), lightning portu (iPhone), anebo 3,5mm audio portu (výstup pro sluchátka), není potřeba využít jiného zdroje energie než telefonu. Negativem tohoto periferního zapojení je relativně špatná kompatibilita. Toto se projevuje omezeným spektrem využití, protože zařízení bývají konstruována pouze pro určitý typ telefonu (značka, model). Kromě zmíněné problematiky musí být v telefonu zabudovaný tzv. USB On-The-Go protokol a povolený firmware (v případě využití zapojení přes USB port). S audio port zapojením se dá propojit jakékoliv zařízení, které obsahuje port se třemi kanály, a proto lze považovat za univerzální. [22]

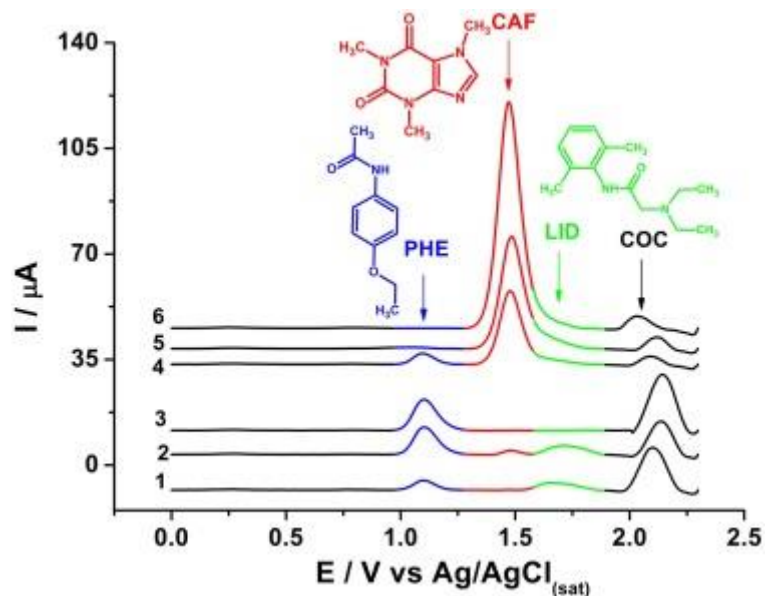
Bezdrátová propojení zabezpečuje funkce WiFi, Bluetooth nebo NFC (komunikace v blízkém poli, z ang. near field communication). Výhodou je oddělení elektrochemického článku od zařízení zpracovávajícího měřené informace. Jelikož se používají

(miniaturizované) oddělené potenciostaty, je možno provádět složitější analýzy. V případě využití spojení přes Bluetooth se systém skládá ze senzoru (např. SPE), samostatně napájeného potenciostatu s Bluetooth a chytrého telefonu. NFC umožňuje komunikaci mezi zařízeními v krátkém dosahu. Tato funkce je vkládána do nové generace mobilních telefonů. Její výhodou je přenos energie s dlouhou výdrží baterie. Pro využití NFC pro napájení senzoru měřicího CV se systém skládá ze senzoru (anténa, čip, elektrodový konektor a osciloskop) a NFC potenciostatu (velikost kreditní karty). Ovládání je zabezpečeno mobilní aplikací. [21, 22, 23]

2.1.4 Voltametrická analýza opioidů

Jedním z možných způsobů detekce opioidů je **SWV** na **HDME** (visící kapková rtuťová elektroda, z ang. hanging mercury drop electrode) proti argentchloridové referenci. Touto metodou je možné sledovat například **kokain** a jeho metabolity. V neutrálním prostředí fosfátového pufru poskytuje elektrochemická redukce kokainu jednu vlnu (-1,49 V). Alkalizací základního elektrolytu dochází k částečné hydrolyze kokainu. Vzniká elektrochemicky aktivní benzoylekgonin, který může dále hydrolyzovat na neaktivní ekgonin, anebo z kokainu vznikne, také na HDME neaktivní, metylester ekgoninu. To se ve voltamogramu projeví dvěma vlnami (redukce kokainu, redukce benzoylekgoninu). Právě hydrolytického produktu lze využít pro detekci kokainu, jelikož má vyšší schopnost adsorpce na HDME a také zhruba 6x delší eliminační (biologický) poločas. [24]

Jinou možností analýzy **kokainu** (a jeho příměsí jako jsou např. benzokain, kofein, paracetamol) je **BIA-SWV** (analýza dávkováním s SWV detekcí). K detekci látek dochází oxidací na filmové **BDD** (borem dopovaný diamant) elektrodě proti miniaturizované argentchloridové (Pt pomocná). Metoda využívá anodické předúpravy pracovní elektrody v BRP (Britton-Robinsonově pufru, pH 1,6), následované katodickou redukcí v kyselině sírové (0,1 mol/l). Příprava vzorku spočívá pouze v rozpuštění práškové drogy v ZE (0,1 mol/l H₂SO₄) a v případném ředění vzorku. V navrženém systému je kokain sledován při potenciálu vyšším než 1,9 V (Obr. 2). Popsaný systém je miniaturizovaný, vhodný pro screening v terénu. [25]



Obrázek 2: SWV voltamogramy šesti nástřiků 150 μl reálných vzorků kokainu v 0,1 mol/l H_2SO_4 ; potenciál kroku 6 mV, amplituda 40 mV, frekvence 60 Hz; PHE – fenacetin, CAF – kofein, LID – lidokain, COC – kokain; převzato z [25]

Voltametrie s využitím GCE poskytuje velkou variabilitu možností pro analýzu opioidů. Jednou z nich je stanovení **morfinu DPV a SWV** na GCE s modifikovaným povrchem, tj. **CoNP/MPP/GCE** vzniklá elektropolymerizací 3-methyl-1-fenylpyrazol-5-onu (MPP) na povrchu GCE s následnou elektrodpozicí nanočástic kobaltu (CoNP), obě úpravy byly provedeny cyklickou voltametrií. Zbývými částmi elektrochemického článku jsou referenční argentchloridová, pomocná platinová elektroda a fosfátový pufr (PBS) o pH 7. Vyvinutá metoda je vhodná i pro měření ve složitějších matricích jako moč a sérum. [26]

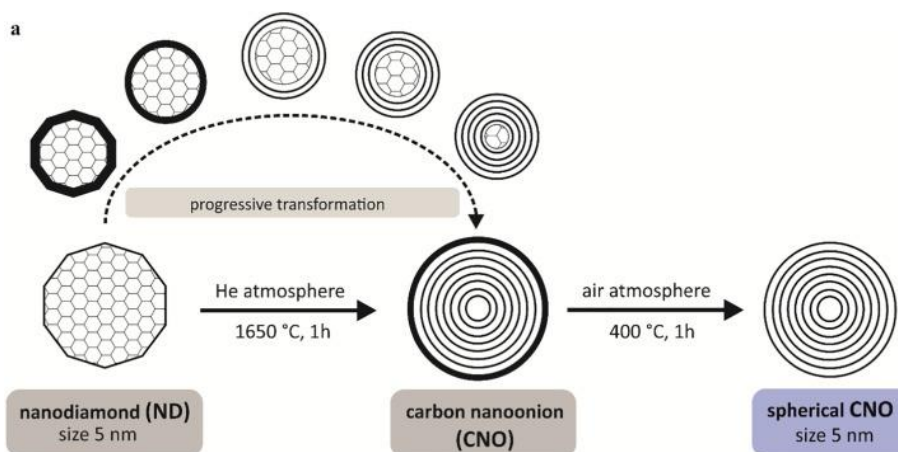
Bylo zjištěno, že pravidelný příjem diklofenaku snižuje potřebná množství **morfinu** aplikovaná jedinci po operačních zákrocích, a proto je třeba spolehlivě stanovovat tyto látky vedle sebe. Toho bylo docíleno **SWV** na **modifikované CPE** (uhlíkové pastové elektrodě) obsahující 10 % vícestěnných uhlíkových nanotrubiček, 1 % vinylferrocenu a 89 % grafitu (w/w %) s pár kapkami parafínu, proti argentchloridová referenci (Pt pomocná). Ve voltamogramu (PBS, pH 7) se látky projeví dvěma rozlišenými anodickými píky, morfin při 0,4 V a diklofenak při 0,77 V. Metoda byla testována na reálných vzorcích moči s dobrými výsledky, vysokou selektivitou a opakovatelností. [27]

Detekovat **heroin**, resp. jeho degradační produkt **6-monoacetylmorfin**, je možné **SWV** na anodicky předupravených **SPGE** (grafitové SPE, pomocná uhlíková, pseudoreferenční Ag). Povrch SPE byl aktivován potenciálem 1,5 V po dobu jedné minuty v roztoku fosfátového pufru (PBS, pH 7) s následným SWV skenem v rozsahu -0,1 V – 1,5 V. Analyty byly měřeny za stejných SWV parametrů v roztoku fosfátového pufru o pH 12. Vyvinutá metoda využívající anodicky předupravenou SPGE spolehlivě detekuje studované analyty

s lepšími odezvami než s využitím neupravené tištěné elektrody. [28]

Analyzovat **heroin** ve směsích s morfinem, kodeinem apod. metodou **SWV** lze i na modifikovaných **SPCE**. Byly připraveny 3 typy grafit-polystyrenového inkoustu, kterým byl upraven povrch pracovní elektrody SPE. Inkoust se skládal, v hmotnostních procentech, z 58 % grafitu, 32 % práškového polystyrenu a 10 % modifikátoru (grafit, ftalocyanin kobaltnatý nebo palladium). Voltametrické skeny byly získávány z kapky roztoku analytu (50 μ l) v základním elektrolytu PBS (20 mmol/l fosfátový pufr + 0,1 mol/l KCl) v potenciálovém rozsahu -0,2 V – 1,5 V. S využitím parciální regrese metodou nejmenších čtverců vytvořili model pro identifikaci či kvantifikaci směsí heroínu, morfinu, kodeinu s kofeinem a paracetamolem. [29]

Jednou z vyvinutých metod pro detekci **fentanylu** je **DPV** s uhlíkovými „nanocibulemi“ modifikovanou **GCE** (GCE/CNO) proti argentchloridové referentní elektrodě (pomocná Pt). Diamantové nanočástice (4 – 6 nm) byly žíhány v inertní atmosféře (1 hod, He, 1650 °C), poté na vzduchu (1 hod, 400 °C). Takto připravené NCO (Obr. 3) byly rozpuštěny v DMF (dimethylformamid) a po kapkách nanášeny na vyleštěnou GCE. Po vystavení GCE s CNO 50 °C v peci bylo docíleno spojení povrchu materiálů. Fentanylové roztoky byly připraveny v 0,1 mol/l fosfátovém pufru (pH 7). Pro experimenty byl použit 0,1 mol/l KCl s přidavkem redoxní sondy (5 mmol/l $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$). Metoda byla aplikována na reálné vzorky séra a moči s výsledky srovnatelnými s HPLC (t-test neprokázal významný rozdíl). [30]

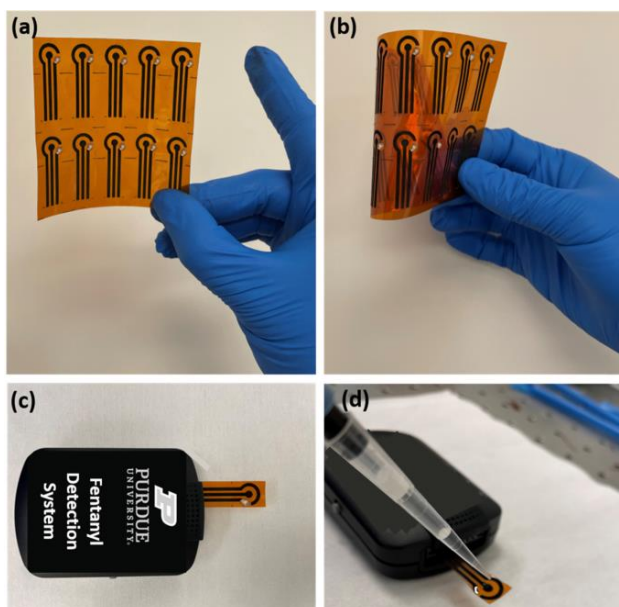


Obrázek 3: Proces výroby uhlíkových sférických „nanocibulí“ z diamantových nanočástic; převzato z [30]

Další možnou úpravou **GCE** je elektroforetická depozice elektrochemicky redukováného oxidu grafenu (ERGO) ze suspenze oxidu grafenu. Elektrochemický článek sestává z modifikované GCE, Ag/AgCl referentní a Pt pomocné elektrody v roztoku ZE PBS (pH 7,4). Voltametrická měření probíhala metodami **CV** (100 mV/s) a **SWV** ($A = 20$ mV,

$f = 25 \text{ Hz}$). Takto upraveným povrchem získala GCE větší, poréznější plochu čímž bylo docíleno lepšího LOD adsorbovaného produktu oxidace fentanylu. Vyvinutou metodou je možné identifikovat a kvantifikovat **fentanyl** a jeho deriváty v přítomnosti jiných látek jako jsou plnidla či jiné opioidy (heroin, kokain) bez nutnosti předchozí separace právě díky adsorpčnímu píku fentanylu. [31]

V další práci zaměřené na detekci **fentanylu** vytvořili laserem indukované porézní uhlíkové elektrody s označením **LCE** (Obr. 4), porézní uhlík jako pracovní a pomocná elektroda, referentní Ag/AgCl). Elektrody byly vyráběny za pomoci 30W CO₂ laseru s vlnovou délkou 10,06 μm a hustotou energie laseru 31 J/cm², karbonizací polyamidového substrátu (o tloušťce 0,1 mm). Přidáním vodivé pasty Ag/AgCl na jednu z laserem nanesených elektrod a následným sušením v sušárně (90 °C) byla vytvořena referentní elektroda. [32]



Obrázek 4: Laserem indukované porézní uhlíkové elektrody, a – vzhled vyrobených elektrod, b – znázornění mechanické pružnosti, c – ukázka zapojení elektrody k minipotenciostatu, d – ukázka nanášení roztoku k měření, převzato z [32]

Byly provedeny **SWV** experimenty v kapce (100 μl) PBS (0,1 mol/l, pH 7,4) s potenciálovým rozsahem 0 V – 0,9 V. Byla testována stabilita vyrobené elektrody, selektivita senzoru na fentanyl a také aplikace metody na reálné vzorky lidského séra. Byly získány podobné odezvy fentanylového píku jak v PBS, tak v séru. Data se mezi přenosným potenciostatem a chytrým telefonem přenáší přes Bluetooth, cena deseti elektrod je zhruba 1 USD) [32]

2.2 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pravděpodobně nejvšestrannějším a nejvíce používaným typem chromatografických technik. Obecně funguje na principu unášení injektovaného kapalného vzorku (o malém objemu) kapalnou mobilní fází přes chromatografickou kolonu (stacionární fázi), naplněnou malými částicemi nebo monolitickým materiálem, s využitím vysokého tlaku. Díky průtoku mobilní fáze, unášející vzorek, dochází v důsledku interakcí složek vzorku se stacionární a mobilní fází k jejich separaci a následné eluci. Za chromatografickým systémem se využívají různé typy detekce (spektrofotometrická absorpční nebo fluorescenční, elektrochemická, MS, ...) s možným sériovým zapojením detektorů. Výstupem jsou tzv. chromatogramy udávající retenční časy t_R (kvalitativní údaj) odečítané v maximu píků eluovaných látek (ideálně s Gaussovským profilem). Plocha píku je úměrná množství/koncentraci látky, které daný pík přísluší (kvantitativní údaj). [13, 33]

2.2.1 RP-HPLC

K separaci kapalinovou chromatografií s reverzní fází dochází s využitím nepolární, často hydrofobní, stacionární a polární mobilní fáze. Nejčastěji využívaným typem náplně kolony jsou uhlovodíkové řetězce (C_{18} , C_8) vázané na silanolovém substrátu. Dalšími možnými stacionárními fázemi může být např. kyano skupina, fenylová skupina apod. Jako mobilní fáze se používá voda (může být obohacena pufrý, solemi) v kombinaci s polárním organickým rozpouštědlem. Tím může být acetonitril, tetrahydrofuran nebo alkoholy jako methanol či izopropylalkohol. Schopnost vymývat analyty z kolony (eluční síla) mobilní fáze v RP-HPLC roste s obsahem organické složky v mobilní fázi. Reverzní systém má rozsáhlé využití v oblastech farmaceutiky, potravinářství, klinické a forenzní praxe a v mnoha dalších. [13, 33, 34]

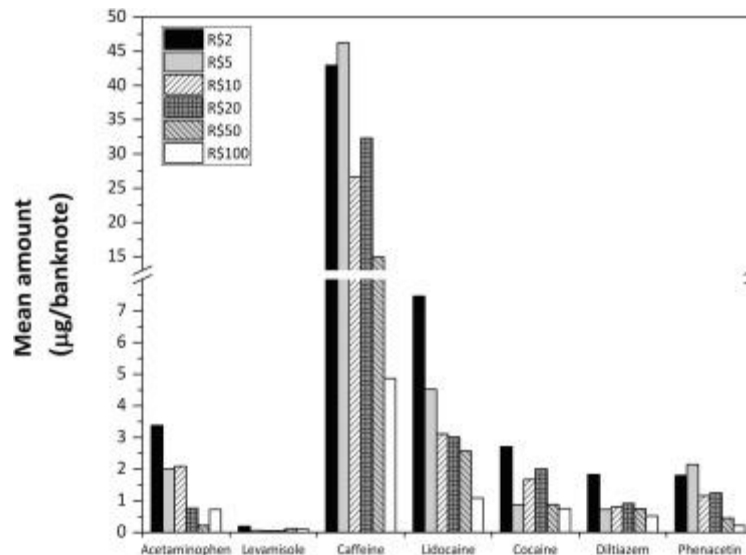
2.2.2 CN-kolona

Kyano kolony (nejčastěji s propylkyanoskupinou navázanou na silanolových skupinách) nejsou tak používané jako kolony se stacionární fází na bázi uhlíkových řetězců (např. C_{18}). Důvodem je komplikovanější údržba či obavy o stabilitu náplně. Jsou to jedny z nejvíce polárních kolon pro RP-HPLC. V porovnání s C_{18} mají nižší schopnost zadržet analytů na koloně, tzn. látky se eluují rychleji. Pro zachování retence analytů na kyano koloně (proti C_{18}) se využívá zvýšení obsahu vodné složky mobilní fáze, o 10 až 20 procent. Dalším rozdílem mezi lipofilní C_{18} kolonou a CN-kolonou je změna retence s využitím MeOH nebo

ACN v mobilní fázi. U C₁₈ má vyšší eluční sílu acetonitrilová MF, zatímco při separaci na kyano koloně methanolická. Je dokázáno, že retence látek na CN-koloně souvisí s polaritou analytu, čím vyšší je polarita molekuly, tím nižší je retence. Retence roste s počtem kruhů (cyklů) ve sloučenině, jestliže je kruh halogenovaný, zvýší se retence úměrně s počtem navázaných atomů halogenů. Na kyano kolonách je možné separovat složité směsi jak v režimu reverzních fází, tak normálních fází. Jejich výhodou je možnost analýzy polárních látek a také silně bazických látek (včetně kvartérních amoniových solí). [33, 35, 36, 37]

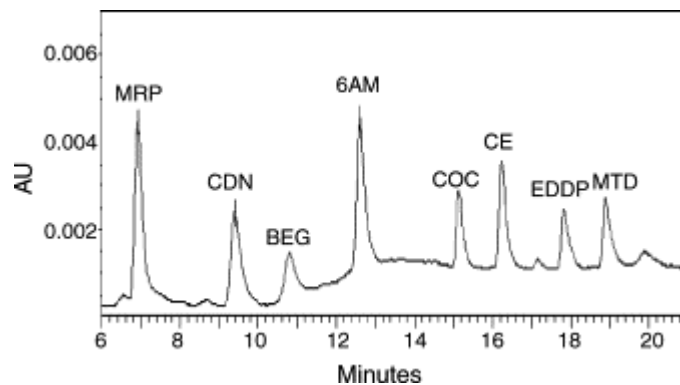
2.2.3 HPLC analýza opioidů

Skupina okolo Thais Lópes vyvinula **HPLC-DAD** metodu pro detekci **kokainu** (a řezných příměsí) extrahovaných z brazilských bankovek, ve snaze pochopit a trasovat oběh drogy ve společnosti. Pro separaci využívali kolonu **Phenomenex C18-RP** (4,6 × 150 mm, 4 μm). Vzorky byly připravovány s mobilní fází 95 : 5, fosfátový pufr (10 mmol/l, pH 2,5) : ACN. Příprava vzorků, resp. extrakce zahrnovala smáčení bankovky v acetonitrilu (2 hod za současného míchání), vymražení tukových složek (-20 °C, 2 hod), vysušení alikvotu (5 ml ACN) v proudu dusíku na konečný objem 0,5 ml a naředění vzorku mobilní fází na 2,5 ml. Separace látek probíhala s gradientovou elucí mobilní fází **H₂O : ACN : fosfátový pufr** (0-6 min 30 % : 0 % : 70 %, 6-10 min 10 % : 15 % : 75 %, 10-12 min 30 % : 0 % : 70 %) a průtokovou rychlostí 0,8 ml/min. UV detekce probíhala s vlnovými délkami 212 nm, 220 nm a 230 nm. Vyvinutou metodu aplikovali na reálné vzorky 158 bankovek (33 2 R\$, 15 5 R\$, 32 10 R\$, 28 20 R\$, 27 50 R\$, 23 100 R\$) s výsledkem pouze jedné bankovky, která neobsahovala ani jednu ze zkoumaných látek. Téměř 50 % vzorků obsahovalo koncentrace látek nad hladinou LOQ a kofein byl přítomen v největším množství. Také zjistili, že nejvyšší koncentrace analytů se vyskytují na bankovkách s nižší hodnotou (2 R\$, 5 R\$), viz Obr. 5. Spolu s extrakční technikou, nepoškozující bankovku, byla metoda hodnocena jako citlivá a selektivní. [38]



Obrázek 5: Vliv hodnoty bankovky na průměrné množství každé látky (zleva: acetaminofen, levamisol, kofein, lidokain, kokain, diltiazem, fenacetin) nalezené ve vzorcích, převzato z [38]

Pro správnou detekci **heroinu** a **kokainu** je potřeba sledovat i jejich metabolity. Proto se výzkumný tým P. Fernández zaobíral vývojem metody **HPLC-DAD** pro separaci směsi morfinu, kodeinu, 6-monoacetylmorfinu (vše metabolity heroinu), kokainu a jeho produktů hydrolýzy – benzoylekgoninu, methylesteru ekgoninu, kokaethylenu a také metadonu (podává se při léčbě/odvykání) z plasmy. Použili kolonu **XTerra RP8** (4,6 × 250 mm, 5 µm) a gradientovou eluci s mobilní fází (ACN : 20 mmol/l **fosfátový pufr** o pH 6,53) 10 : 90 (0 min) → 50 : 50 (15 min) a průtokovou rychlostí 0,7 ml/min (od páté minuty 0,8 ml/min). Celková doba jedné analýzy byla 22 min. Vzorky plasmy byly extrahovány na SPE-kolonkách a nakonec rozpuštěny v mobilní fázi 10 : 90 (ACN : 20 mmol/l fosfátový pufr o pH 6,53). Detekce probíhala v rozsahu 200 nm – 400 nm se třemi absorpčními maximy pro každou skupinu látek (233 nm kokainová, 285 nm heroinová, 292 nm metadonová). Navrhnutá příprava poskytla nejnižší výtěžnost pro benzoylekgonin (60 %) a nejvyšší pro metadon (95 %). Metoda úspěšně separovala všech osm analytů (Obr. 6) a byla aplikována na 21 reálných vzorků plasmy jedinců, kteří zemřeli na předávkování heroinem/kokainem/metadonem. Bylo zjištěno, že v každé skupině látek existuje jedna, která převyšuje ostatní (benzoylekgonin v kokainové, metadon ve své a morfin v heroinové, pokud nedojde k rychlému úmrtí bez hydrolýzy heroinu). [39]



Obrázek 6: Chromatogram plazmy bez léčiv, po přidavku 10 µg/ml každého analytu; absorbance 285 nm; MRP – morfin, CDN – kodein, BEG – benzoylekgonin, 6AM – 6-monoacetylmorfin, COC – kokain, CE – kokaethylen, EDDP – dimetyldifenylpyrrolidin, MTD - metadon; převzato z [39]

Směsný roztok **heroinu** (nebo **kokainu**), **fantanylu** a jeho derivátů lze analyzovat také metodou **HPLC-DAD-AD**. Chromatografický systém se skládal z kolony Eclipse **XDB-C8** (150 × 4,6 mm, 5 µm) a mobilní fáze 70 : 30 (20 mmol/l **HCOONH₄** + 100 mmol/l **KCl**, pH 7 : **ACN**) s izokratickou elucí a průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Detektor s diodovým polem byl nastaven na 205 nm. Amperometrická detekce, využívající průtokové cely s SPGE, aplikovala na pracovní elektrodu potenciál 1,0 V proti argentchloridové referenční elektrodě. Optimalizovanou metodou se podařilo směsi separovat s celkovou dobou separace 30 min. Mimo jiné byl testován přídavek dalších běžných příměsí (kofeinu, paracetamolu a benzokainu), které nijak neovlivnily separaci výchozí směsi. Kofein a paracetamol koeluovali. Pro vyvinutý chromatografický systém byly vypočteny hodnoty *LOD* a *LOQ*. Bylo zjištěno, že DAD detekce je citlivější oproti amperometrické detekci. Metoda byla také testována na reálných vzorcích zabavených drog s výsledkem srovnatelným s běžně používanou validovanou GC-MS metodou. [40]

V Chicagu proběhla studie zaměřující se na **UPLC-MS/MS** 22 nelegálních drog včetně **kokainu**, **fantanylu** a **heroinu**. Chromatografická separace využívala kolonu **ACQUITY UPLC BEH C18** (100 × 2,1 mm, 1,7 µm) a mobilní fázi A : B (A – 90 % **voda** + 10 % **MeOH** + 0,1 % **HCOOH**, B – **ACN**) s gradientovou elucí 90 : 10 (0 min) → 10 : 90 (6 min), s průtokovou rychlostí 0,4 ml/min. MS² obstaral trojitý kvadrupól s AJS (Agilent Jet Stream) ESI v pozitivním módu, bez využití splitru. Odběr vzorků zabezpečovala dvě terénní zařízení, prostřednictvím nichž byly od drogově závislých jedinců za finanční odměnu získaly vzorky pouličních drog. Prášková droga byla následně nanesena na screeningovou papírovou testovací kartu a s vysoušedlem vložena do plastového pytlíku. Látky byly z karty extrahovány směsí vody a methanolu (90 : 10, 5 ml) krátkým promícháním na vortexu

a sonifikací po dobu 30 minut. Vzorky pro analýzu vznikly naředěním 5 μ l extraktu 995 μ l mobilní fáze 90 : 10. Ve všech 124 reálných vzorcích byl nalezen alespoň jeden ze sledovaných analytů. Nejčastěji kvantifikovanými látkami byly difenhydramin (98 %), fentanyl (91 %), heroin (50 %) a produkty jeho hydrolýzy 6-monoacetylmorfin (44 %) a morfin (34 %). Bylo sledováno 17 drog nad LOD použité metody a 12 z nich nad hodnotou LOQ. V 96 % reálných vzorků byly nalezeny opioidy, ve 12 % stimulanty a v 1 % benzodiazepiny. [41]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vybavení

3.1.1 Chemikálie

Opioidy

Fentanyl, heroin, kokain, morfin, norfentanyl (vše Lipomed, Švýcarsko).

Kyseliny

Kyselina fosforečná 85% p. a. (Penta, Chrudim, Česká republika), kyselina boritá $\geq 99,5\%$ (Lachema, Brno, Česká republika), kyselina octová $\geq 99,8\%$ (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí 98-100% (Merck, Německo).

Báze

Hydroxid sodný $\geq 98\%$ p.a., amoniak – vodný roztok min. 25 % p.a. (oba Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

Rozpouštědla

Deionizovaná voda (18,2 M Ω , připravená systémem čištění vody Direct-Q 3 UV, Milli-Q, Merck, Německo), methanol HPLC grade (Honeywell, USA), acetonitril HPLC grade (VWR Chemicals, USA).

Ostatní

Suspenze aluminy Al₂O₃ 0,3 g/25 ml H₂O; velikost částic ≤ 50 nm (Sigma-Aldrich, Německo), chlorid draselný p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika), mravenčan amonný 97% (Sigma-Aldrich, Německo), síran amonný p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Při přípravě reagentů byly použity základní pomůcky jako kádinky, odměrné válce, špachtle, váženky atd.; automatické pipety Eppendorf Research Plus (Hamburk, Německo) s rozsahy 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l, 0,5-5 ml a 1-10 ml; mikrostříkačky Hamilton o objemech 10 μ l a 50 μ l (Bonaduz, Švýcarsko); magnetická míchačka IKA lab disk (Staufen, Německo); pH metr InoLab pH 720 s kombinovanou elektrodou s teplotním čidlem SenTix 41 (WTW, Německo); analytické váhy Kern ALS 220-4 (Německo) a Mettler Toledo XSE205 DualRange (Ohio, USA); ultrazvuková lázeň BANDELIN Sonorex Digitech DT 31 H (Berlín, Německo); UV/VIS spektrofotometr Thermo Fisher Scientific Genesys 180 (Massachusetts, USA) s křemennými kyvetami (10 mm, 750 μ l, LightPath, Cranborne, Velká Británie).

Voltametrická měření byla provedena s potenciostatem/galvanostatem Autolab PGSTAT302N, řízeným softwarem Nova 1.11 (vše Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko). V tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE MF-2012, BASi, West Lafayette, USA), referentní kalomelovou elektrodou (Monokrystaly, Turnov, Česká republika) a pomocnou platinovou elektrodou. Dále byly používány tištěné elektrody (SPE) Metrohm DropSens DRP-C110, DRP-110CNT, DRP-110SWCNT, DRP-110GPH, DRP-110GPHOX a DRP-C11L (viz Tab. II; vše Oviedo, Španělsko).

Tabulka II: Přehled tištěných elektrod a jejich materiálů

	Pracovní elektroda	Pomocná elektroda	Referentní elektroda
C110	uhlík	uhlík	stříbro
110CNT	mnohostěnné nanotrubičky	uhlík	stříbro
110SWCNT	jednostěnné nanotrubičky	uhlík	stříbro
110GPH	grafen	uhlík	stříbro
110GPHOX	oxid grafenu	uhlík	stříbro
C11L	uhlík	uhlík	stříbro/chlorid stříbrný

Chromatografická část práce byla realizována s kapalinovým chromatografem Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex, Massachusetts, USA) s elektrochemickou (ECD-3000RS s coulometrickou celou 6011 RS s pracovní elektrodou z mikroporézního grafitu, referentní hydrogen-palladiovou) a UV (DioNex 3000 variable Wavelength detector) detekcí; kolony byly použity Hypersil GOLD C18 (100 mm × 4,6 mm, 5 μm; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) a ZORBAX 300SB-CN (150 mm × 4,6 mm, 5 μm; Agilent Technologies, Kalifornie, USA).

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava reagensů

Pufry

Jak bylo zjištěno již během experimentů bakalářské práce [12], vhodným prostředím pro voltametrické analýzy fentanylu je Britton-Robinsonův pufr (BRP) o pH 8,5. Zásobní roztok o přibližném pH 2, složený z kyselin octové, borité a fosforečné (všechny o $c = 0,4 \text{ mol/l}$), byl vytitrován 0,2M-NaOH na požadované pH a skladován v lednici.

Mobilní fáze

Bylo připraveno několik různých MF mísením rozdílných vodných fází (viz níže) s ACN o definovaných objemových poměrech.

První a nejčastěji používanou vodnou složkou byla směs mravenčanu amonného s chloridem draselným (oba o $c = 50$ mmol/l). Pro separace s kolonou C_{18} obsahovala MF KCl (50 mmol/l) v celém objemu. MF pro separace s CN-kolonou obsahovaly definovanou koncentraci 50 mmol/l KCl pouze ve vodné složce. Acidita vodné složky MF byla upravována na pH v rozmezí od 6 do 9 kyselinou mravenčí (0,2 mol/l) nebo 25% amoniakem.

Druhou použitou vodnou složkou byl dihydrogenfosforečnan sodný připravený titrací kyseliny fosforečné ($c = 20$ mmol/l) hydroxidem sodným ($c = 0,2$ mol/l) na pH 6. Poslední použitou fází byl vodný roztok síranu amonného o $c = 50$ mmol/l upravený 25% amoniakem na pH 7.

Vzorky opioidů

Pro přípravu vzorků a jejich následné ředění byly připraveny methanolicke zásobní roztoky fentanylu, norfentanylu (oba 1 mmol/l), heroinu a kokainu (oba 10 mmol/l a 1 mmol/l). Zásobní roztok morfinu (0,2 mmol/l) byl připraven ve vodě. Po navázení opioidů byly látky rozpuštěny v požadovaném množství methanolu, promíchány na vortexu a ponechány po dobu pěti minut v ultrazvukové lázni. Kromě zásobních roztoků, byly i všechny následně připravené roztoky vzorků skladovány v mrazničce při teplotě -18 °C.

Všechna voltametrická měření, kromě kalibračních závislostí a směsných roztoků, byla provedena s roztokem fentanylu (0,1 mmol/l), který byl připraven naředěním zásobního roztoku fentanylu (1 mmol/l) roztokem BRP (pH 8,5) v objemovém poměru 1 : 9.

Byly připraveny dvě sady kalibračních roztoků fentanylu, sada A (Tab. III) s proměnlivým obsahem methanolu (max. 10 %) v roztocích a sada B (Tab. IV) s přesně definovaným 10% obsahem methanolu v každém kalibračním roztoku. Směsné vzorky byly připraveny dle Tab. V.

Tabulka III: Příprava kalibrační sady A; obsahuje parametry: koncentrace fentanylu v roztoku (c), objemy (V) BRP, deionizované vody a zásobního roztoku

	c [$\mu\text{mol/l}$]	V (BRP) [μl]	V (H_2O) [μl]	V (1mmol/l fentanyl) [μl]
Roztok č. 1	100	500	400	100
Roztok č. 2	50	500	450	50
Roztok č. 3	25	500	475	25
Roztok č. 4	10	500	490	10
Roztok č. 5	5	500	495	5
Roztok č. 6	2,5	500	497,5	2,5
Roztok č. 7	1	500	499	1

Tabulka IV: Příprava kalibrační sady B; obsahuje parametry: koncentrace fentanylu v roztoku (c), objemy (V) BRP, MeOH HPLC grade a zásobního roztoku

	c [$\mu\text{mol/l}$]	V (BRP) [μl]	V (MeOH HPLC grade) [μl]	V (1mmol/l fentanyl) [μl]
Roztok č. 1	100	900	0	100
Roztok č. 2	50	900	50	50
Roztok č. 3	25	900	75	25
Roztok č. 4	10	900	90	10
Roztok č. 5	5	900	95	5
Roztok č. 6	2,5	900	97,5	2,5
Roztok č. 7	1	900	99	1

Tabulka V: Příprava směsných roztoků fentanylu s heroinem/kokainem; obsahuje parametry: poměr opioidů ve směsi, objemy (V) BRP, zásobních roztoků fentanylu a heroinu/kokainu

	Poměr F : H (objemový)	V (BRP) [μl]	V (1mmol/l fentanyl) [μl]	V (10mmol/l heroin/kokain) [μl]
Směs č. 1	1 : 1	900	100	10
Směs č. 2	1 : 10	900	55	55
Směs č. 3	1 : 100	900	10	100
Směs č. 4	1 : 1000	900	1	100

Vzorky pro kapalinovou chromatografii byly připraveny ze zásobních roztoků opioidů naředěním ACN na výslednou koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Také byl připraven směsný roztok všech analyzovaných látek v ACN (výsledná koncentrace každé látky byla 50 $\mu\text{mol/l}$). Po nalezení vhodnějších separačních podmínek byl připraven nový směsný roztok o stejné koncentraci analytů naředěním MF (HCOONH_4 (50 mmol/l) + KCl (50 mmol/l) pH 7 : ACN, 80 : 20).

3.2.2 Příprava elektrod

SPE

Každá elektroda byla před použitím zkontrolována, zda nemá zoxidované kontakty. Pokud ano, byla vrstvička povrchových oxidů odstraněna jemným otřením kancelářskou gumou. Dále byla každá elektroda opláchnuta destilovanou vodou jak před, tak po měření.

Během měření bakalářské práce byla vytvořena *elektrochemická čisticí metoda* SPE. Ta byla založena na 40s kondicionaci elektrody při potenciálu 1,5 V v roztoku ZE. Po následné 10s ekvilibraci byly elektrody v BRP o pH 8,5 proměřeny cyklickou square-wave voltametrií s parametry: amplituda pulzu 50 mV, potenciál kroku 4 mV, časový interval kroku 40 ms, frekvence 25 Hz. Potenciál pracovní elektrody se měnil nejprve v katodickém směru od 1,0 V po -0,6 V, následně v anodickém směru od -0,6 do +1,0 V. [12]

GCE

Pracovní elektroda ze skelného uhlíku byla před každým použitím řádně omyta destilovanou vodou, vyleštěna na textilní podložce, na kterou byla nanese kapka vodné suspenze aluminy. Po vyleštění povrchu GCE krouživými pohyby tvaru 8 byla elektroda opláchnuta vodou, čímž byla elektroda připravena pro voltametrická měření. Po ukončení měření byla opět vyleštěna a opláchnuta vodou.

Jak pomocná platinová drátková elektroda, tak referentní kalomelová elektroda byly před i po každé analýze důkladně omyty destilovanou vodou.

3.2.3 Voltametrická měření

Metoda AdsCSWV-I

Touto *transferovou adsorpční cyklickou square-wave voltametrickou* metodou byly změřeny prvotní experimenty, a to AdsCSWV fentanylu na různých typech SPE a opakovatelnost měření na různých elektrodách stejného typu (mezielektrodová opakovatelnost). Po opláchnutí elektrody destilovanou vodou a odsátí přebytečné vody byla nanese kapka BRP (pH 8,5) o definovaném objemu (50 μ l) tak, aby roztok pokryl plochu všech tří elektrod a byl zaznamenán CSW voltamogram. Následně byla elektroda opláchnuta, osušena a byla nanese 50 μ l kapka roztoku fentanylu (0,1 mmol/l). Po 30s adsorpci byl roztok opioidu odsát mikrostříkačkou, elektroda byla opět opláchnuta destilovanou vodou, osušena a byla nanese kapka základního elektrolytu. Po záznamu CSW voltamogramu naadsorbovaného opioidu byla spuštěna čisticí metoda (viz kapitola

3.2.2) a následně byla elektroda opláchnuta a osušena.

CSWV metoda měla parametry: 5 s kondicionace při potenciálu 1,2 V, 5 s ekvilibrace, amplituda pulzu 50 mV, potenciál kroku 4 mV, frekvence 25 Hz, změna potenciálu pracovní elektrody v rozsahu od 1,0 V do -0,6 a zpět do 1,0 V.

Metoda AdsCSWV-II

Zásadní odlišností této metody od předchozí je zařazení předběžné elektrolýzy adsorbovaného analytu při definovaném kladném potenciálu (oxidace analytu) a definovaném záporném potenciálu (redukce produktu vytvořeného předchozí anodickou oxidací). Vedle potenciálu byla optimalizována doba jak oxidace, tak redukce fentanylu v kapce roztoku o koncentraci $c = 0,1$ mmol/l.

Po opláchnutí elektrody destilovanou vodou a odsátí přebytečné vody buničinou, byl zaznamenán voltamogram základního elektrolytu – BRP o pH 8,5. Po opláchnutí a osušení elektrody byla nanesea 50 μ l kapka roztoku fentanylu (0,1 mmol/l). Po proběhnutí předběžné anodické a katodické elektrolýzy byl roztok fentanylu odsát mikrostríkačkou, povrch elektrody byl opláchnut, voda byla odsáta čtverečkem buničiny a na elektrodu byla nanesea kapka ZE. Následně byl zaznamenán CSW voltamogram v anodickém, katodickém a dalším anodickém směru se změnou potenciálu v rozsahu -0,6 V až 1,0 V. Následovala elektrochemická čisticí metoda a poté byl celý výše popsáný cyklus měření zopakován. Dalšími sledovanými parametry byly frekvence a amplituda square-wave voltametrického pulzu. Po optimalizaci byly definovány dvě metody, pro každý typ elektrody (viz následující dvě metody).

Metoda AdsCSWV-II pro SPE C110

Metodou adsorpční cyklické square-wave voltametrie pro elektrody typu C110 byla změřena kalibrační sada fentanylu B a vzorky obsahující směsi fentanylu jak s heroinem, tak s kokainem.

Metoda zahrnovala 30s oxidaci při potenciálu 1,3 V, 5s ekvilibraci, 30s redukci při potenciálu -0,8 V, 5s ekvilibraci, výměnu roztoku fentanylu za BRP o pH 8,5 (s vypnutou voltametrickou celou), 5s ekvilibraci při -0,6 V, 3 voltametrické skeny (anodický, katodický, anodický) všechny v rozsahu -0,6 V až 1,0 V s amplitudou pulzu 50 mV, potenciálem kroku 4 mV a frekvencí 25 Hz.

Metoda AdsCSWV-II pro SPE 110CNT

Metodou adsorpční cyklické square-wave voltametrie s elektrodami typu 100CNT byla měřena kalibrační sada fentanylu A.

Metoda zahrnovala 15s oxidaci při potenciálu 1,2 V, 5s ekvilibraci, 5s redukci při potenciálu -0,7 V, 5s ekvilibraci, výměnu roztoku fentanylu za BRP o pH 8,5 (s vypnutou voltametrickou celou), 5s ekvilibraci při -0,6 V, 3 voltametrické skeny (anodický, katodický, anodický) všechny v rozsahu -0,6 V až 1,0 V s amplitudou pulzu 75 mV, potenciálem kroku 4 mV a frekvencí 50 Hz.

Metoda AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE

S využitím tříelektrodevého systému s pracovní GCE byl postup voltametrické analýzy opioidů následující. Do vnější nádoby dvoukomorové voltametrické cely s 5 ml ZE (BRP o pH 8,5) byla umístěna referentní elektroda. Ve vnitřní nádobce se kromě pracovní a pomocné elektrody nacházelo při definované elektrolýze 300 μ l roztoku zkoumané látky (0,1 mmol/l), při záznamu voltamogramu naadsorbovaného analytu pak 300 μ l ZE. Měření bylo prováděno metodou AdsCSWV-II s SPE C110.

Nejprve byla GCE vyleštěna a opláchnuta, následně byl zaznamenán voltamogram ZE. Poté byla provedena definovaná elektrolýza v roztoku opioidu (0,1 mmol/l), roztok byl vyměněn za základní elektrolyt a byl zaznamenán CSW voltamogram elektrolytického produktu naadsorbované látky. Po vyleštění povrchu GCE byl celý postup zopakován ještě dvakrát.

Experimentální data byla zpracována v softwaru Excel (Microsoft, Washington, USA). Směrodatné odchylky (s) byly vypočteny v softwaru dle vzorce (1):

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (1)$$

Relativní směrodatné odchylky (s_r)% byly vypočteny dle vzorce (2):

$$(s_r)\% = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \quad (2)$$

Regresní parametry byly vypočteny v softwaru QC-Expert 3.2 (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Česká republika) a následně byly vypočteny mez detekce (*LOD*) a mez stanovitelnosti (*LOQ*) dle následujících vzorců (3, kde s_b je směrodatná odchylka úseku, a je směrnice kalibrační přímky):

$$LOD = \frac{3 \cdot s_b}{a} \quad LOQ = \frac{10 \cdot s_b}{a} \quad (3)$$

3.2.4 Kapalinová chromatografie

Na začátku dne, po výměně kolony nebo MF byl v systému nastaven „purge“ po dobu 5 minut. Následně byl chromatografický systém promýván MF, dokud nedošlo k ustálení základní linie obou detektorů (UV a ECD).

Před každou analýzou byl prostor smyčky promyt pětinasobkem dávkovaného objemu (250 μ l ACN). Nástřik vzorku byl realizován prostřednictvím 20 μ l dávkovací smyčky přepřínované objemem 50 μ l vzorku.

Aplikovaná průtoková rychlost se volila v závislosti na experimentálních podmínkách, jako použitá MF či kolona. Při použití kolony C₁₈, stejně tak s CN-kolonou a dihydrogenfosforečnanovou MF byla průtoková rychlost MF 0,5 ml/min. Následným zvyšováním obsahu mravenčanové vodné složky na CN-koloně docházelo k prodlužování retenčních časů, a proto byla průtoková rychlost zvýšena na 1 ml/min.

UV detekce zprvu probíhala buď při 210 nm nebo 255 nm. Tyto vlnové délky byly zvoleny, na základě předchozích experimentů na pracovišti. [42, 43] Následně byla změřena absorpční spektra analyzovaných látek a byla vybrána vlnová délka 225 nm.

Potenciál první cely byl pro každé měření nastaven na 950 mV, přičemž napětí aplikované na druhou celu bylo voleno v rozmezí 950 – 1050 mV.

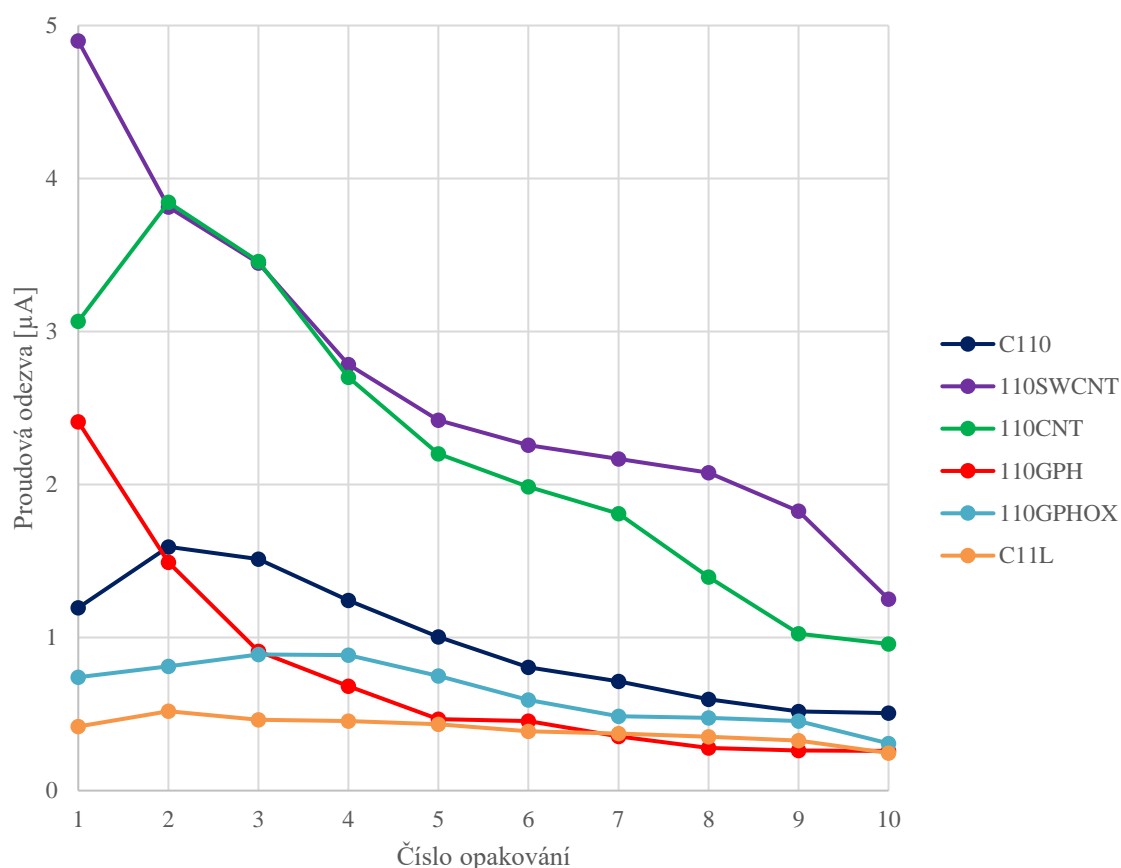
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Voltametrická měření

4.1.1 Porovnání různých typů tištěných elektrod

AdsCSWV fentanylu na různých typech SPE

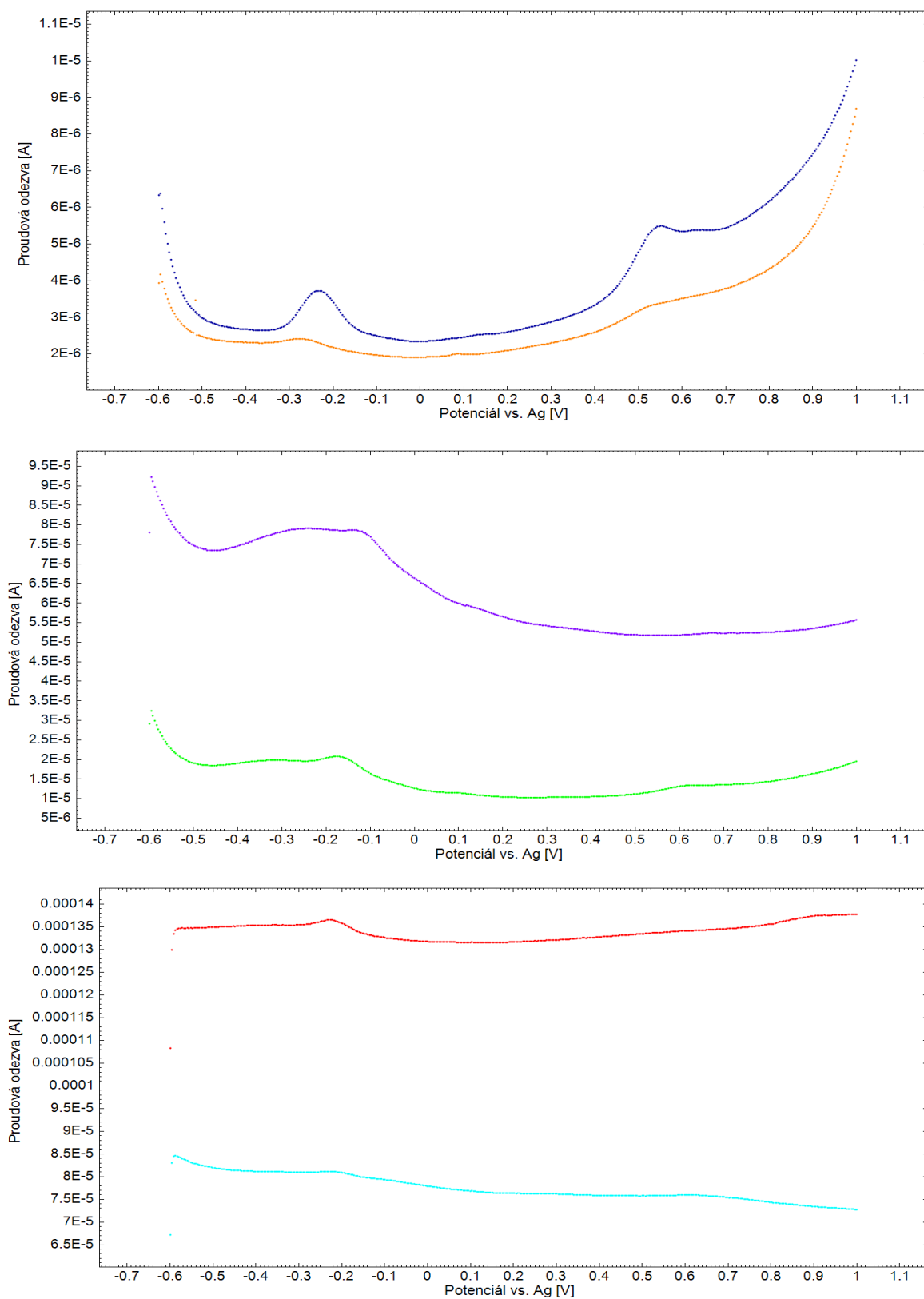
Cílem tohoto experimentu bylo porovnat voltametrické chování fentanylu na různých typech SPE při použití metody AdsCSWV-I. Dalším cílem bylo zjistit, jak se mění proudová odezva fentanylu naadsorbovaného na pracovní elektrodě při opakovaném záznamu CSW voltamogramů v roztoku ZE (BRP pH 8,5). Od každého druhu SPE (Tab. II) byla náhodně vybrána jedna elektroda, na které proběhla série měření metodou AdsCSWV-I tak, že po adsorpci fentanylu z kapky jeho roztoku (0,1 mmol/l) bylo zaznamenáno deset CSW voltamogramů v kapce roztoku ZE. Byly vyhodnoceny a porovnány výšky anodického píku při potenciálu kolem -0,2 V. (Obr. 7).



Obrázek 7: Graf závislosti výšky proudové odezvy na počtu opakování CSWV měření na jedné elektrodě; měřeno v kapce ZE po 30s adsorpci z roztoku fentanylu ($c = 0,1$ mmol/l) na povrch SPE (viz legenda), měřeno metodou AdsCSWV-I

Nejvyšší proud anodického píku byl registrován v prvním cyklu na elektrodách 110SWCNT a 110GPH nebo ve druhém cyklu na elektrodách 110CNT, C110 a C11L. S počtem opakování se proud analytického signálu postupně snižoval. SPE 110GPHOX poskytla nejvyšší proud anodického píku ve čtvrtém cyklu. Jak je patrné z Obr. 7, nejvyšší signál byl naměřen na elektrodách typu 110SWCNT a 110CNT.

Problémem však je fakt, že průběh voltametrických křivek pořízených s těmito SPE nebyl ideální. Měl vysoké proudové pozadí což je vidět na Obr. 8, kde fialová křivka (110SWCNT) vykazuje významné navýšení základní linie v záporné oblasti potenciálu, pravděpodobně silným vlivem kapacitního proudu. Zmíněná proudová vlna zapříčiňuje nevhodnost daného typu elektrod pro analýzu fentanylu, jelikož znesnadňuje vyhodnocení píku fentanylového produktu v oblasti okolo -0,2 V až -0,1 V. Zelená křivka ilustruje záznam měření na elektrodě typu 110CNT. Lze sledovat významné snížení proudového pozadí a také proudové vlny v potenciálové oblasti pod 0 V. Zatímco SPE C110 (jak bylo zjištěno v bakalářské práci [12]) poskytovaly velmi dobře vyvinutý pík analytu při potenciálu přibližně -0,25 V, SPE C11L poskytly zhruba poloviční odezvu analytu. Elektrody modifikované grafenem (110GPH) a oxidem grafenu (110GPHOX) poskytly záznamy s příliš vysokým proudovým pozadím, v němž se ztrácel proudový signál analytu. Ze zmíněných důvodů se pokračovalo v měření na SPE 110CNT, C11L, C110 a z dalších experimentů byly vyloučeny SPE 110SWCNT, 110GPH a 110GPHOX.



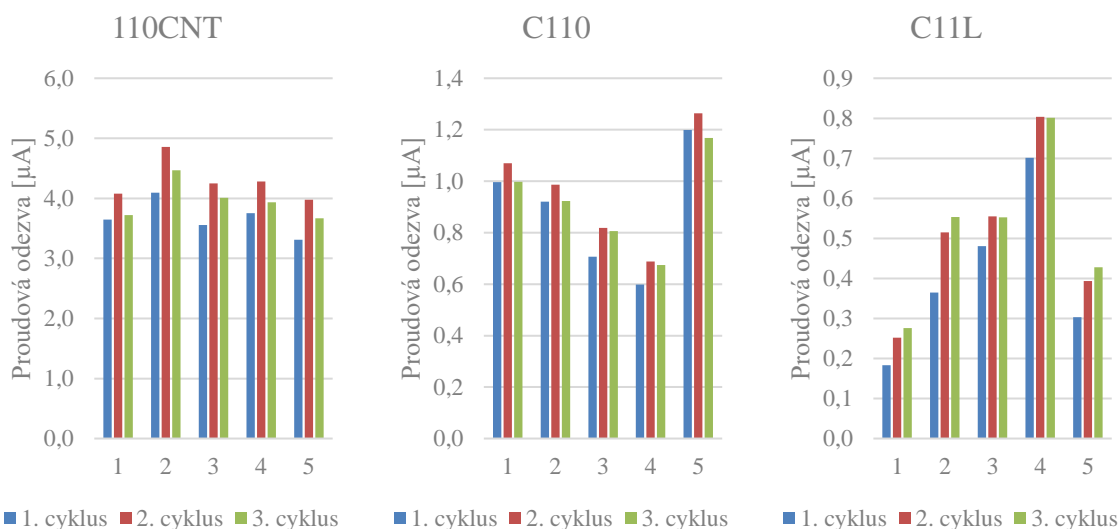
Obrázek 8: Záznamy prvních anodických skenů pořízených metodou AdsCSWV-I na různých typech SPE, měřeno v ZE po adsorpci fentanylu z jeho roztoku (0,1 mmol/l); tm. modrá – C110, oranžová – C11L, fialová – 110SWCNT, zelená – 110CNT, červená – 110GPH, sv. modrá – 110GPHOX

Opakovatelnost měření na různých elektrodách stejného typu (mezielektrodová opakovatelnost)

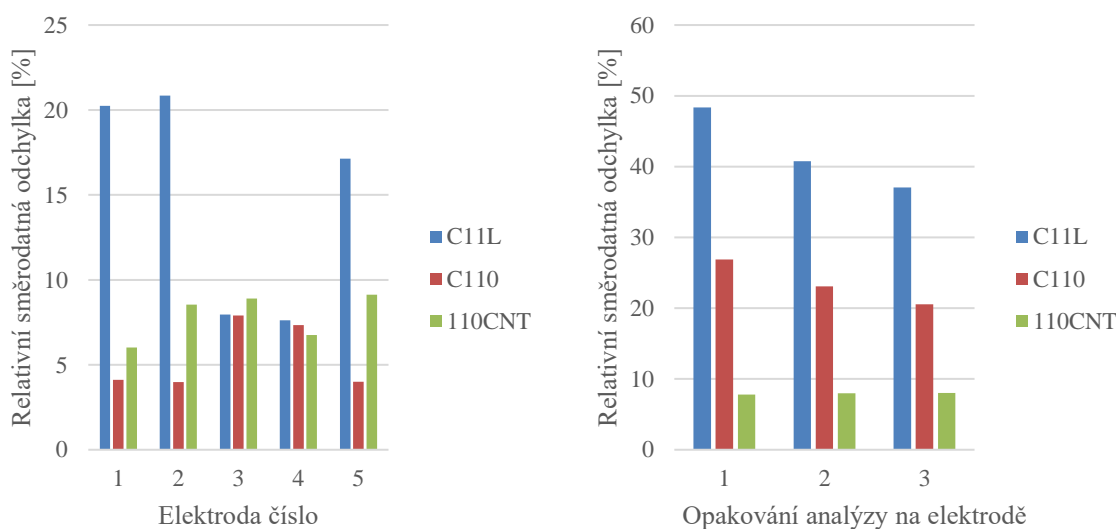
SPE elektrody se vyznačují mikroskopicky značně drsným povrchem, což může být příčinou rozdílné elektroaktivní plochy pracovní elektrody a tím i rozdílných proudů registrovaných na různých elektrodách stejného typu. Proto byla testována metodou AdsCSWV-I opakovatelnost proudové odezvy fentanylu na pěti náhodně vybraných elektrodách stejného typu (mezielektrodová opakovatelnost). Na základě výsledků uvedených v předchozí kapitole byly vybrány tři typy elektrod: C110, 110CNT a C11L. Po změření ZE byl na povrch elektrody naadsorbován fentanyl z roztoku (0,1 mmol/l) a po odstranění roztoku analytu byly v kapce ZE zaznamenány tři cykly CSWV. Po elektrochemickém vyčištění byl celý proces ještě jednou zopakován opět se třemi cykly CSWV. Následně byly vyhodnoceny anodické proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu před i po čištění.

Byly sledovány tvar a výška voltametrických odezev. Proudové odezvy analytu byly vyhodnoceny přesně definovaným způsobem, a to odečtením proudového maxima anodického píku od základní linie vedené od potenciálu -0,3 V po bod dotyku v minimu voltametrické křivky za proudovým píkem (110CNT), resp. od -0,4 V stejným způsobem (C110, C11L). Z naměřených hodnot proudů píků se vypočetly průměry a výběrové směrodatné odchylky.

První série o třech cyklech na každé SPE je vyobrazena na Obr. 9, relativní směrodatné odchylky (%) experimentu na Obr. 10. Nejvyšší proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu poskytly SPE 110CNT. Lze si také všimnout totožného trendu signálů na každé z použitých SPE 110CNT, tj. odezva druhého cyklu byla nejvyšší a prvního nejnižší. Z voltametrických záznamů na SPE C110 byly získány nejvyšší odezvy také z druhého cyklu. Na SPE C11L již nebyl registrován zjevný trend v signálech, krom nejnižších odezev prvních cyklů. Relativní směrodatné odchylky (%) výšek píků analytu byly u obou způsobů vyhodnocení nejvyšší pro SPE C11L.



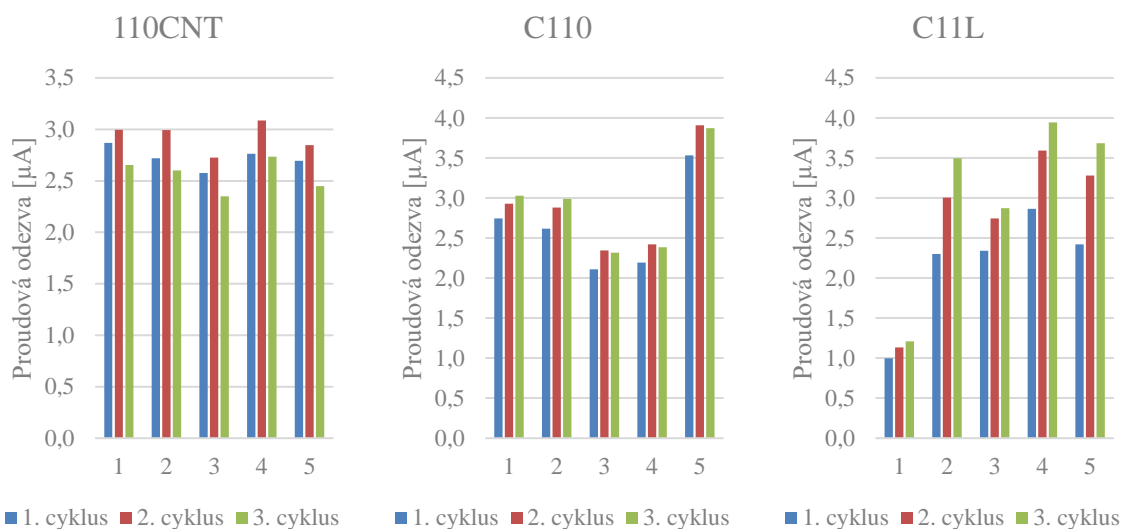
Obrázek 9: Porovnání proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na různých typech SPE; použité SPE 110CNT, C110 a C11L; měřeno metodou AdsCSWV-I ve třech cyklech na pěti elektrodách (1 – 5) od každého typu před elektrochemickým čištěním



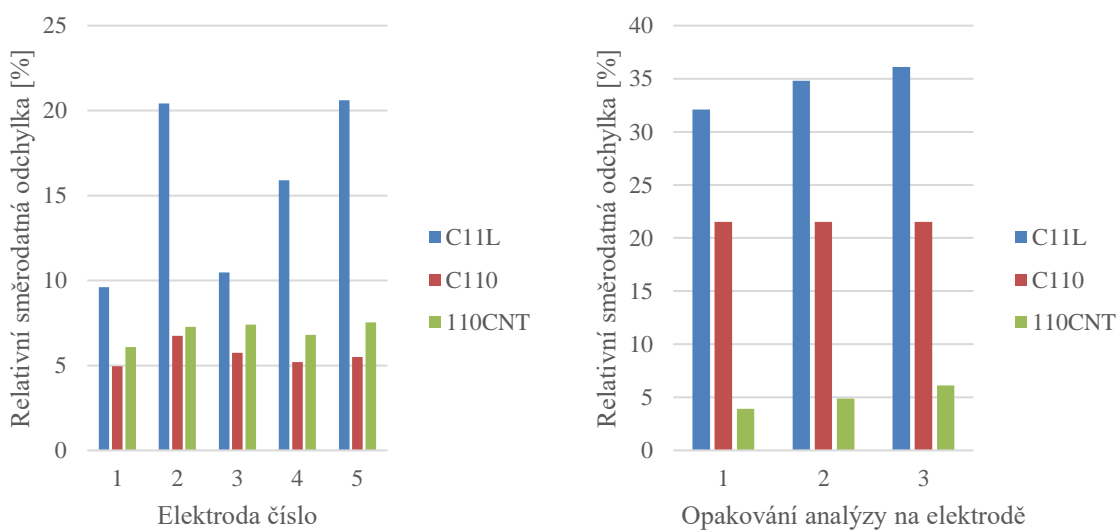
Obrázek 10: Porovnání relativních směrodatných odchylek (%) výšek píků oxidačních produktů fentanylu první série; měřeno metodou AdsCSWV-I před elektrochemickým čištěním SPE; vlevo odchylky třech měření na 1 – 5 SPE, vpravo odchylky 1. – 3. opakování na pěti SPE

V druhé sérii, po elektrochemickém čištění SPE, byly z CSW voltamogramů na SPE 110CNT získány výšky píků oxidačního produktu fentanylu (Obr. 11) s podobným trendem jako v první sérii, tj. nejvyšší odezvy v 2. cyklu, nejnižší v 3. cyklu. Výšky píků první i druhé série byly řádově srovnatelné. Naproti tomu výšky píků získané na SPE C110 a C11L poskytl zhruba trojnásobně vyšší odezvy oproti první sérii. Ze skenů 1. – 3. cyklu na SPE C11L byla získána závislost s opakujícím se trendem, kdy odezva rostla s počtem cyklů. Ze závislosti relativních odchylek (Obr. 12) experimentů po elektrochemickém čištění SPE lze

sledovat podobný trend. Relativní směrodatné odchylky výšek píků oxidačního produktu fentanylu na elektrodách C11L byly i přes mírné snížení hodnot nejvyšší. Odchylky na elektrodách C110 a 110CNT zůstaly přibližně stejné.



Obrázek 11: Porovnání proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na různých typech SPE; použité SPE 110CNT, C110 a C11L; měřeno metodou AdsCSWV-I ve třech cyklech na pěti elektrodách (1 – 5) od každého typu po elektrochemickém čištění



Obrázek 12: Porovnání relativních směrodatných odchylek (%) výšek píků oxidačních produktů fentanylu druhé série; měřeno metodou AdsCSWV-I po elektrochemickém čištění SPE; vlevo odchylky třech měření na 1 – 5 SPE, vpravo odchylky 1. – 3. opakování na pěti SPE

Statistická analýza dat ukazuje, že opakovatelnost měření, určená jako relativní směrodatná odchylka výšek proudových píků ze tří opakovaných měření s pěti elektrodami, je u elektrody 110CNT 8 % (na nových elektrodách před elektrochemickým čištěním) a 7 % ve druhé sérii (po elektrochemickém čištění), u elektrod C110 je 23 % v 1. sérii a 21 % ve 2. sérii, u elektrod C11L 42 % v první sérii a 34 % ve druhé sérii. Poměrně horší opakovatelnost měření s elektrodami C11L byla důvodem k jejich vyloučení z dalších experimentů.

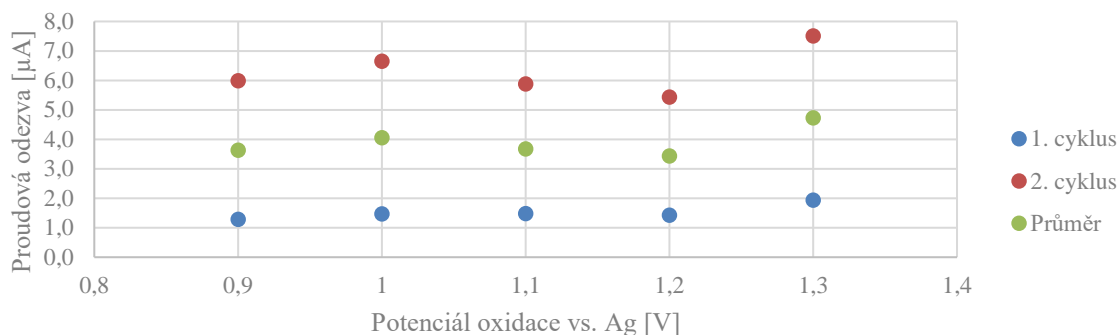
4.1.2 Optimalizace metody pro SPE C110

Při vývoji metody AdsCSWV-II pro SPE C110 pro analýzu fentanylu, založené na jeho adsorpci na povrchu SPE, elektrochemické oxidaci a detekci oxidačního produktu, bylo potřeba najít vhodné experimentální podmínky pro získání maximální proudové odezvy analytu v potenciálové oblasti kolem -0,2 V. Měření probíhalo již popsáním způsobem (kap. 3.2.3, metoda AdsCSWV-II). Po prvním měřicím cyklu a záznamu CSW voltamogramu bylo provedeno elektrochemické čištění SPE (kap. 3.2.2) a poté byl celý cyklus ještě jednou zopakován. První čtyři závislosti (optimalizace podmínek elektrolýzy fentanylu) byly měřeny metodou AdsCSWV-II s amplitudou 50 mV a frekvencí 25 Hz. Ve všech případech byl vyhodnocen proud píku ve druhém anodickém skenu a to od základní linie vedené od potenciálu -0,4 V po bod dotyku v minimu voltametrické křivky za píkem analytu.

Potenciál oxidace

Prvním testovaným parametrem byl potenciál oxidace fentanylu na SPE. Oxidace byla testována při potenciálech 0,9; 1,0; 1,1; 1,2 a 1,3 V po dobu 15 s v kapce roztoku fentanylu. Redukce probíhala 15 s při potenciálu -0,6 V, CSW voltamogramy byly zaznamenány s amplitudou pulzu 50 mV a frekvencí 25 Hz ve dvou po sobě následujících cyklech.

Z grafického znázornění závislosti výšky píku analytu na potenciálu oxidace (Obr. 13) je patrný shodný trend ve výškách proudového signálu pro oba cykly. Jako nejvhodnější byl zvolen potenciál oxidace 1,3 V, jelikož v první i ve druhé analýze bylo docíleno nejvyšších proudů. Zároveň je možné si všimnout, že došlo i k největšímu nárůstu proudové odezvy mezi opakováními.

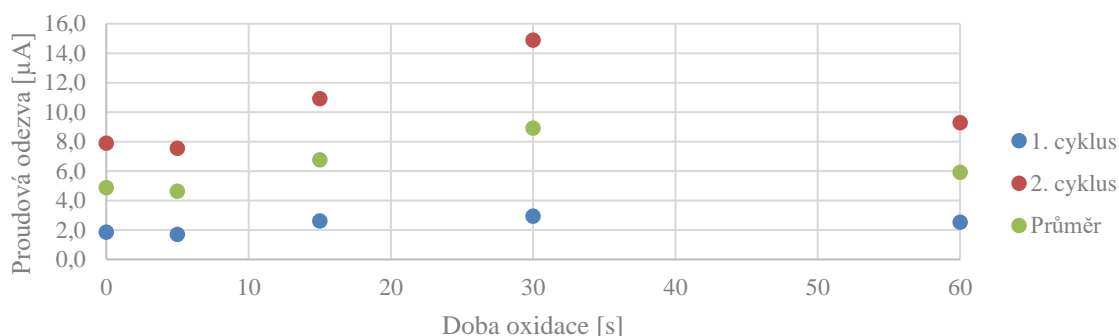


Obrázek 13: Závislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na potenciálu oxidace po dobu 15 s; měřeno metodou AdsCSWV-II

Doba oxidace

Dalším testovaným parametrem byla doba oxidace fentanylu při potenciálu 1,3 V, a to v rozsahu 0 – 60 s.

Závislost proudu (Obr. 14) anodického píku ve druhém skenu na době oxidace narůstala až do maxima při 30 sekundách, s následným poklesem při dalším prodlužování doby oxidace na 60 s. Maximální proudová odezva při 30 s byla registrována u obou opakování. Z toho důvodu byla tato doba zvolena jako optimální.

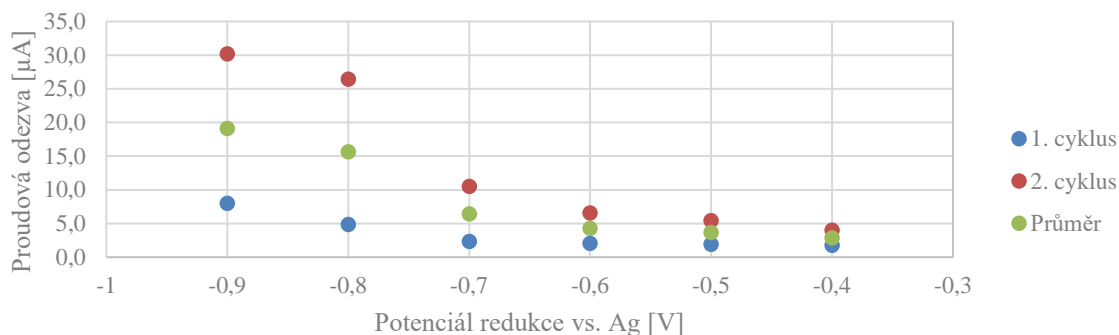


Obrázek 14: Závislost proudové odezvy na době oxidace fentanylu při potenciálu 1,3 V; měřeno metodou AdsCSWV-II

Potenciál redukce

Po zjištění vhodných parametrů oxidace (30 s při 1,3 V) byl zkoumán potenciál redukce, při kterém bude proudová odezva analytu nejvyšší.

Byla získána závislost s exponenciálním profilem a sestupným charakterem (Obr. 15). Nejvyšší proudové signály byly zaznamenány při potenciálu redukce -0,9 V, jenže v porovnání s potenciálem redukce -0,8 V měly téměř dvojnásobné proudové pozadí. Výška fentanylového píku nebyla významně větší pro redukcí při -0,9 V a vysoký proud pozadí znesnadňoval vyhodnocení analytického signálu. Proto byl zvolen potenciál redukce -0,8 V.

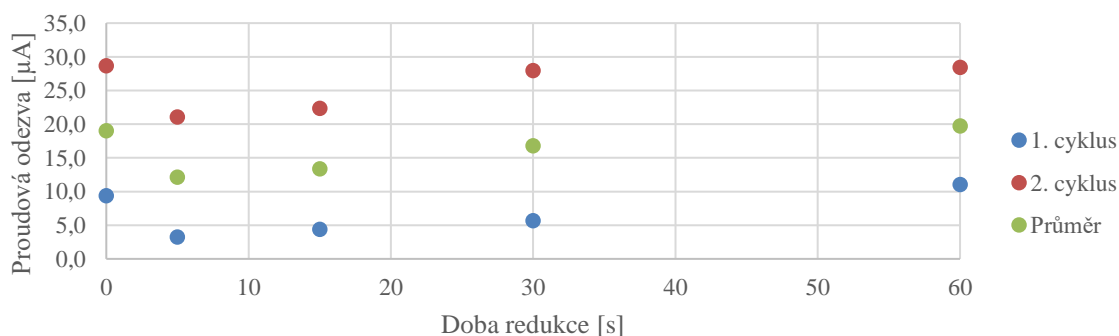


Obrázek 15: Závislost proudové odezvy na potenciálu redukce po dobu 15 s; měřeno metodou AdsCSWV-II

Doba redukce

Posledním zkoumaným parametrem elektrolýzy roztoku fentanylu (0,1 mmol/l) byla doba redukce při potenciálu -0,8 V.

Zde lze sledovat tři různé časy, při kterých bylo docíleno srovnatelně vysokých výšek proudu analytu (Obr. 16), a to 0 s, 30 s a 60 s. Nejnižší pozadí poskytl anodický sken zaznamenaný po 30s redukci. Zbylé dva časy byly právě z důvodu vysokého proudu pozadí vyloučeny. Dalším důvodem byly „extrémy“ zmíněných časů, kdy při 0 s by pravděpodobně nedošlo k úplné redukci oxidačního produktu a naopak u 60 s byly již SPE vystaveny vysoké zátěži, a proto docházelo pravděpodobně ke zmíněnému nárůstu proudového pozadí.



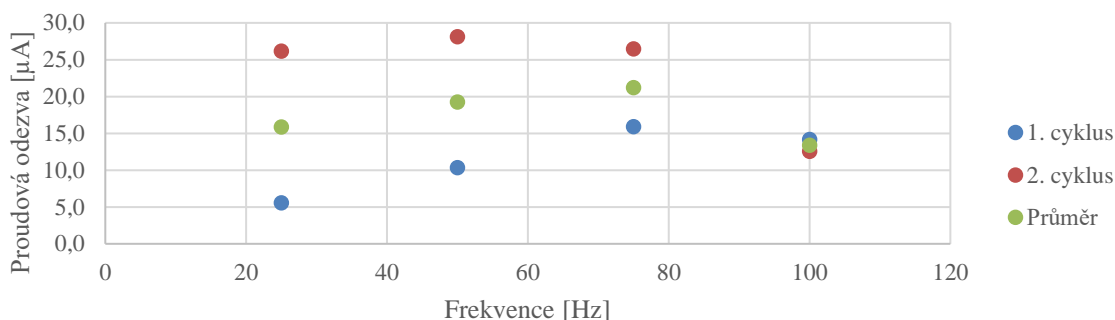
Obrázek 16: Závislost proudové odezvy na době redukce při potenciálu -0,8 V; měřeno metodou AdsCSWV-II

Frekvence SWV pulzů

Po optimalizaci podmínek elektrolýzy fentanylu (ox. 30 s při 1,3 V; red. 30 při -0,8 V) byly zkoumány parametry square-wave voltametrie, prvním z nich byla frekvence pravoúhlých potenciálových pulzů (Obr. 17).

Se zvyšující se frekvencí pulzů docházelo k nárůstu výšky analytického signálu, ale také proudu pozadí. Zároveň vzrůstala i amplituda proudového šumu voltametričeských křivek při

vyšších frekvencích (75 Hz, 100 Hz), což způsobilo zhoršenou vyhodnotitelnost výšky píků. Z těchto důvodů bylo pokračováno v měření při $f = 25$ Hz.



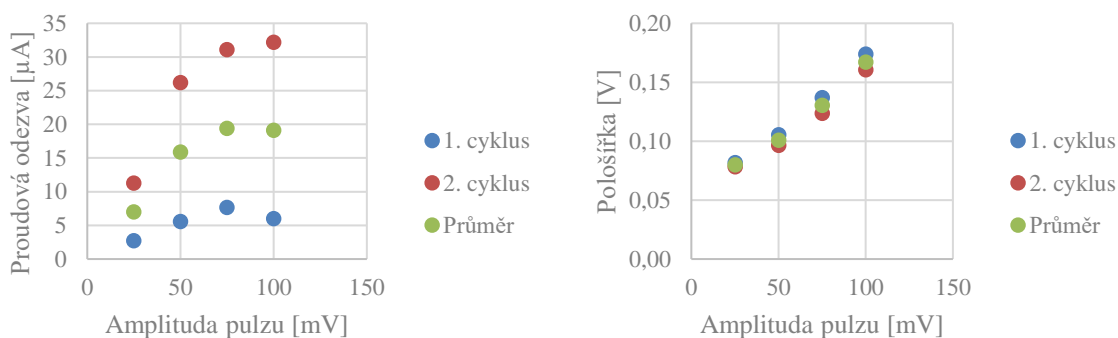
Obrázek 17: Závislost proudové odezvy na frekvenci pravoúhlého napěťového pulzu; měřeno metodou AdsCSWV-II

Amplituda SWV pulzu

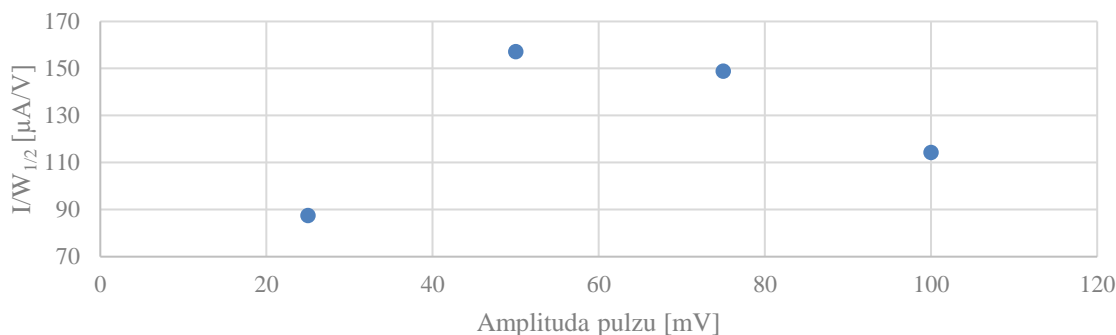
Posledním testovaným parametrem byla amplituda pravoúhlého napěťového pulzu v SWV metodě. Hodnotila se jak výška anodického píku fentanylového produktu (Obr. 18), tak i jeho šířka v polovině výšky (pološířka, Obr. 18) a také poměr výšky ku pološířce píku ($I/W_{1/2}$ [µA/V]) v závislosti na modulační amplitudě (Obr. 19).

Se zvyšující se amplitudou SWV pulzu docházelo jak ke zvyšování proudového signálu (výšky) sledovaného píku, tak i k rozšiřování píků (Obr. 18).

Podělením výšky píku jeho šířkou v polovině výšky byla získána poměrová závislost (Obr. 19). Ideou bylo získat co nejvyšší hodnotu tohoto poměru, jelikož čím je vyšší proud a užší pík, tím je lepší citlivost a selektivita metody. Toho bylo docíleno aplikací amplitudy 50 mV. Tímto byla dokončena optimalizace AdsCSW voltametrie na elektrodách typu C110. Nalezené parametry jsou shrnuty v kap. 3.2.3.



Obrázek 18: Závislosti výšky píku na amplitudě pravoúhlého pulzu (vlevo) a pološířky píku na amplitudě pulzu (vpravo); měřeno metodou AdsCSWV-II



Obrázek 19: Závislost poměru výšky píku ku jeho pološířce na amplitudě voltametrického pravoúhlého pulzu; měřeno metodou AdsCSWV-II

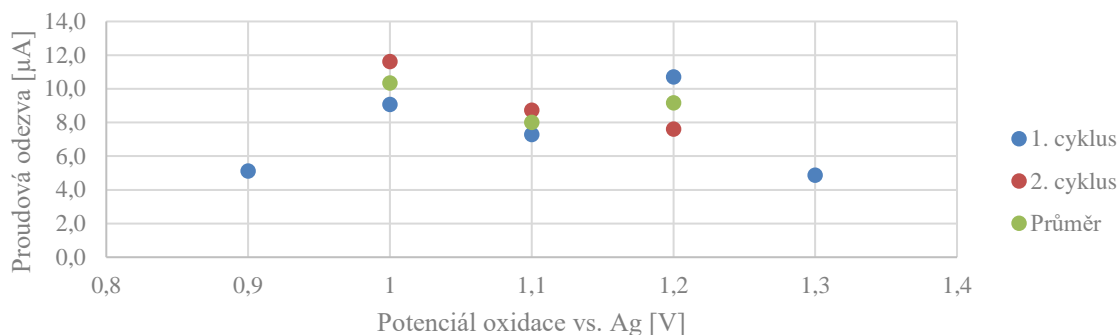
4.1.3 Optimalizace metody pro SPE 110CNT

Stejně jako v případě optimalizace metody AdsCWSV-II pro SPE C110 i zde bylo potřeba najít vhodné experimentální podmínky oxidace fentanylu na povrchu SPE 110CNT, redukce vzniklého oxidačního produktu a jeho následné detekce. Měření probíhalo metodou AdsCSWV-II, kdy byl vyhodnocován pík fentanylového produktu ve druhém anodickém skenu a to od základní linie vedené od potenciálu -0,35 V jako tečna k poklesu voltametrické křivky za píkem analytu. První čtyři závislosti (optimalizace podmínek elektrolýzy fentanylu) byly měřeny s frekvencí 25 Hz a amplitudou pulzu 50 mV.

Potenciál oxidace

Prvním testovaným parametrem elektrolýzy byl potenciál oxidace fentanylu v kapce jeho roztoku (0,1 mmol/l) na povrchu SPE 110CNT. Byla sledována závislost výšky píku analytu na potenciálu oxidace v rozsahu 0,9 – 1,3 V (Obr. 20). Oxidace trvala 15 s, následovala ji redukce při potenciálu -0,6 V po dobu 15 s. CSW voltamogramy byly zaznamenány s amplitudou pulzu 50 mV a s frekvencí 25 Hz ve dvou po sobě jdoucích cyklech.

CSW voltamogramy pořízené při potenciálech oxidace 0,9 V a 1,3 V vykazovaly značně vysoké proudové pozadí, proto byl při těchto potenciálech proveden pouze jeden měřicí cyklus. Jako nejvhodnější byla zvolena oxidace při potenciálu 1,2 V, jelikož voltamogram při tomto potenciálu poskytl nejvyšší proudovou odezvu oxidačního produktu fentanylu s nejnižším pozadím.

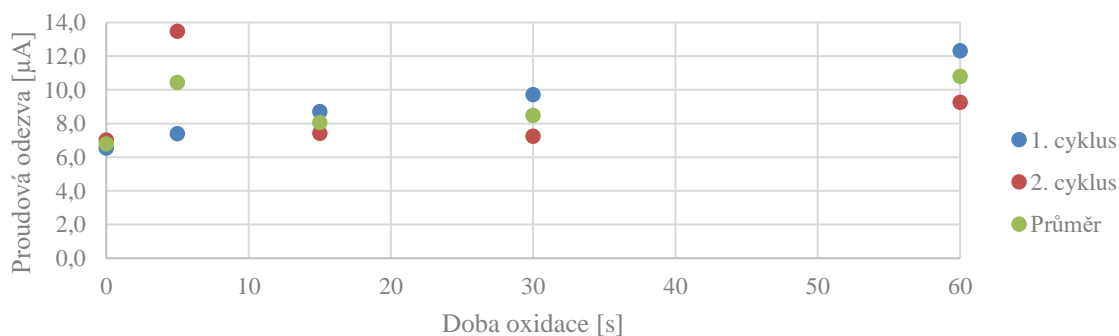


Obrázek 20: Závislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na potenciálu oxidace po dobu 15 s; měřeno metodou AdsCSWV-II

Doba oxidace

Dále byla testována doba oxidace fentanylu při potenciálu 1,2 V, v rozsahu 0 – 60 s.

Z grafické závislosti (Obr. 21) je patrné, že se s prodlužujícím časem oxidace zvyšovala proudová odezva analytu. Vhodným byl zvolen čas 15 s, při němž byly proudy prvního i druhého cyklu srovnatelně vysoké. Dalším prodlužováním doby oxidace nad 15 s již nedocházelo k významnému zvýšení proudových signálů.

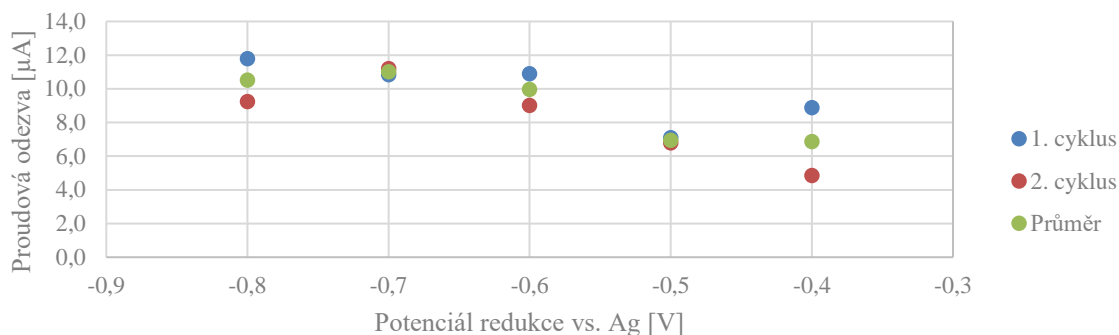


Obrázek 21: Závislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na době jeho oxidace při potenciálu 1,2 V; měřeno metodou AdsCSWV-II

Potenciál redukce

Po optimalizaci oxidačních parametrů byl zkoumán potenciál redukce oxidačního produktu fentanylu (v rozsahu od -0,8 V do -0,4 V), při kterém bude na elektrodách typu 110CNT proudová odezva analytu nejvyšší.

Aplikace negativnějších potenciálů redukce vedla k nárůstu výšky sledovaného píku (Obr. 22). CSW voltamogramy získané při redukcí s potenciály -0,6 V až -0,8 V poskytly srovnatelné odezvy. Rozhodujícím faktorem pro volbu redukčního potenciálu byl rozdíl ve výšce píku prvního a druhého cyklu, a proto byl vybrán potenciál redukce -0,7 V.

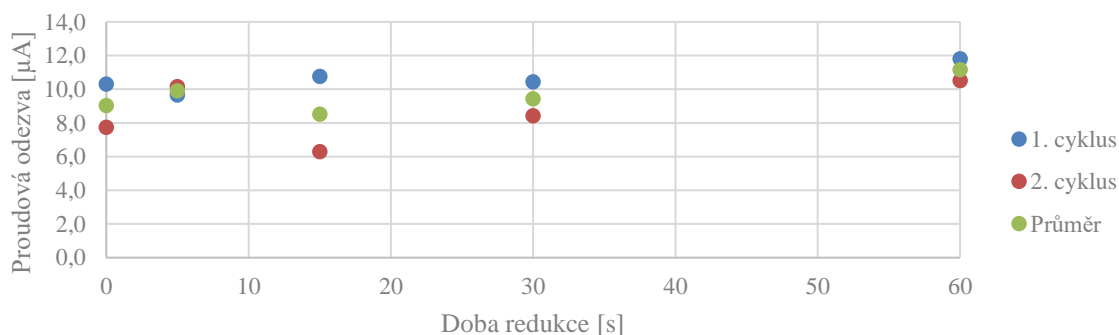


Obrázek 22: Závislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na potenciálu jeho redukce po dobu 15 s; měřeno metodou AdsCSWV-II

Doba redukce

Posledním testovaným parametrem elektrolýzy byla doba redukce oxidačního produktu fentanylu při potenciálu -0,7 V. Experiment byl proveden v rozsahu 0 – 60 s.

Získaná závislost (Obr. 23) poukazuje na fakt, že využití elektrod 110CNT pro detekci fentanylu není téměř závislé na době redukce elektrolyticky generovaného oxidačního produktu. Proudové signály analytu z CSW voltamogramů při všech testovaných časech poskytly relativně srovnatelné výšky píků. Rozhodujícím byl opět rozdíl výšky píku prvního a druhého cyklu. Proto byla doba redukce nastavena na 5 s.



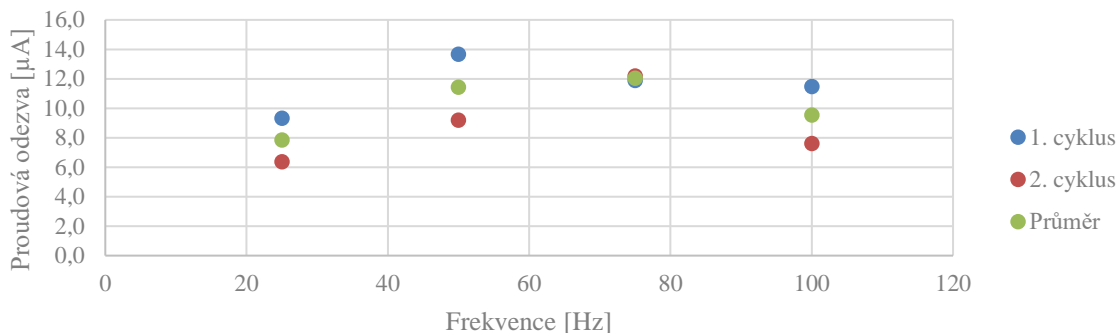
Obrázek 23: Závislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na době jeho redukce při potenciálu -0,7 V; měřeno metodou AdsCSWV-II

Frekvence SWV pulzů

Po zjištění vhodných podmínek elektrolýzy fentanylu (0,1 mmol/l) s využitím SPE 110CNT (ox. 15 s při 1,2 V a red. 5 s při -0,7 V) byla zkoumána vhodná frekvence pravoúhlých potenciálových pulzů (Obr. 24).

CSW voltamogram získaný aplikací pulzů s frekvencí 25 Hz vykazoval vysoké proudové pozadí. Podobně jako u CSW voltamogramů měřených na SPE C110 se se zvýšením frekvence pravoúhlých pulzů nad 75 Hz zvýšilo proudové pozadí i amplituda proudového

šumu voltametrických křivek, čímž se zhoršila vyhodnotitelnost výšek píků. Proto byla vybrána frekvence 50 Hz.



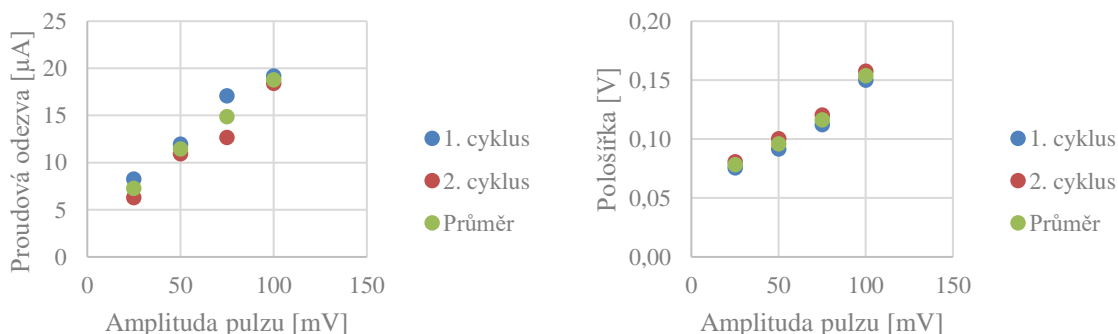
Obrázek 24: Závislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu na použité frekvenci pravoúhlého napěťového pulzu; měřeno metodou AdsCSWV-II

Amplituda SWV pulzu

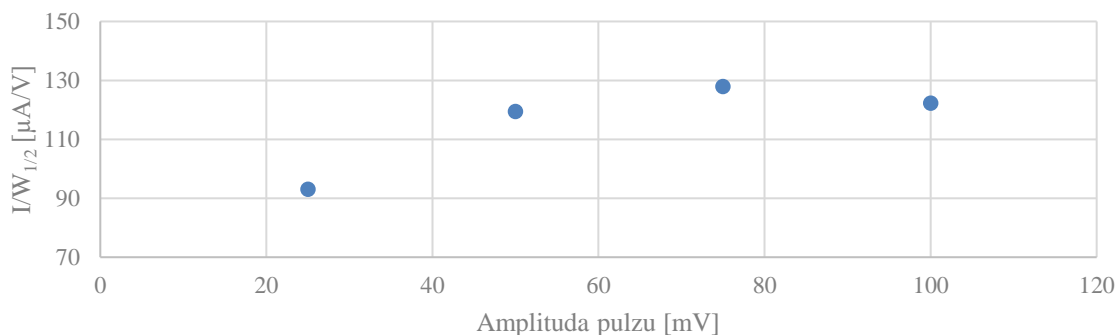
Posledním optimalizovaným parametrem voltametrické metody AdsCSWV-II pro SPE 110CNT byla amplituda pravoúhlého napěťového pulzu. Vyhodnocení bylo provedeno stejným způsobem jako s využitím SPE C110 (viz kap. 4.1.2; Amplituda SWV pulzu).

Zvyšováním vkládané amplitudy SWV pulzu docházelo téměř k lineárnímu růstu výšek proudové odezvy analytu (Obr. 25) a také k nárůstu pološířek sledovaného píku (Obr. 25). V prvním i ve druhém měřicím cyklu byly získány velmi podobné proudové hodnoty, s jednou výjimkou, a to při 75 mV, kdy se výšky píků mírně lišily.

Následným vydělením výšek píků jejich pološířkami byla získána poměrová závislost (Obr. 26). Nejvyšší, požadovaný poměr byl získán aplikací pulzů s amplitudou 75 mV. Tím byla dokončena optimalizace voltametrické metody pro analýzu fentanylu na elektrodách 110CNT, přičemž je metoda AdsCSWV-II pro SPE 110CNT popsána v kap. 3.2.3.



Obrázek 25: Závislosti výšky píku oxidačního produktu fentanylu na amplitudě pravoúhlého napěťového pulzu (vlevo), pološířky píku na amplitudě pulzu (vpravo); měřeno metodou AdsCSWV-II



Obrázek 26: Závislost poměru výšky píku oxidačního produktu fentanylu ku jeho pološířce na amplitudě pravoúhlého napěťového pulzu; měřeno metodou AdsCSWV-II

4.1.4 Kalibrační závislosti

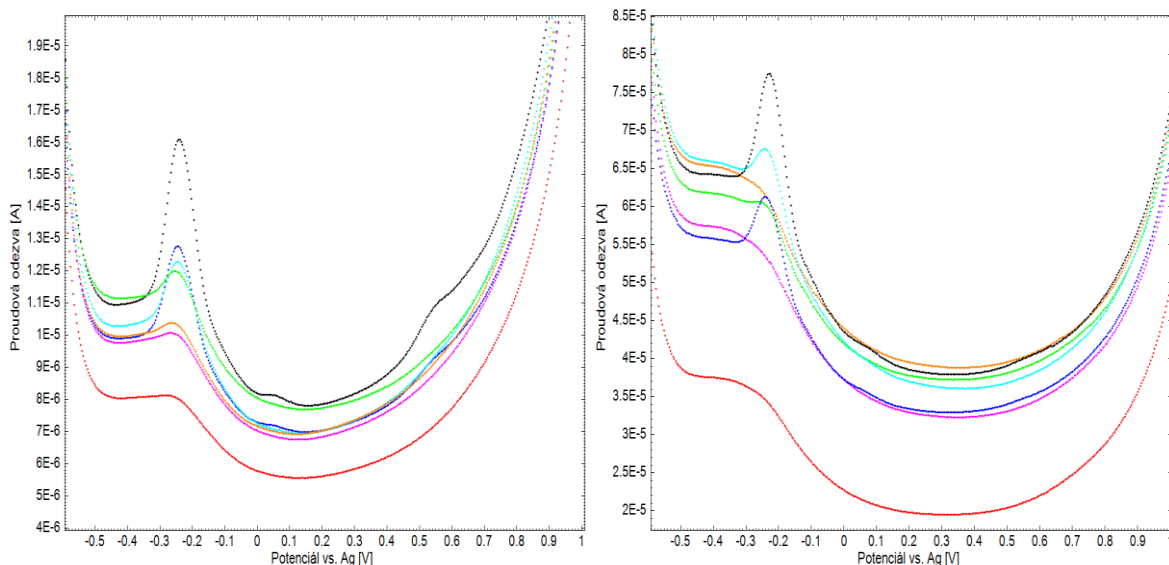
Po optimalizaci cyklických square-wave voltametrických metod na dvou typech SPE bylo na každém druhu analyzováno sedm kalibračních roztoků fentanylu v koncentračním rozsahu 100 $\mu\text{mol/l}$ – 1 $\mu\text{mol/l}$. Kalibrační sady A a B připravené dle kapitoly 3.2.1 byly měřeny pro každý roztok na nové elektrodě metodami AdsCSWV-II pro SPE C110 a AdsCSWV-II pro SPE 110CNT. Ze získaných výšek fentanylových či produktových píků byly následně sestaveny grafy kalibračních závislostí a s využitím softwaru QC-Expert 3.2 vypočteny statistické parametry, LOD a LOQ.

Elektrody C110

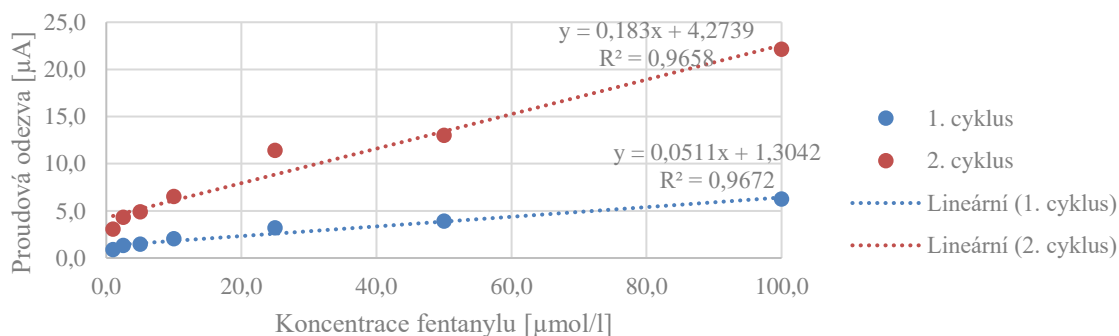
Analýzou kalibrační sady B (s přesně definovaným obsahem MeOH) vyvinutou metodou AdsCSWV-II pro SPE C110 byly získány celkem tři závislosti. První z nich byla kalibrační závislost vyhodnocená způsobem jako doposud, a to z druhého anodického skenu, z výšky píku (s vrcholem v oblasti -0,3 V až -0,2 V ku pseudoreferentní Ag elektrodě) produktu elektrochemické přeměny fentanylu. Proudů píků byly hodnoceny od základní linie vedené od potenciálu -0,4 V jako tečna k minimu voltametrické křivky za píkem analytu. Voltamogramy méně koncentrovaných roztoků byly zatíženy nárůstem kapacitního proudu v dané oblasti pod 0 V, čímž bylo ztíženo vyhodnocení analytického signálu.

Druhé anodické skeny (Obr. 27) poskytly kalibrační závislost (Obr. 28), která byla proložena regresní přímkou s rovnicí $I [\mu\text{A}] = 0,051c [\mu\text{mol/l}] + 1,30$ pro první měřicí cyklus a $I [\mu\text{A}] = 0,183c [\mu\text{mol/l}] + 4,274$ pro druhý cyklus. *LOD* a *LOQ* byly vypočteny z parametrů regresních přímek v koncentračním rozsahu 1 – 10 $\mu\text{mol/l}$. Pro první cyklus byla z parametrů rovnice $I [\mu\text{A}] = 0,1081c [\mu\text{mol/l}] + 0,1179$ vypočtena hodnota *LOD* = 2,7 $\mu\text{mol/l}$ a *LOQ* = 9,2 $\mu\text{mol/l}$, pro druhý cyklus, z parametrů rovnice $I [\mu\text{A}] = 0,3133c [\mu\text{mol/l}] + 0,3563$, hodnota *LOD* = 2,6 $\mu\text{mol/l}$ a *LOQ* = 8,8 $\mu\text{mol/l}$. Vyvinutá analytická metoda tedy

není vhodná pro stanovení stopových koncentrací fentanylu, lépe se hodí pro kvalitativní analýzu, případně pro semikvantitativní určení obsahu fentanylu v roztoku.

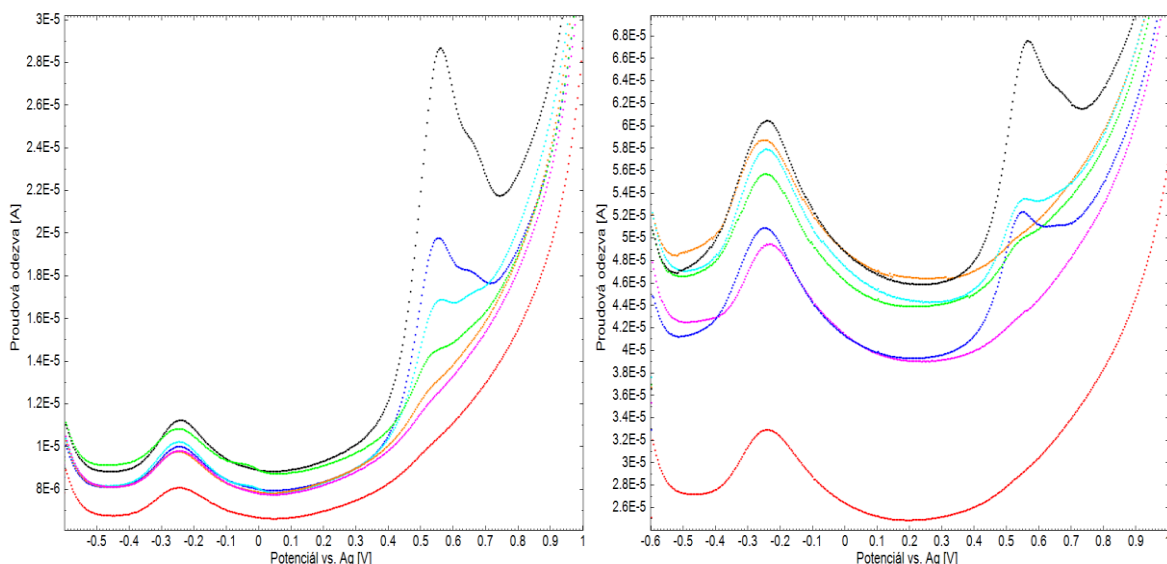


Obrázek 27: AdsCSW voltamogramy (druhé anodické skeny) kalibračních roztoků fentanylu (sada B); 1. cyklus (vlevo), 2. cyklus (vpravo); černá – 100 $\mu\text{mol/l}$, tm. modrá – 50 $\mu\text{mol/l}$, sv. modrá – 25 $\mu\text{mol/l}$, zelená – 10 $\mu\text{mol/l}$, oranžová – 5 $\mu\text{mol/l}$, růžová – 2,5 $\mu\text{mol/l}$, červená – 1 $\mu\text{mol/l}$; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110

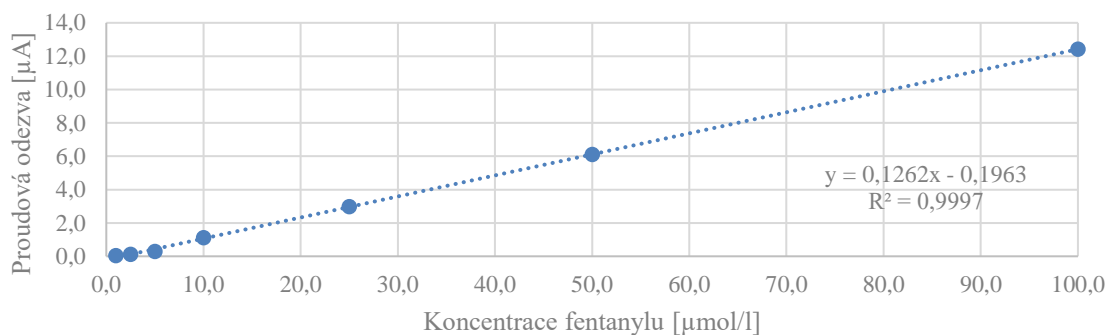


Obrázek 28: Kalibrační závislosti fentanylu (kalibrační sada B) pro druhé anodické skeny; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110

Z prvních anodických skenů 1. cyklu (Obr. 29) byly získány další dvě závislosti. V oblasti nad 0,5 V se vyskytují píky oxidace fentanylu, jejichž vyhodnocením byla získána lineární kalibrační křivka (Obr. 30) s rovnicí $I [\mu\text{A}] = 0,1262c [\mu\text{mol/l}] - 0,1963$ a koeficientem determinace $R^2 = 0,9997$, $LOD = 0,95 \mu\text{mol/l}$ a $LOQ = 3,17 \mu\text{mol/l}$. Problémem je, že tuto závislost lze pro kvantitativní analýzu využít pouze v případě, kdy se v analyzovaném roztoku nachází jen fentanyl, jelikož např. testovaný heroin či kokain vykazují oxidační píky ve stejné potenciálové oblasti.

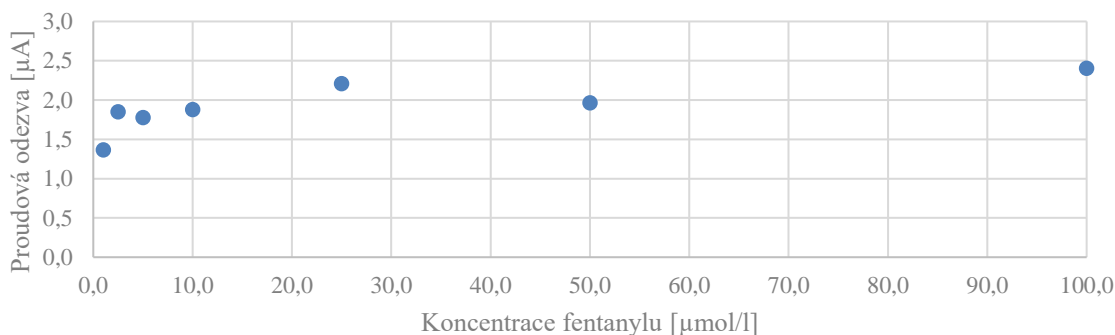


Obrázek 29: AdsCSW voltamogramy (první anodické skeny) kalibračních roztoků fentanylu (sada B); 1. cyklus (vlevo), 2. cyklus (vpravo); černá – 100 $\mu\text{mol/l}$, tm. modrá – 50 $\mu\text{mol/l}$, sv. modrá – 25 $\mu\text{mol/l}$, zelená – 10 $\mu\text{mol/l}$, oranžová – 5 $\mu\text{mol/l}$, růžová – 2,5 $\mu\text{mol/l}$, červená – 1 $\mu\text{mol/l}$; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110



Obrázek 30: Kalibrační závislost fentanylu (sada B) pro první anodické skeny 1. cyklu; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110

V průběhu experimentů byla pozorována zajímavá vlastnost různě koncentrovaných roztoků fentanylu. V oblasti okolo -0,25 V vs. Ag byly optimalizovanou metodou využívající elektrolýzy před voltametrickým měřením pozorovány proudové odezvy oxidačních produktů fentanylu téměř nezávislé na koncentraci analyzovaného roztoku fentanylu (Obr. 31). Průměrná výška sledovaného píku byla $1,92 \mu\text{A} \pm 0,33 \mu\text{A}$. Tento proudový pík by mohl být využitelný pro kvalitativní analýzu fentanylu ve vzorku.

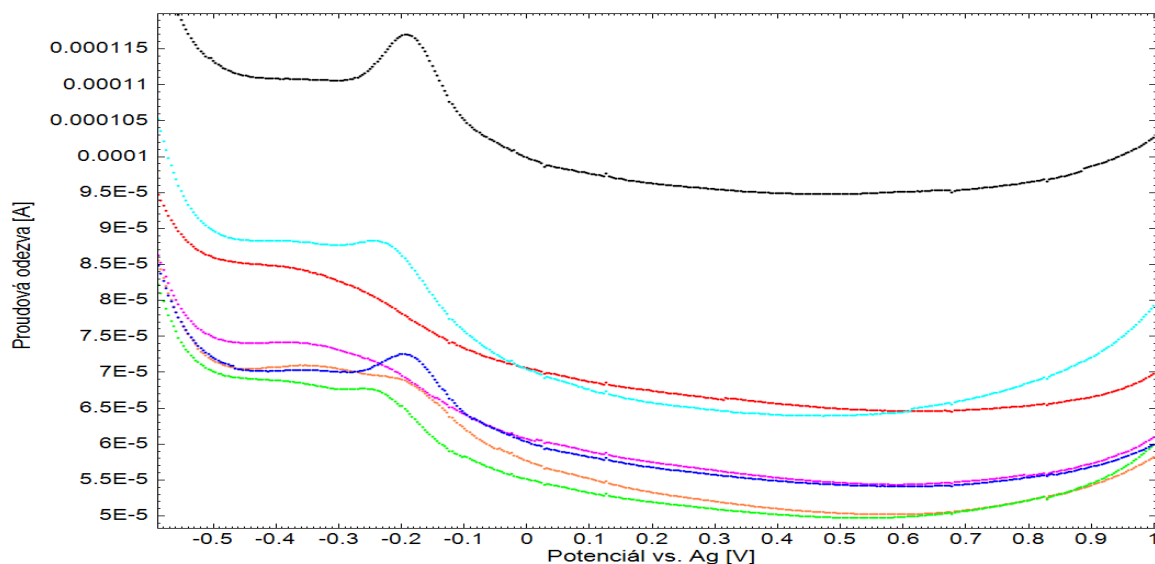


Obrázek 31: Grafická závislost výšek píků oxidačního produktu fentanylu, získaných s kalibrační sadou B v prvních anodických skenech 1. cyklu; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110

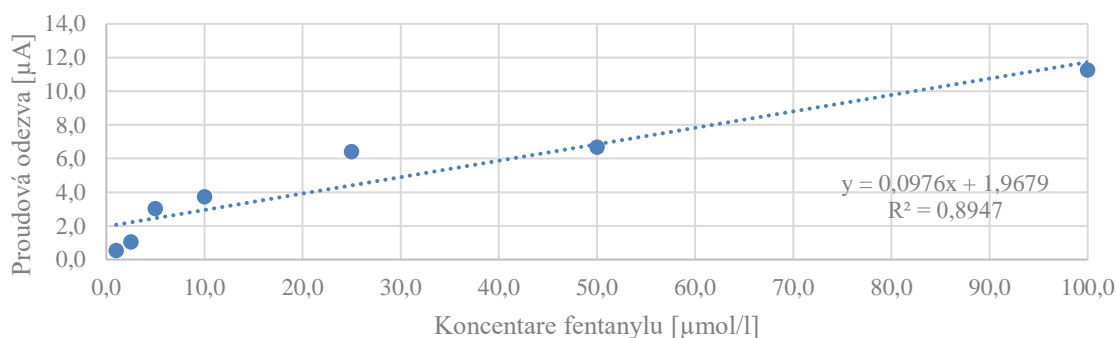
Elektrody 110CNT

Na elektrodách typu 110CNT byla metodou AdsCSWV-II pro SPE 110CNT analyzována kalibrační sada A s různým obsahem methanolu v roztocích. Důvodem měření sady A byl fakt, že byly získány 2x vyšší proudové odezvy oproti sadě B. První čtyři roztoky byly vyhodnocovány od $-0,35$ V a tři nejméně koncentrované od $-0,3$ V, jelikož se částečně posunul pík analytu pravděpodobně z důvodu nízkého obsahu MeOH v roztocích a rostoucího vlivu kapacitního proudu v dané oblasti. Zároveň byly hodnoceny pouze druhé anodické skeny prvních cyklů z důvodu jak naměřených vyšších signálů, tak výrazného zhoršení analytického signálu ve druhých opakování, které bylo způsobeno vyšším proudovým pozadím vlivem kapacitního proudu (Obr. 32, přiblížen viz Příloha 1).

Kalibrační závislost (Obr. 33) získaná s elektrodami 110CNT byla proložena regresní přímkou s rovnicí $I [\mu\text{A}] = 0,098c [\mu\text{mol/l}] + 1,968$. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočteny z parametrů regresní přímky v koncentračním rozsahu $1 - 10 \mu\text{mol/l}$ ($I [\mu\text{A}] = 0,3631c [\mu\text{mol/l}] + 0,4022$) s výsledkem $LOD = 4,6 \mu\text{mol/l}$ a $LOQ = 15,3 \mu\text{mol/l}$. Stejně jako v případě použití SPE C110 je metoda vhodná spíše pro kvalitativní, případně semikvantitativní analýzu.



Obrázek 32: AdsCSW voltamogramy (druhé anodické skeny) kalibračních roztoků fentanylu (sada A) 1. měřicího cyklu; černá – 100 $\mu\text{mol/l}$, tm. modrá – 50 $\mu\text{mol/l}$, sv. modrá – 25 $\mu\text{mol/l}$, zelená – 10 $\mu\text{mol/l}$, oranžová – 5 $\mu\text{mol/l}$, růžová – 2,5 $\mu\text{mol/l}$, červená – 1 $\mu\text{mol/l}$; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE 110CNT



Obrázek 33: Kalibrační závislost fentanylu (kalibrační sada A) pro druhé anodické skeny 1. cyklu; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE 110CNT

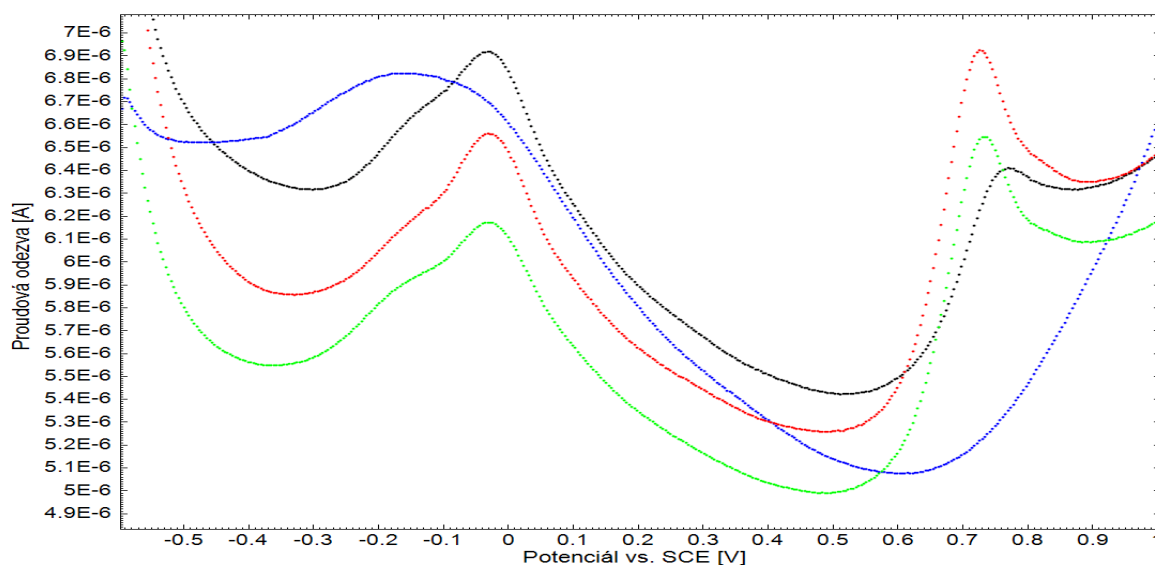
4.1.5 Směsné roztoky

Dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1 byly připraveny dva typy směsných roztoků, a to fentanylu s heroinem a fentanylu s kokainem. Směsi byly analyzovány pouze na SPE C110, jelikož na elektrodách 110CNT nebyly získávány relevantní signály (skeny s velmi vysokým proudovým pozadím nevhodným pro analytické využití). Příčinu tohoto jevu se nepodařilo zjistit.

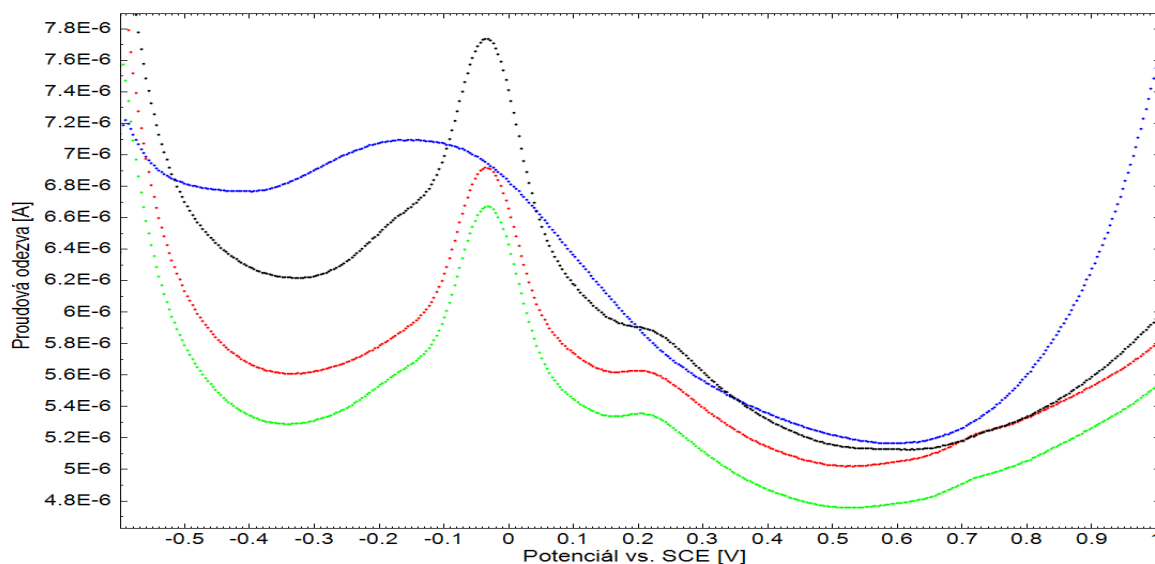
V průběhu měření roztoků s heroinem byly na voltamogramech pozorovány neznámé vlny/píky. Ty byla snaha odhalit analýzami možných příměsí, prekurzorů či rozkladných produktů studovaných látek. K tomu bylo využito aplikace metody AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE. Jako pracovní elektroda byla použita GCE, jako pomocná platinový drát a jako referentní SCE. Postup přípravy a uchování elektrod byl popsán v kapitole 3.2.2,

experimentální postup v kap. 3.2.3. Pro každou substanci byly změřeny tři vzorky, ze kterých byly získány potenciály a pořadí přítomných voltametrických píků. Z nich byly následně vypočteny průměry, které byly následně srovnávány a měly napomoci k určení „nečistot“ ve směsích.

Obecně lze tvrdit, že vyvinutá metoda není optimální pro použití na GCE, jelikož se v oblasti od -0,3 V do 0,3 V vyskytuje vlna kapacitního proudu zvyšující proudové pozadí voltametrických křivek (Obr. 34, křivka ZE). V případě fentanylu (Obr. 34) byly pozorovány dva píky při -0,026 V (elektrolytický produkt fentanylu) a 0,736 V (fentanyl). Analýza norfentanylu (Obr. 35) poskytla také dva píky elektrolytické oxidace norfentanylu, první při -0,035 V a druhý okolo 0,233 V. Zásadním rozdílem však byl fakt, že se vyvinutá metoda prokázala jako daleko citlivější právě pro detekci norfentanylu. Jeho odezvy byly téměř dvojnásobné oproti fentanylu.

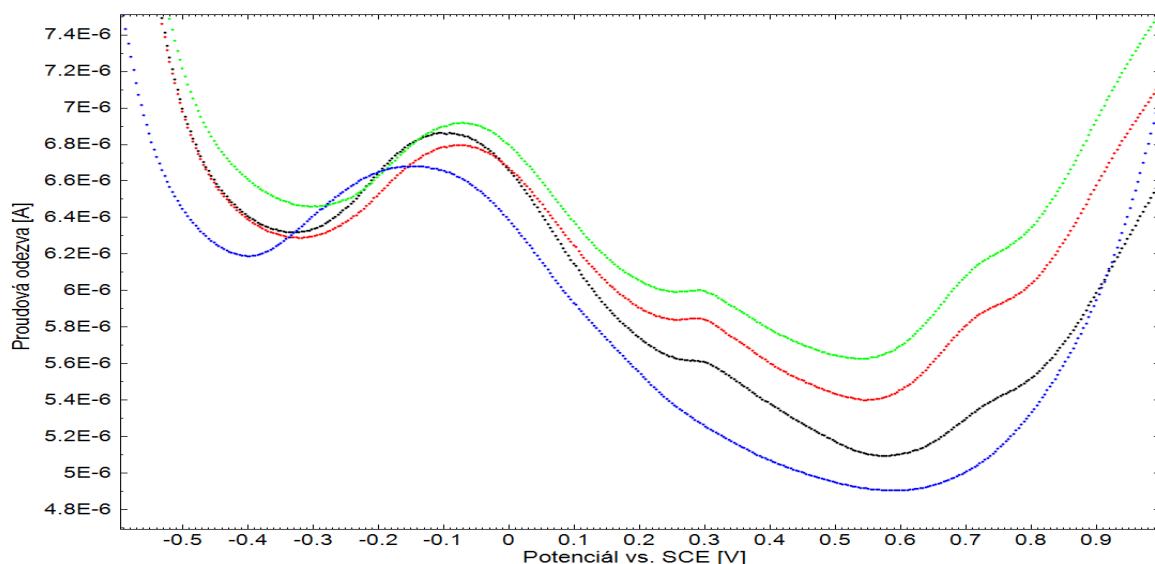


Obrázek 34: AdsCSW voltamogramy prvních anodických skenů roztoku fentanylu (0,1 mmol/l); měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE vs. SCE v roztoku ZE; modrá – ZE, černá – 1. opakování, červená – 2. opakování, zelená – 3. opakování



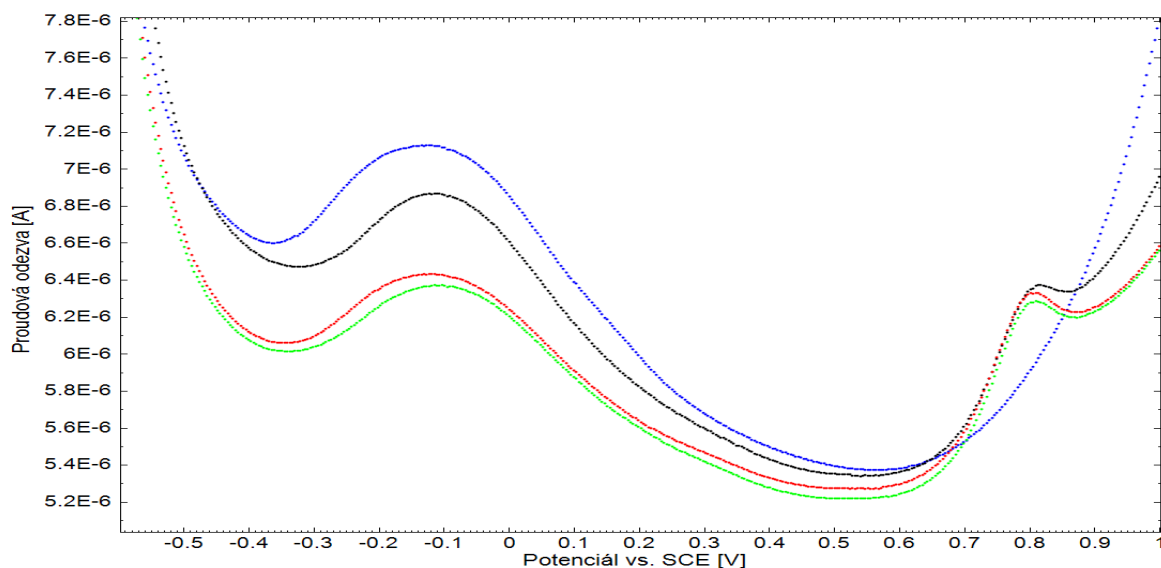
Obrázek 35: AdsCSW voltamogramy prvních anodických skenů roztoku norfentanylu (0,1 mmol/l); měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE vs. SCE v roztoku ZE; modrá – ZE, černá – 1. opakování, červená – 2. opakování, zelená – 3. opakování

Analýzou roztoku morfinu (0,1 mmol/l) byly získány voltamogramy (Obr. 36), které v již komentované oblasti se zvýšeným kapacitním proudem téměř opisovaly křivku ZE. Za tímto potenciálovým rozsahem byly pozorovány dvě vlny postupné oxidace morfinu, první při 0,306 V a druhá okolo 0,717 V.



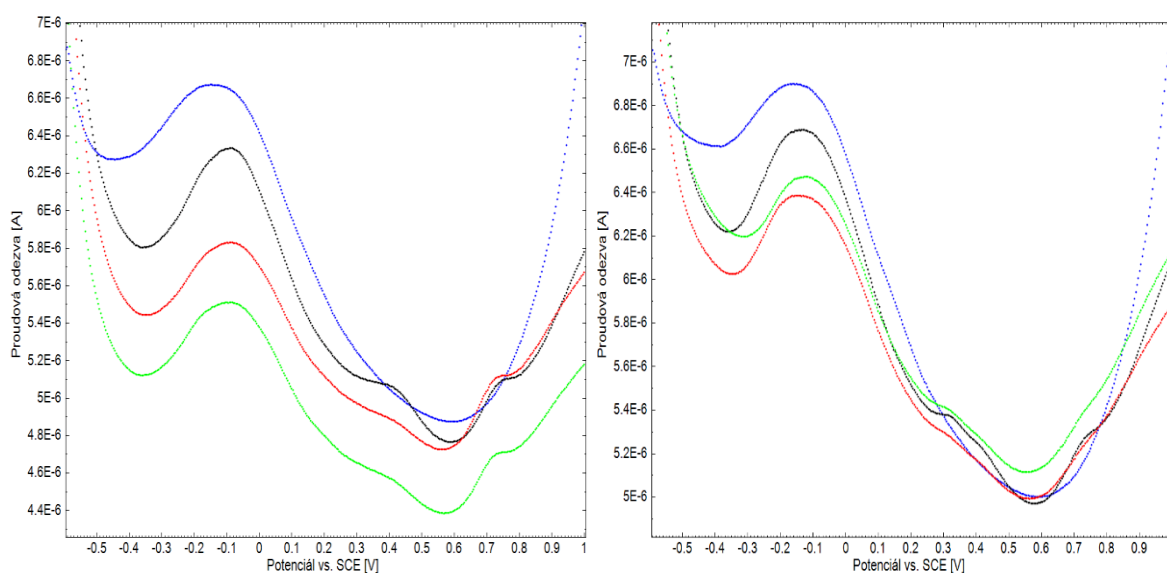
Obrázek 36: AdsCSW voltamogramy prvního anodického skenu roztoku morfinu (0,1 mmol/l); měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE vs. SCE v roztoku ZE; modrá – ZE, černá – 1. opakování, červená – 2. opakování, zelená – 3. opakování

Roztok kokainu poskytl ve všech třech opakovaných měřeních velice podobné voltamogramy (Obr. 37) s jediným oxidačním píkem při potenciálu 0,794 V.



Obrázek 37: AdsCSW voltamogramy prvního anodického skenu roztoku kokainu (0,1 mmol/l); měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE vs. SCE v roztoku ZE; modrá – ZE, černá – 1. opakování, červená – 2. opakování, zelená – 3. opakování

Nejkomplikovanější voltamerní chování bylo pozorováno u heroinu. Na Obr. 38 si lze všimnout rozdílnosti ve voltamogramech při použití roztoku čerstvě připraveného a deset dnů starého. V čerstvě připraveném roztoku byly zřetelné dva píky při 0,416 V (pravděpodobně přísluší 6-monoacetylmorfinu) a 0,720 V (heroinu), zatímco ve starším vzorku byl navíc pozorován ještě třetí pík při 0,323 V (pravděpodobně morfin). To znamená, že se heroin v alkalickém prostředí (BRP o pH 8,5) s časem rozkládá (hydrolyzuje) a není tak stabilní, jako v zásobním methanolickém roztoku.



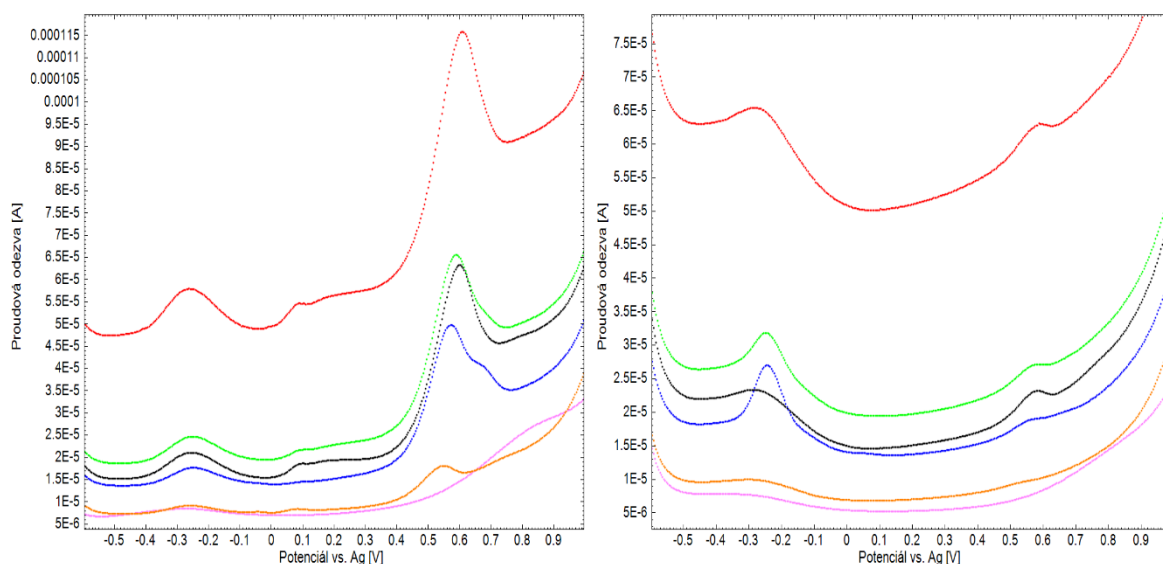
Obrázek 38: AdsCSW voltamogramy prvních anodických skenů roztoku čerstvě připraveného heroinu (vlevo) a 10 dnů starého heroinu (vpravo) – oba 0,1 mmol/l; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110 s GCE vs. SCE v roztoku ZE; modrá – ZE, černá – 1. opakování, červená – 2. opakování, zelená – 3. opakování

Ze zjištěných poznatků bylo možné dále vycházet při voltametrické analýze směsí opioidů a dle pořadí píků naměřených na SPCE usuzovat o jaké látky/nečistoty se ve směsích jedná. Problematické byly, jak již bylo psáno výše, zejména směsi s heroinem.

Směs fentanylu a heroinu

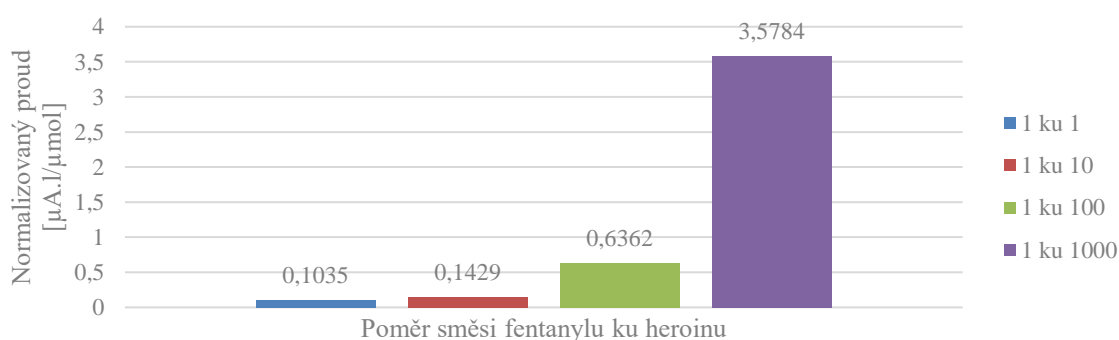
Analýzou čtyř směsných roztoků o poměrech fentanylu ku heroinu 1:1, 1:10, 1:100 a 1:1000 byly získány AdsCSW voltamogramy ukázané na Obr. 39. Lze si všimnout výskytu proudových signálů výše zkoumaných nečistot. Mezi hlavními píky produktu oxidace fentanylu v záporné oblasti potenciálu a směsného píku fentanylu s heroinem v kladné oblasti se nachází dvě malé odezvy. Jelikož bylo zjištěno, že ve vzorku fentanylu se žádné píky v této oblasti nevyskytují, právě analýza heroinu poukázala na jeho dva možné degradační produkty. Okolo 0,1 V se pravděpodobně vyskytuje morfin a při zhruba 0,2 V 6-monoacetylmorfin.

Dále bylo možné vycházet z poznatků získaných během analýzy kalibračních roztoků, kdy bylo pozorováno, že výška proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu v prvním anodickém skenu, nacházející se v oblasti mezi -0,3 V až -0,2 V, téměř nezávisí na koncentraci fentanylu v roztoku. Směsné roztoky poskytly v dané oblasti průměrnou odezvu oxidačního produktu fentanylu $6,25 \mu\text{A} \pm 2,46 \mu\text{A}$.



Obrázek 39: AdsCSW voltamogramy směsných roztoků fentanylu s heroinem (F:H); první anodický sken (vlevo), druhý anodický sken (vpravo); měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110; růžová – ZE, oranžová – roztok heroinu (0,1 mmol/l), modrá – 1:1, zelená – 1:10, červená – 1:100, černá – 1:1000

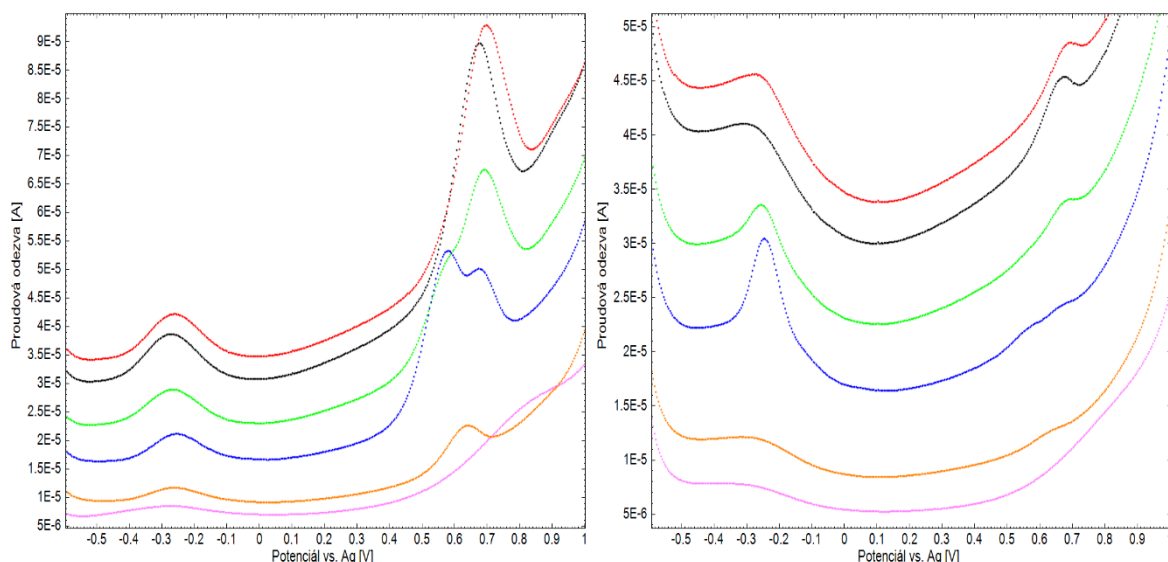
Z druhých anodických skenů prvního cyklu byly vyhodnoceny píky produktu oxidace fentanylu (odečtením proudu píku od základní linie proložené od potenciálu -0,4 V jako tečna k minimu voltametrické křivky za píkem analytu). Následně byly z důvodu rozdílných koncentrací opioidů ve směsných roztocích vypočteny normalizované proudy vztažené na reálnou koncentraci fentanylu v roztoku. Hodnoty naměřených proudů produktu oxidace fentanylu se vydělily koncentrací fentanylu ve směsi a výsledné hodnoty byly vyneseny do grafu (Obr. 40). Se zvyšujícím se poměrem koncentrace heroinu ku fentanylu se zároveň zvyšovala i hodnota normalizovaného proudu. Důvodem pravděpodobně bylo současné zvyšování kapacitního proudu v dané oblasti výskytu analyzovaných píků, který ztěžoval jejich vyhodnocení. Dalším možným vysvětlením mohl být lidský faktor, tedy chyba při přípravě směsí.



Obrázek 40: Porovnání normalizovaných proudů anodických píků produktu oxidace fentanylu zaznamenaných ve směsných roztocích fentanylu s heroinem; druhý anodický sken prvního cyklu; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110

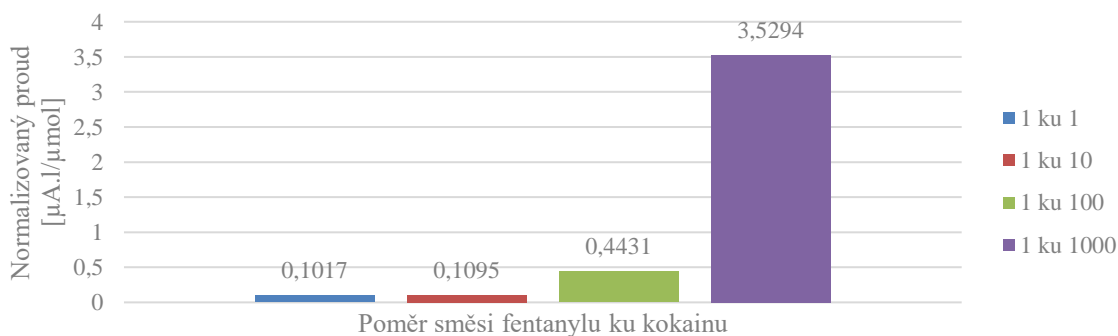
Směs fentanylu s kokainem

Analýzou směsí fentanylu s kokainem byly získány jednodušší voltametrické křivky (Obr. 41) než v případě směsí s heroinem. V prvním anodickém skenu se opět potvrdila teorie nezávislosti výšky píku oxidačního produktu fentanylu s vrcholem v blízkosti -0,25 V na koncentraci fentanylu ve směsi. Byla získána průměrná odezva $6,63 \mu\text{A} \pm 1,59 \mu\text{A}$. V oblasti okolo 0,7 V bylo možné sledovat proudové odezvy oxidace fentanylu a kokainu. Protože se kokain oxiduje při vyšším potenciálu než fentanyln, byly na voltamogramech patrné dva píky při srovnatelných koncentracích obou opioidů v roztoku.



Obrázek 41: AdsCSW voltamogramy směrných roztoků fentanylu s kokainem (F:K); první anodický sken (vlevo), druhý anodický sken (vpravo); měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110; růžová – ZE, oranžová – roztok kokainu (0,1 mmol/l), modrá – 1:1, zelená – 1:10, červená – 1:100, černá – 1:1000

Z druhého anodického skenu byly způsobem popsaným v předešlé kapitole odečteny výšky píků fentanylových produktů. Následně byly vztaženy na reálnou koncentraci fentanylu ve vzorku, tzn. normalizovány, a vyneseny do grafické závislosti (Obr. 42). Výsledek byl velmi podobný, jako poskytly směsi s heroinem. Se zvyšujícím se poměrem kokainu ve směsi rostl kapacitní proud v oblasti, ve které se odečítá odezva produktu elektrochemické přeměny fentanylu, čímž se opět ztěžovalo vyhodnocení daného píku. Nárůst byl v podstatě totožný pro oba typy směsí, a proto by mohla být vyloučena potenciální chyba, způsobená lidským faktorem.



Obrázek 42: Porovnání normalizovaných proudů anodických píků produktu oxidace fentanylu zaznamenaných ve směrných roztocích fentanylu s kokainem; druhý anodický sken prvního cyklu; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE C110

Z výše uvedených poznatků vyplývá že byla vytvořena a optimalizována metoda AdsCSWV-II pro SPE C110 pro kvalitativní a kvantitativní analýzu fentanylu jako samostatného analytu s využitím SPE C110. Zároveň ji lze aplikovat jako kvalitativní a semikvantitativní metodu pro detekci fentanylu ve směsných vzorcích. Touto metodou s využitím SPE C110 byla testována detekce fentanylu ve směsných roztocích s heroinem a kokainem ve čtyřech různých objemových poměrech a ve všech se jej podařilo spolehlivě detekovat.

4.2 Chromatografická měření

Vyvinutá voltametrická metoda popsaná v předchozích kapitolách je vhodná pro screening vzorků drog. Umožňuje detekovat příměsi fentanylu v heroinu a kokainu, případně i v jiných opioidech. Pro jednoznačné prokázání fentanylu v takových směsích je potřeba mít k dispozici ještě další, nezávislou analytickou metodu. Proto byla věnována pozornost vývoji chromatografické metody pro analýzu směsí obsahujících fentanyl, jeho degradační produkt norfentanyl, kokain, heroin a mofrin, jako derivát a současně jeden z degradačních produktů heroinu.

První chromatografické experimenty vycházely z diplomové práce Beáty Pelikánové [42], která se zabývala vývojem HPLC-UV-ECD metody pro separaci fentanylu a jeho analog (furanylfentanylu, thiofentanylu, norfentanylu, carfentanilu a sufentanilu). Vyvinutou metodou se nepodařilo detekovat norfentanyl, proto byla v této diplomové práci věnována pozornost nalezení podmínek pro separaci a detekci norfentalu ve směsi s fentanylem a dalšími vybranými opioidy. K těmto účelům byly použity dva typy stacionární fáze, oktadecylová (C₁₈) a diisopropyl-3-kyanopropyllová (CN-) fáze na silikagelovém nosiči.

Pro kapitolu 4.2.2 byla inspirací diplomová práce Nikoly Mikulové [43], ve které se autorka zabývala separací morfinu, kodeinu a heroinu s využitím CN-kolony a MF složené z NaH₂PO₄ (20 mmol/l) o pH 6: ACN, 80 : 20. Metoda byla vybrána, za účelem ověření, zda bude vhodná také pro další bazické látky studované v této práci.

V obou výše zmíněných pracích byla použita jiná vlnová délka pro UV detekci opioidů. Také bylo možné sledovat rozdíl ve výškách signálů, tj. mnohonásobné zvýšení signálů při měření s 210 nm oproti 255 nm. Z toho důvodu byla změřena UV spektra (Příloha 2) pro každý analyt (o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ v ACN) za účelem zjištění vhodné vlnové délky pro detekci opioidů. Jako vhodná byla vybrána vlnová délka 225 nm.

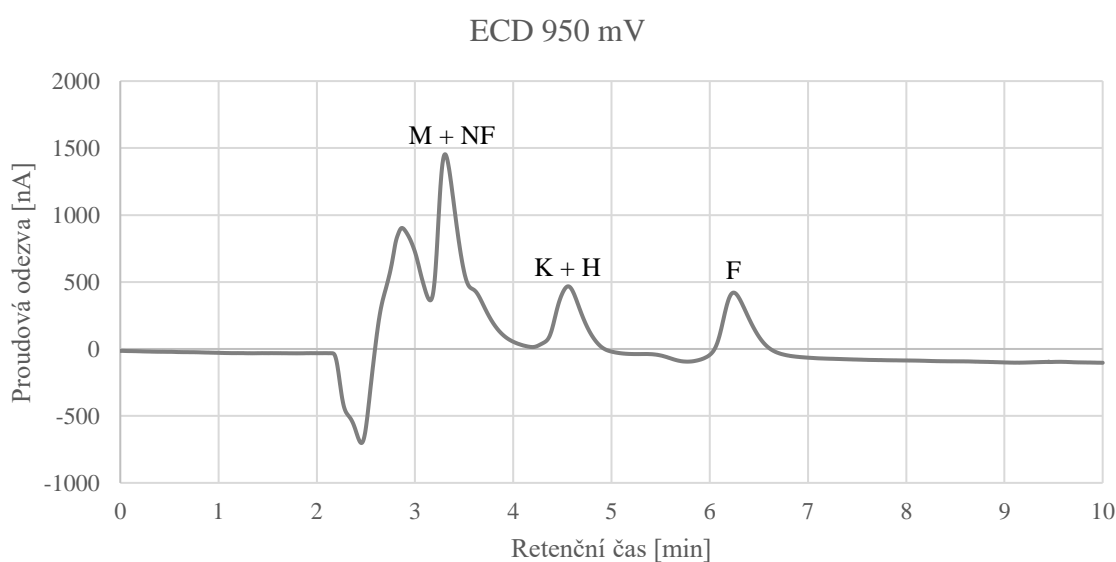
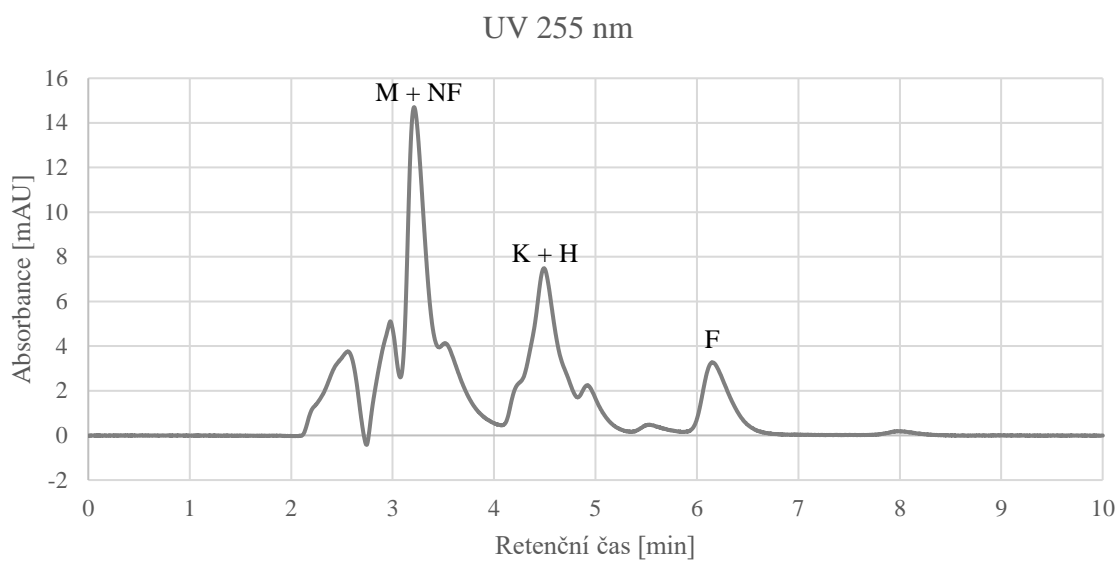
Volba vhodného potenciálu dvou ECD elektrod byla ulehčena. Důvodem byla chronologie experimentů, kdy byla voltametrická část změřena dříve než HPLC část. V kapitole 4.1.5 lze nalézt GCE voltamogramy (vs. SCE) každého studovaného opioidu. Z tohoto důvodu byl nastaven na první ECD elektrodu potenciál (950 mV), který byl dostatečně vysoký na přeměnu všech analytů.

4.2.1 C₁₈ kolona

S kolonou C₁₈ byly testovány tři typy MF o různých poměrech mravenčanové vodné (HCOONH₄ o c = 50 mmol/l, pH 9) a organické složky (ACN), a to v poměrech 40 : 60, 45 : 55 a 50 : 50. K připraveným MF byl přidán KCl, aby v celém objemu byla jeho koncentrace 50 mmol/l. Měření probíhalo s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min, UV detekcí při 255 nm, přičemž na elektrody v duálním coulometrickém detektoru bylo vloženo napětí 950 mV a 1050 mV.

S využitím MF 40 : 60 byly analyzovány roztoky jednotlivých opioidů (morfinu, norfentanylu, kokainu, heroinu, fentanylu) a jejich směsi. Koncentrace všech analytů byla v každém roztoku 50 μmol/l. Z UV chromatogramů byly získány t_R jednotlivých analytů, aby bylo možné určit pořadí látek v chromatogramu směsného roztoku (Obr. 43). Bylo zjištěno, že norfentanyl i morfin se eluují ve stejný čas (t_R = 3,2 min), který je blízký mrtvému času (2,1 min). Stejně tak docházelo ke koeluci píků heroinu (t_R = 4,4 min) a kokainu (t_R = 4,5 min). Jediný fentanyl se eluoval odděleně v čase 6,1 min. Mimo uvedené píky analytů byly v chromatogramech pozorovány i píky neidentifikovaných nečistot.

Se zvyšujícím se obsahem vodné složky v MF se zvyšovala retence opioidů na koloně a zlepšovala se poněkud jejich separace. Chromatogramy získané s mobilními fázemi s poměry vodné a organické složky 45 : 55 a 50 : 50 jsou uvedeny v příloze 3 a 4. Jelikož zlepšení separace nebylo dostatečné, nebyly analyzovány roztoky samostatných analytů a proto nebyly v přílohách označeny polohy píků látek. Z výše zmíněných důvodů se dále nepokračovalo v měření na C₁₈ koloně a také nebyly vyhodnoceny kvalitativní parametry jako rozlišení či retenční faktor.



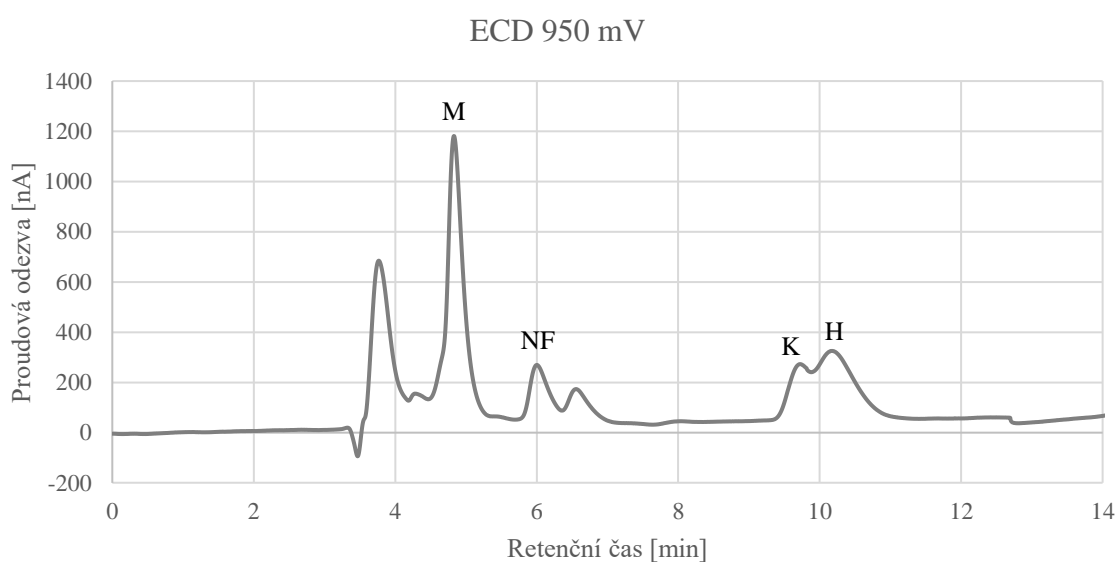
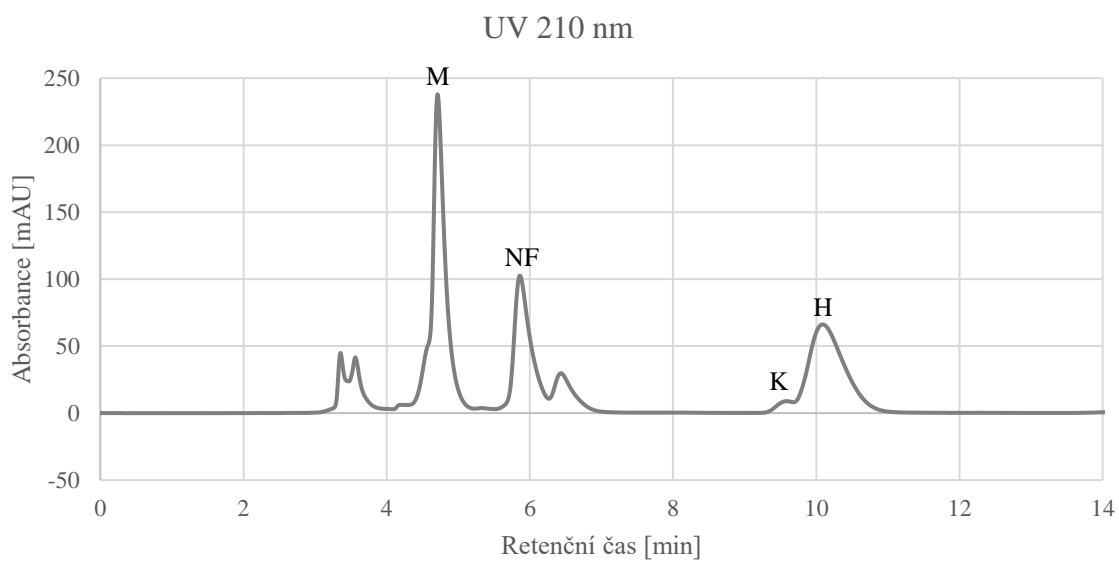
Obrázek 43: Chromatogramy směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); C_{18} kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$ a pH 9) : ACN, 40 : 60 (ve směsi 50 mmol/l KCl), průtoková rychlost 0,5 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl

4.2.2 CN-kolona (NaH₂PO₄)

Z důvodu nedostatečné separace s využitím C₁₈ kolony byla použita polárnější kyano stacionární fáze, která je vhodnější pro analýzu bazických opioidů. [29, 31] Jako MF byla využita směs NaH₂PO₄ ($c = 20$ mmol/l), pH 6 s ACN o poměru 80 : 20 s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. UV detektor byl nastaven pro měření s vlnovou délkou 210 nm a na obě elektrody v duální ECD cele byl aplikován potenciál 950 mV.

Stejně jako v kapitole 4.2.1 byly analyzovány roztoky jednotlivých opioidů (50 μmol/l) a směsný roztok (každý analyt v koncentraci 50 μmol/l). Z chromatogramů jednotlivých analytů byly opět zjištěny jejich retenční časy, které pomohly určit eluční pořadí v chromatogramu směsného roztoku.

Z chromatogramů (Obr. 44) je patrné, že zvolené podmínky poskytly lépe oddělený pík prvních eluovaných látek od mrtvého času (UV – 3,28 min a ECD – 3,34 min). Těmi je směs morfinu a nečistot ze vzorků kokainu a fentanylu ($t_R = 4,7$ min). Další pík ($t_R = 5,9$ min) představuje norfentanyl, který je téměř oddělený od jednoho z píků ($t_R = 6,5$ min) neidentifikovaných nečistot. V retenčním čase kolem 10 min koeluují kokain, heroin a nečistota fentanylu. Detekovat samotný fentanyl se ve zvolené délce analýzy (20 min) nepodařilo. Za pozornost stojí rozdíl v poměru signálu norfentanylu v UV a ECD detektoru. Důvodem je relativně špatná oxidovatelnost norfentanylu za daných podmínek. Obecně lze však říct, že výše popsaný systém neposkytuje vhodné podmínky pro separaci studované směsi opioidů, a proto nebyla dále využívána MF s obsahem dihydrogenfosforečnanu sodného.



Obrázek 44: Chromatogramy směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); CN- kolona, MF: NaH_2PO_4 ($c = 20 \text{ mmol/l}$ a pH 6) : ACN, 80 : 20, průtoková rychlost $0,5 \text{ ml/min}$; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin

3.2.3 CN-kolona (HCOONH₄ + KCl)

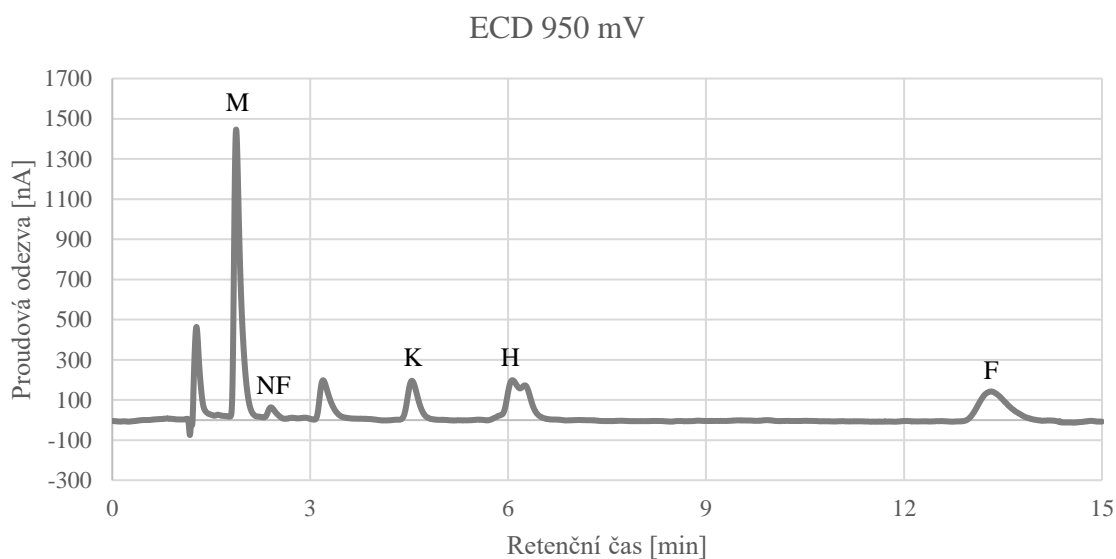
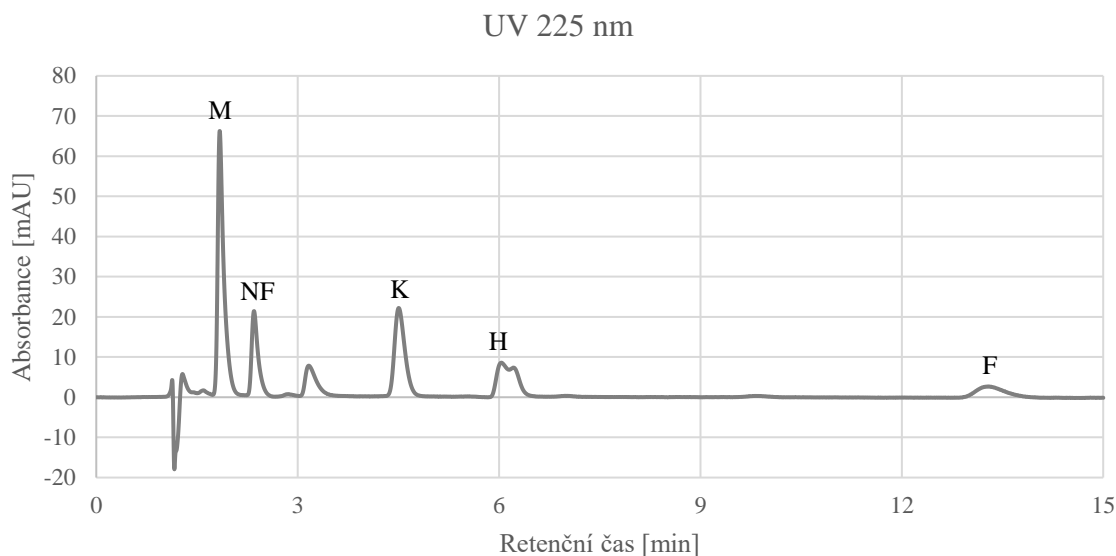
V kombinaci CN-kolony a mravenčanové složky MF bylo provedeno nejvíce experimentů. Do roztoku HCOONH₄ (50 mmol/l) byl přidán KCl (50 mmol/l), a acidita směsi byla upravena na pH 7. Tato vodná složka byla míchána s ACN v objemových poměrech 70 : 30, 80 : 20 a 85 : 15. V případě použití MF 70 : 30 byla nastavena průtoková rychlost na 0,5 ml/min, UV detekce na 225 nm a na obě ECD elektrody byl vložen potenciál 950 mV. V případě použití MF s vyšším obsahem vodné složky (80 % a 85 %) byla nastavena průtoková rychlost na 1 ml/min, UV detekce na 225 nm, na první ECD elektrodu byl aplikován potenciál 950 mV a na druhou 1000 mV.

V chromatogramu směšného vzorku (Příloha 5), zaznamenaném s mobilní fází o objemovém poměru 70 : 30 (HCOONH₄ + KCl, pH 7 : ACN), se jako první eluuje morfin ($t_R = 4$ min) s nímž koeluuje norfentanyl ($t_R = 4,5$ min) a neidentifikovaná nečistota z heroinu ($t_R = 4,9$ min). Následují píky kokainu ($t_R = 6,1$ min) koelujícího s heroinem ($t_R = 6,5$ min). Fentanyl poskytl odezvu v čase 9,5 min a za ním se objevil pík, jehož původ se nepodařilo identifikovat, jelikož danému retenčnímu času neodpovídal žádný pík v chromatogramech jednotlivých opioidů.

Analýzou opioidů s využitím mobilní fáze s 80% obsahem vodné složky byla získána lepší separace (Příloha 6), avšak stále se nejednalo o separaci na základní linii. Stejně jako v předešlém případě byly analyzovány jednotlivě každý opioid a směsný roztok. Z retenčních časů analytů v UV chromatogramech bylo získáno pořadí eluce studovaných látek ve směsném vzorku. Morfin byl eluován jako první v čase 2,3 min. Stejně jako v předchozím případě se v těsné blízkosti za ním (s nedostatečným rozlišením) eluoval norfentanyl ($t_R = 2,9$ min) a nečistota z heroinu ($t_R = 3,4$ min). V retenčním čase 4,6 min byl detekován kokain. Následovaly dva neúplně separované píky heroinu ($t_R = 5,6$ min) a neidentifikované složky směsi ($t_R = 6,1$ min). V 11. minutě docházelo k eluci fentanylu. Opět lze spolehlivě sledovat rozdíl v signálu norfentanylu v UV a ECD, což jen potvrzuje přítomnost daného analytu.

Poslední zkoumanou kombinací mravenčanové složky s pH 7 a acetonitrilu byla MF s objemovým poměrem 85 : 15 (Obr. 45). Zmíněnou úpravou došlo k dalšímu prodloužení retenčních časů a zlepšení separace analytů, především problematické trojice nejméně zadržovaných látek. Opět byly hodnoceny UV chromatogramy za účelem určení retenčních časů analytů (Příloha 7 a 8). Morfin byl eluován v čase 1,8 min, dobře oddělený od píku v mrtvém čase (1,1 min). Další v pořadí byl eluován norfentanyl ($t_R = 2,3$ min). Následoval

pík nečistoty z heroinu ($t_R = 3,1$ min) a pík kokainu ($t_R = 4,5$ min). Po šesté minutě byl detekován dvojpík heroinu ($t_R = 6,0$ min) a neznámé látky s retenčním časem 6,2 min. Poslední eluovanou látkou byl fentanyl v čase 13,3 min.



Obrázek 45: Chromatogramy směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, MF 80 : 20); CN- kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl

Kromě vyhodnocení mrtvého času (t_M) a retenčních časů analytů ($t_{R,i}$) byly zjištěny také šířky píků v polovině výšky ($w_{h/2,i}$). Tyto parametry byly použity pro výpočet kvalitativních údajů (Tab. VI a Tab. VII) analýzy směsi opioidů s využitím CN-kolony a MF (50 mmol/l HCOONH_4 + 50 mmol/l KCl o pH 7 : ACN; 85 : 15).

Rozlišení ($R_{1,2}$) bylo vypočteno dle rovnice (4):

$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5(w_{h/2,1} + w_{h/2,2})} \quad (4)$$

Retenční faktor (k_i) dle rovnice (5):

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (5)$$

Tabulka VI: Kvalitativní údaje vypočtené z UV chromatogramu analýzy opioidů (každý 50 $\mu\text{mol/l}$) na CN-koloně, MF (50 mmol/l HCOONH_4 + 50 mmol/l KCl o pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1 ml/min, $t_M = 1,130$ min

	Morfin	Norfentanyl	Kokain	Heroin	Fentanyl
t_R [min]	1,848	2,350	4,507	6,033	13,292
$w_{h/2}$ [min]	0,089	0,098	0,166	0,400*	0,472
k_i	0,635	1,076	2,988	4,339	10,763
$R_{1,2}$	5,369	16,341	5,392	16,649	

*pološifka odečtena ze dvou koelujících pík

Tabulka VII: Kvalitativní údaje vypočtené z ECD chromatogramu analýzy opioidů (každý 50 $\mu\text{mol/l}$) na CN-koloně, MF (50 mmol/l HCOONH_4 + 50 mmol/l KCl o pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1 ml/min, $t_M = 1,149$ min

	Morfin	Norfentanyl	Kokain	Heroin	Fentanyl
t_R [min]	1,877	2,404	4,542	6,064	13,321
$w_{h/2}$ [min]	0,098	0,128	0,170	0,390*	0,482
k_i	0,634	1,092	2,953	4,278	10,594
$R_{1,2}$	4,664	14,349	5,436	16,644	

*pološifka odečtena ze dvou koelujících pík

Po zjištění vhodného poměru mravenčanové a acetonitrilové složky MF byl testován vliv acidity vodné složky v rozmezí pH 6 – 8.

Snížení acidity MF (chromatogramy v Příloze 9) zrychlilo analýzu, což ale vedlo k čásečné koeluci kokainu (3,6 min) s heroinem (3,9 min). Analýzou ECD chromatogramu bylo získáno jejich rozlišení $R_{1,2} = 1,42$, resp. z UV $R_{1,2} = 1,47$. Morfin byl detekován v čase 1,5 min, tj. 0,4 min za mrtvým časem. Norfentanylu odpovídal retenční čas 2,1 min a fentanylu 9,4 min. Naopak zvýšení alkality MF na pH 8 (Příloha 10) poskytlo největší oddělení nejrychleji eluovaných látek od mrtvého času (o 1,7 min). V čase 2,8 min došlo ke

koeluci morfinu s norfentanylem. Kokain byl eluován v čase 6,2 min a heroin v čase 11 min. Problémem však bylo, že retence látek byla vysoká, což vedlo k retenci fentanylu delší než 20 minut.

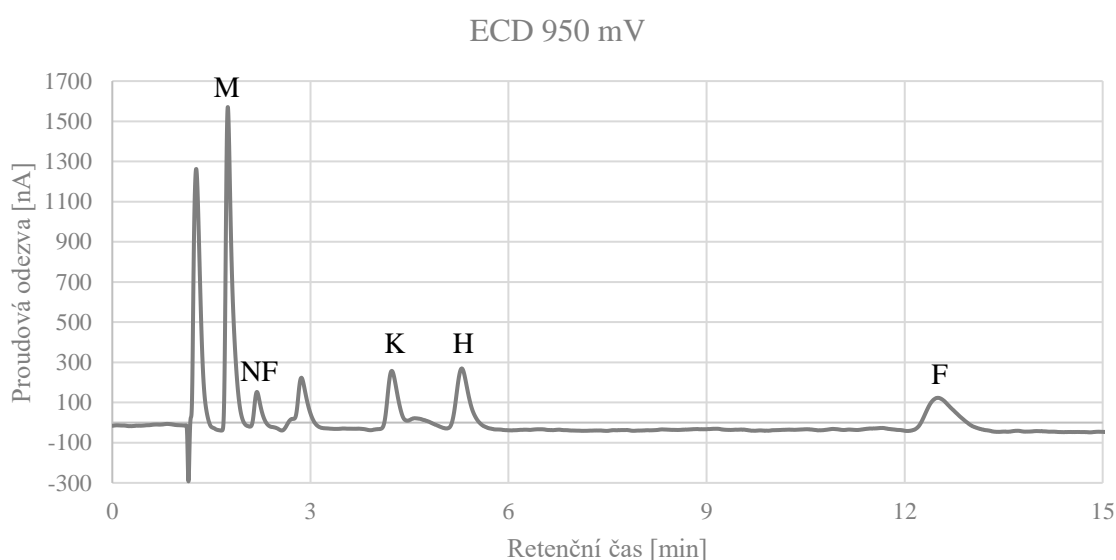
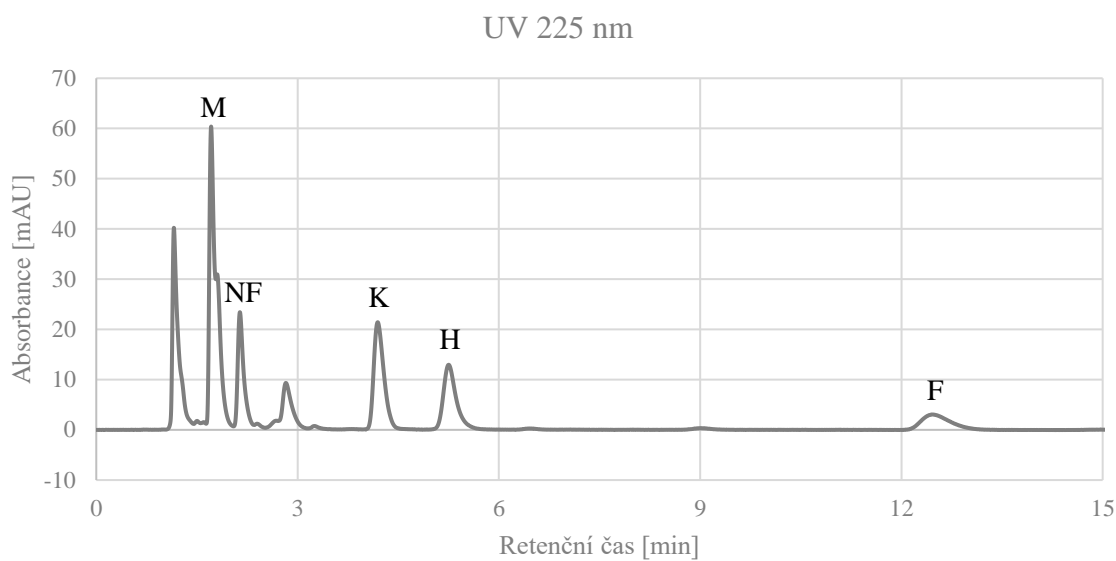
Z výše popsaných důvodů byla MF 85 : 15 (50 mmol/l HCOONH₄ + 50 mmol/l KCl o pH 7 : ACN) zvolena jako nejvhodnější z testovaných mravenčanových MF pro analýzu směsi vybraných opioidů kapalinovou chromatografií s CN-kolonou.

3.2.4 CN-kolona ((NH₄)₂SO₄)

Bylo zkoumáno, zda větší iontová síla roztoku elektrolytu použitého v MF, který by mohl nahradit přídavek KCl do roztoku mravenčanu amonného, ovlivní separaci směsi opioidů. Proto byla testována MF složená z (NH₄)₂SO₄ (50 mmol/l, pH 7) : ACN, 85 : 15 s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. Ostatní parametry analýzy byly zachovány (225 nm pro UV, 950 mV, 1000 mV pro ECD).

Využitím síranové MF (Obr. 46) byla zachována úplná separace studovaných opioidů, čímž se potvrdila možnost použití jednodušší MF. K eluci morfinu došlo v retenčním čase 1,7 min. Norfentanyl byl eluován v čase 2,1 min. Následoval pík nečistot ($t_R = 2,8$ min), kokainu ($t_R = 4,2$ min) a heroinu ($t_R = 5,3$ min). O 7,2 min později došlo k eluci posledního analytu, fentanylu v retenčním čase 12,5 min.

Následným vyhodnocením chromatogramů byly získány parametry separace jako mrtvý čas (t_M), retenční časy studovaných analytů ($t_{R,i}$) a pološířky píků ($w_{h/2,i}$). Z těchto údajů byly vypočteny retenční faktory (k_i) opioidů a rozlišení píků ($R_{1,2}$) analýzy na CN-koloně s využitím MF (NH₄)₂SO₄ (50 mmol/l, pH 7) : ACN v poměru 85 : 15. Výpočet byl proveden s využitím stejného postupu jako v kapitole 3.2.3, výsledky jsou sumarizovány v Tab. VIII a Tab. IX.



Obrázek 46: Chromatogramy směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, MF 80 : 20); CN-kolona, MF: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($c = 50 \text{ mmol/l}$, pH 7) : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1,5 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl

Tabulka VIII: Kvalitativní údaje vypočtené z UV chromatogramu analýzy opioidů (každý 50 $\mu\text{mol/l}$) na CN-koloně, MF (50 mmol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1,5 ml/min, $t_M = 0,982 \text{ min}$

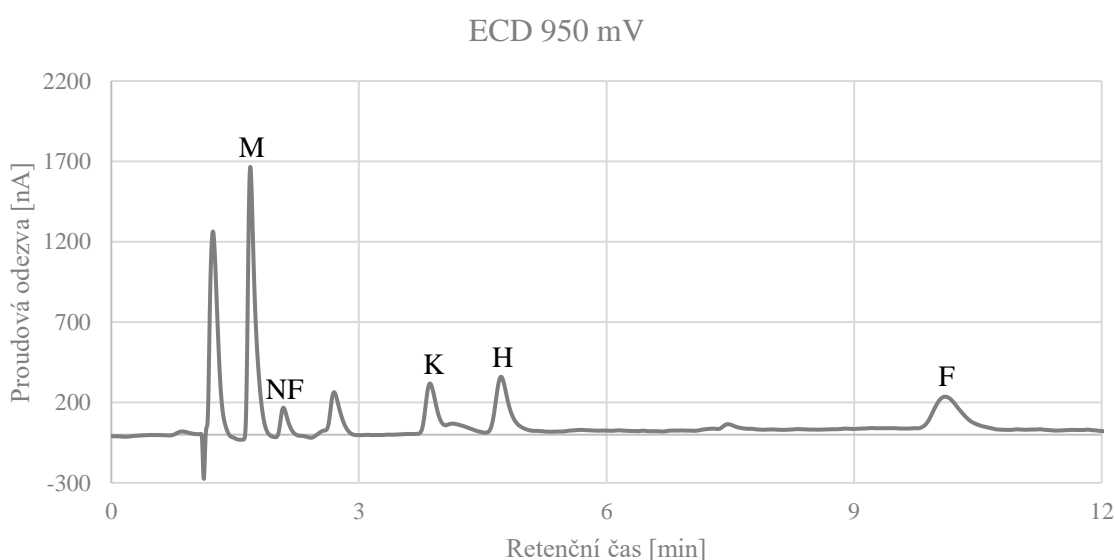
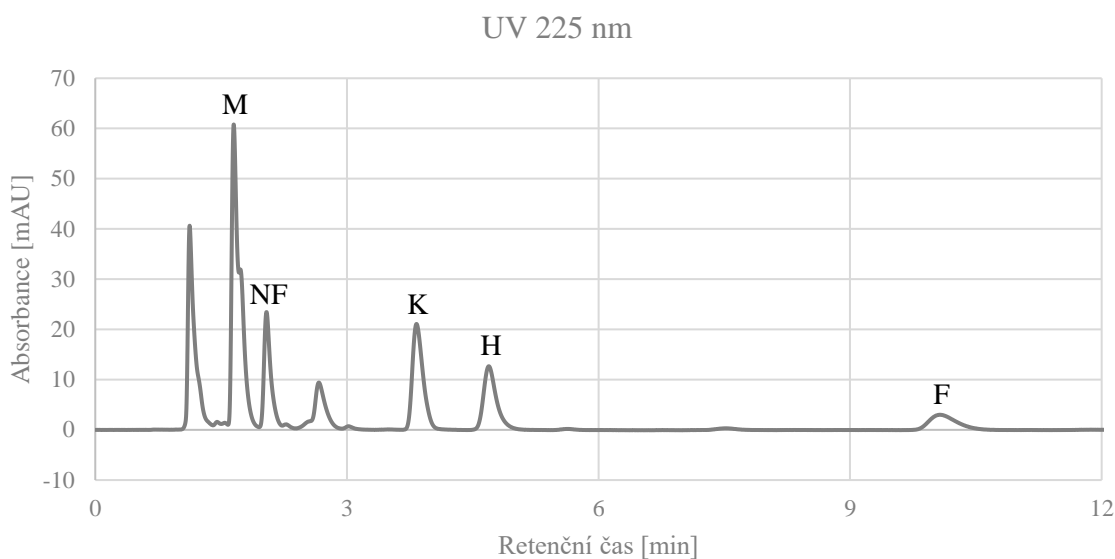
	Morfin	Norfentanyl	Kokain	Heroin	Fentanyl
t_R [min]	1,712	2,142	4,195	5,252	12,472
$w_{h/2}$ [min]	0,089	0,086	0,162	0,193	0,464
k_i	0,743	1,181	3,272	4,348	11,701
$R_{1,2}$	4,914	16,556	5,955	21,979	

Tabulka IX: Kvalitativní údaje vypočtené z ECD chromatogramu analýzy opioidů (každý 50 $\mu\text{mol/l}$) na CN-koloně, MF (50 mmol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1,5 ml/min, $t_M = 0,995$ min

	Morfin	Norfentanyl	Kokain	Heroin	Fentanyl
t_R [min]	1,750	2,191	4,233	5,293	12,506
$w_{h/2}$ [min]	0,094	0,109	0,170	0,203	0,491
k_i	0,759	1,202	3,254	4,319	11,569
$R_{1,2}$	4,345	14,638	5,684	20,787	

Z důvodu vysoké retence fentanylu na CN-koloně a již dříve zmíněného 7,2min rozdílu v retenčních časech předposledního (H) a posledního analytu (F) byla testována možnost využití gradientu průtokové rychlosti. Průtoková rychlost byla zvyšována lineárně z 1,5 ml/min na 2,0 ml/min v čase od počátku analýzy (0 min) do 6. minuty. Po dovršení průtokové rychlosti 2,0 ml/min byla tato rychlost konstatntně udržována až po konec analýzy. Ostatní parametry metody zůstaly nezměněny.

Zmíněnou úpravou průtokové rychlosti nebyla nijak narušena separace analyzované směsi. Kritická část, tj. separace morfinu a norfentanylu, proběhla s rozlišením $R_{1,2} = 4,509$ v UV detekci a $R_{1,2} = 4,289$ v ECD detekci. Podle očekávání došlo ke zrychlení eluce každého analytu (Obr. 47). Morfin byl eluován s retenčním časem 1,6 min. K eluci norfentanylu došlo v čase 2,0 min. Následovaly píky kokainu ($t_R = 3,8$ min) a heroinu ($t_R = 4,7$ min). V retenčním čase 10,1 min byl eluován poslední analyt, fentanyl.



Obrázek 47: Chromatogramy směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, MF 80 : 20); CN- kolona, MF: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($c = 50 \text{ mmol/l}$, pH 7) : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost s lineárním gradientem 1,5 ml/min – 2,0 ml/min (od počátku do 6. min); M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl

Lze konstatovat, že použitím mobilní fáze složené ze síranu amonného (50 mmol/l, pH 7) a acetonitrilu v objemovém poměru 85 : 15 v kombinaci s kyano kolonou byla vyvinuta druhá HPLC metoda pro kvalitativní analýzu směsi morfinu, norfentanylu, kokainu, heroinu a fentanylu. Pro metodu s průtokovou rychlostí MF 1,5 ml/min byly vypočteny retenční faktory každého analytu.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce byla v první části zaměřena na vývoj selektivní voltametrické metody pro analýzu fentanylu s využitím tištěných elektrod, resp. fentanylu, jako nežádoucího a nebezpečného aditiva, ve směsích s heroinem nebo kokainem. Druhá část práce byla zaměřena na vývoj HPLC-UV-ECD metody pro analýzu směsi fentanylu, norfentanylu, kokainu, heroinu a morfinu s izokratickou elucí.

Bylo testováno šest typů komerčních tištěných elektrod, ze kterých byly vybrány dvě (C110 a 110CNT), na nichž byla optimalizována AdsCSWV metoda pro analýzu fentanylu. Pozornost byla věnována elektrolytické reakci fentanylu za vzniku adsorbovaného oxidačního produktu a nalezení vhodných podmínek pro následnou detekci tohoto produktu. Mimo jiné byly testovány SWV parametry (amplituda a frekvence pulzu) pro oba typy SPE.

Byly získány kalibrační závislosti fentanylu na obou typech použitých elektrod. Hodnoty *LOD* a *LOQ* byly vypočteny z parametrů regresních přímek (druhých anodických skenů) v koncentračním rozsahu 1 – 10 $\mu\text{mol/l}$. Pro 110CNT byly získány *LOD* = 4,6 $\mu\text{mol/l}$ a *LOQ* = 15,3 $\mu\text{mol/l}$, pro C110 *LOD* = 2,6 $\mu\text{mol/l}$ a *LOQ* = 8,8 $\mu\text{mol/l}$. Na elektrodách C110 byly (z prvních anodických skenů) získány další dvě závislosti. Oxidační píky fentanylu (kolem 0,55 V proti Ag) poskytly lineární kalibrační závislost s *LOD* = 0,95 $\mu\text{mol/l}$ a *LOQ* = 3,17 $\mu\text{mol/l}$, vhodnou pro kvantifikaci samostatného fentanylu. Také byla pozorována nezávislost proudové odezvy oxidačního produktu fentanylu v prvním anodickém skenu vyvinuté AdsCSWV-II metody na koncentraci fentanylu, kdy píky oxidačního produktu fentanylu (kolem -0,25 V proti Ag) vykazovaly průměrnou proudovou odezvu 1,92 $\mu\text{A} \pm 0,33 \mu\text{A}$.

Tento kvalitativní znak byl potvrzen analýzou směsných roztoků s kokainem (proud píku oxidačního produktu byl 6,63 $\mu\text{A} \pm 1,59 \mu\text{A}$) nebo heroinem (6,25 $\mu\text{A} \pm 2,46 \mu\text{A}$). Experimenty byly provedeny s roztoky, v nichž byly opioidy v koncentračních poměrech 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100 a 1 : 1000 (F : K/H). Oba směsné roztoky s poměrem 1 : 1000 vykazovaly zvýšený vliv kapacitního proudu znesnadňující vyhodnocení píku oxidačního produktu fentanylu.

V chromatografické části práce byly testovány dvě stacionární fáze (C₁₈ a CN-) a tři vodné složky (s elektrolyty NaH₂PO₄, HCOONH₄ + KCl a (NH₄)₂SO₄) mobilní fáze v kombinaci s acetonitrilem. Byly nalezeny vhodné podmínky UV (225 nm) a ECD (950 mV) detekce a acidita vodné složky (pH 7).

Nejlepší separace všech studovaných opioidů bylo docíleno s využitím dvou mobilních fází na CN-koloně, 85 : 15 (v/v; 50 mmol/l HCOONH₄ + 50 mmol/l KCl o pH 7 : ACN) s průtokovou rychlostí 1 ml/min nebo 85 : 15 (v/v; 50 mmol/l (NH₄)₂SO₄ o pH 7 : ACN) s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min. S využitím druhé zmíněné mobilní fáze byla testována možnost použití gradientu průtokové rychlosti (lineární, 0 min → 6 min, 1,5 ml/min → 2,0 ml/min). Lineárním zvyšováním průtokové rychlosti v uvedeném programu nedošlo ke zhoršení separace složek směsi a eluce poslední složky (fentanylu) byla zrychlena o 2,5 min.

Pro oba chromatografické systémy s konstantní průtokovou rychlostí byly vypočteny kvalitativní parametry (retenční faktory k_i a rozlišení $R_{1,2}$) pro všechny analyty. Bylo docíleno separace opioidů na základní linii.

V předložené diplomové práci byla vyvinuta voltametrická metoda (AdsCSWV-II pro SPE C110) vhodná pro kvantitativní analýzu fentanylu a jeho kvalitativní analýzu ve směsných vzorcích s heroinem nebo s kokainem. Také byly vytvořeny dvě metody kapalinové chromatografie s duální UV a coulometrickou detekcí vhodné pro kvalitativní analýzu vybraných opioidů, pro kterou byly vypočteny retenční faktory morfinu, norfentanylu, kokainu, heroinu a fentanylu. S dalším vývojem (provedení validace) mají tyto metody potenciál pro kvantitativní analýzu směsí opioidů.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

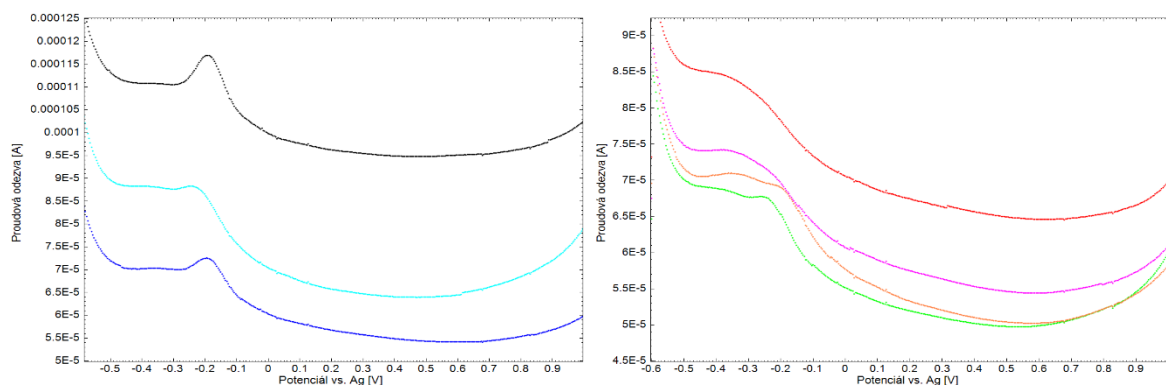
- [1] Perdue T., Carlson R., Daniulaityte R., Silverstein S. M., Bluthenthal R. N., Valdez A., Cepeda A., Characterizing prescription opioid, heroin, and fentanyl initiation trajectories: A qualitative study, *Soc. Sci. Med.*, 340 (2024) 116441.
- [2] Harris S. J., Abraham A. J., Lozano-Rojas F., Negaro S., Andrews C. M., Grogan C. M., Allocation of federal funding to address the opioid overdose crisis in the criminal legal system, *J. Subst. Use Addict. Treat.*, 150 (2023) 209064.
- [3] Rawson R. A., Erath T. G., Clark H. W., The fourth wave of the overdose crisis: Examining the prominent role of psychomotor stimulants with and without fentanyl, *Prev. Med.*, 176 (2023) 107625.
- [4] Davis M. T., Bohler R., Hodgkin D., Hamilton G., Horgan C., The role of health plans in addressing the opioid crisis: A qualitative study, *J. Subst. Use Addict. Treat.*, 149 (2023) 209022.
- [5] Wilson N. G., Raveendran J., Docoslis, A., Portable identification of fentanyl analogues in drugs using surface-enhanced Raman scattering, *Sens. Actuators, B*, 330 (2021) 129303.
- [6] Glasscott M. W., Vannoy K. J., Iresh Fernando P. U. A., Kosgei G. K., Moores L. C., Dick J. E., Electrochemical sensors for the detection of fentanyl and its analogs: Foundations and recent advances, *Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116037.
- [7] Langmaier J., Maier V., Samec Z., Voltammetry of Several Natural and Synthetic Opioids at a Polarized Ionic Liquid Membrane, *ChemElectroChem*, 8 (2021) 2519–2525.
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cocaine#section=Chemical-and-Physical-Properties>, staženo 25. 4. 2024
- [9] Patel B. A., *Electrochemistry for bioanalysis*, Elsevier, Amsterdam 2021.
- [10] Záruba K., *Analytická chemie (1. díl)*, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2016.
- [11] Barek J., Opekar, F., Štulík K., *Elektroanalytická chemie*, 1. vyd., Karolinum, Praha 2005.
- [12] Mádr J., *Využití voltametrie v analýze vybraných opioidů*, bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2022.
- [13] Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R., *Principles of instrumental analysis*, Cengage Learning, Boston 2018.
- [14] https://ach.upol.cz/ucebnice2/ref_eldy.htm, staženo 22. 4. 2024.

- [15] Černovská K., Zavedení metody měření vitamínu K na voltametričtém zařízení PalmSens EmStat3, bakalářská práce, České vysoké učení technické v Praze, 2017.
- [16] https://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html, staženo 22. 4. 2024.
- [17] Wahyuni W. T., Putra B. R., Fauzi A., Ramadhanti D., Rohaeti E., Heryanto R., A Brief Review on Fabrication of Screen-Printed Carbon Electrode: Materials and Techniques, *Indo. J Chem. Res.*, 8 (2021) 210–218.
- [18] Megale J. D., de Souza D., New approaches in antibiotics detection: The use of square wave voltammetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 234 (2023) 115526.
- [19] Pilz F. H., Kielb P., Cyclic voltammetry, square wave voltammetry or electrochemical impedance spectroscopy? Interrogating electrochemical approaches for the determination of electron transfer rates of immobilized redox proteins, *BBA Adv.*, 4 (2023) 100095.
- [20] Adams S. D., Doeven E. H., Quayle K., Kouzani A. Z., MiniStat: Development and Evaluation of a Mini-Potentiostat for Electrochemical Measurements, *IEEE Access*, 7 (2019) 31903–31912.
- [21] Krorakai K., Klangphukhiew S., Kulchat S., Patramanon R., Smartphone-based NFC potentiostat for wireless electrochemical sensing, *Appl. Sci.*, 11 (2021) 1–13.
- [22] Sun A. C., Hall D. A., Point-of-Care Smartphone-based Electrochemical Biosensing, *Electroanalysis*, 31 (2019) 2–16.
- [23] Ji D., Liu L., Li S., Chen C., Lu Y., Wu J., Liu, Q., Smartphone-based cyclic voltammetry system with graphene modified screen printed electrodes for glucose detection, *Biosens. Bioelectron.*, 98 (2017) 449–456.
- [24] Pavlova V., Mirčeski V., Komorsky-Lovrić Š., Petrovska-Jovanović S., Mitrevski B., Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 512 (2004) 49–56.
- [25] Freitas J. M., Ramos D. L. O., Sousa R. M. F., Paixão T. R. L. C., Santana M. H. P., Muñoz R. A. A., Richter E. M., A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples, *Sens. Actuators, B*, 243 (2017) 557–565.
- [26] Kish S. S., Ehzari H., Shekarbeygi Z., Shahlaei M., Moradi S., Jalalvand A. R., Fabrication of a novel electrochemical biosensor based on easy and efficient modifications of a glassy carbon electrode for sensitive and selective determination of morphine, *Sens. Bio-sens. Res.*, 40 (2023) 100555.

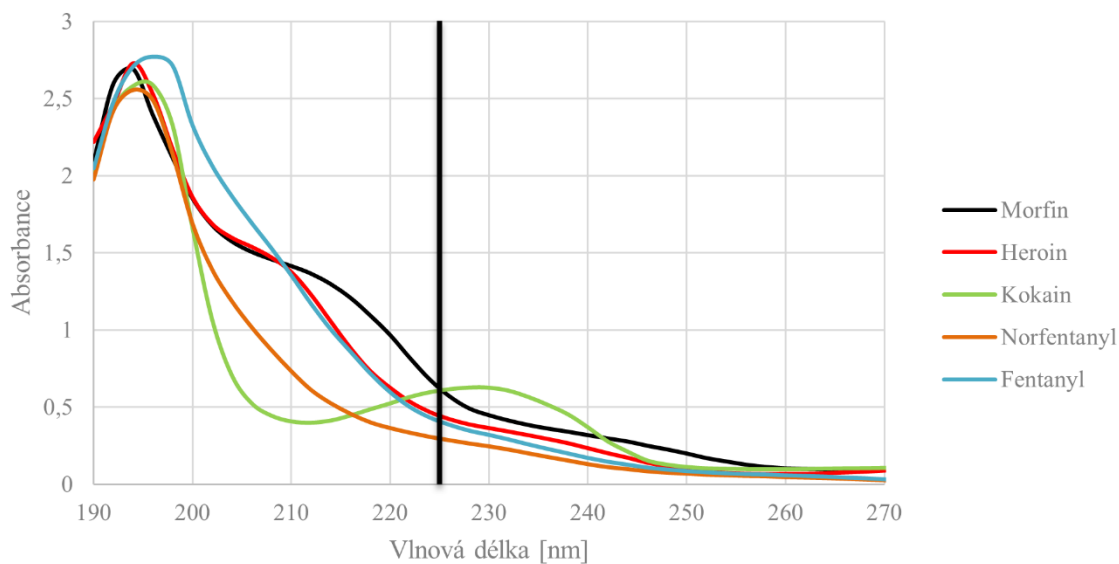
- [27] Mokhtari A., Karimi-Maleh H., Ensafi A. A., Beitollahi H., Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples, *Sens. Actuators, B*, 169 (2012) 96–105.
- [28] Felipe Montiel N., Parrilla M., Beltrán V., Nuyts G., van Durme F., de Wael K., The opportunity of 6-monoacetylmorphine to selectively detect heroin at preanodized screen printed electrodes, *Talanta*, 226 (2021) 122005.
- [29] Ortiz-Aguayo D., Cetó X., de Wael K., del Valle M., Resolution of opiate illicit drugs signals in the presence of some cutting agents with use of a voltammetric sensor array and machine learning strategies, *Sens. Actuators, B*, 357 (2022) 131345.
- [30] Sohouli E., Keihan A. H., Shahdost-fard F., Naghian E., Plonska-Brzezinska M. E., Rahimi-Nasrabadi M., Ahmadi F., A glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes for electrochemical determination of fentanyl, *Mater. Sci. Eng. C*, 110 (2020) 110684.
- [31] Jun D., Sammis G., Rezazadeh-Azar P., Ginoux E., Bizzotto D., Development of a Graphene-Oxide-Deposited Carbon Electrode for the Rapid and Low-Level Detection of Fentanyl and Derivatives, *Anal. Chem.*, 94 (2022) 12706–12714.
- [32] Mishra R. K., Krishnakumar A., Zareei A., Heredia-Rivera U., Rahimi R., Electrochemical sensor for rapid detection of fentanyl using laser-induced porous carbon-electrodes, *Microchim. Acta*, 189 (2022) 198.
- [33] Moldoveanu C. S., David V., *Essentials in Modern HPLC Separations* (2nd edition), Elsevier, Amsterdam 2022.
- [34] Moldoveanu C. S., David V., *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*, Elsevier, Amsterdam 2017.
- [35] Marchand D. H., Croes K., Dolan J. W., Snyder L. R., Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VII. Cyanopropyl columns, *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 57–64.
- [36] Kouskoura M. G., Hadjipavlou-Litina D., Markopoulou C. K., Elucidation of the retention mechanism on a reverse-phase cyano column by modeling, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014) 1919–1929.
- [37] <https://www.hawach.com/hplc-columns/cn-hplc-columns.html>, staženo 24. 4. 2024.
- [38] López T., Fernández Campos A., Cassella R. J., Determination of adulterants of cocaine in Real banknotes in Brazil by HPLC-DAD, *Microchem. J.*, 178 (2022) 107401.

- [39] Fernández, P., Morales, L., Vázquez, C., Bermejo, A. M., & Tabernero, M. J., HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma, *Forensic Sci. Int.*, 161 (2006) 31–35.
- [40] Elbardisy H. M., Foster C. W., Cumba L., Antonides L. H., Gilbert N., Schofield C. J., Belal T. S., Talaat W., Sutcliffe O. B., Daabees H. G., Banks C. E., Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection, *Anal. Methods*, 11 (2019) 1053–1063.
- [41] Whitehead H. D., Hayes K. L., Swartz J. A., Prete E., Robison-Taylor L., Ellen Mackesy-Amiti M., Jimenez A. D., Lieberman M., Validated method for the analysis of 22 illicit drugs and their metabolites via liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in illicit drug samples collected in Chicago, IL, *Forensic Chem.*, 33 (2023) 100475.
- [42] Pelikánová B., Elektrochemické studium derivátů fentanylu a jejich stanovení metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2022.
- [43] Mikulová N., Využití elektroanalytických technik pro studium elektrochemického chování a stanovení vybraných opioidů, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2022.

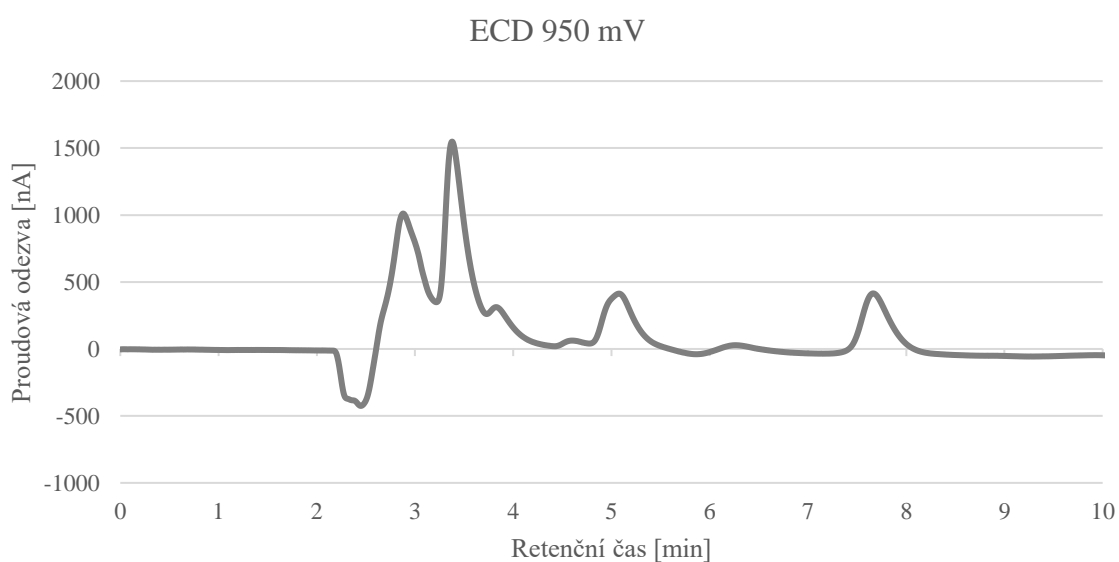
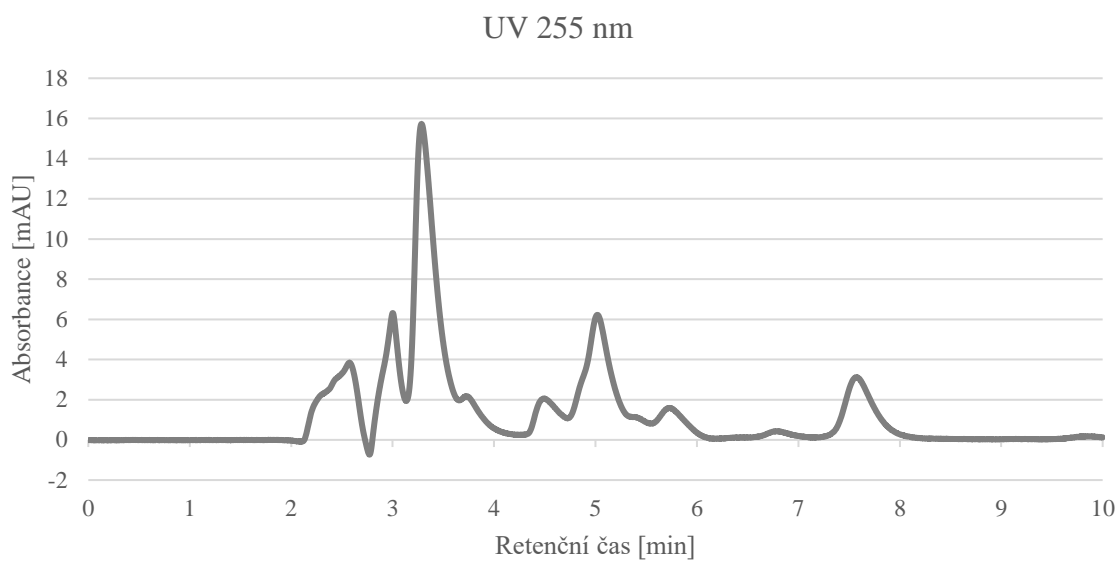
7 PŘÍLOHY



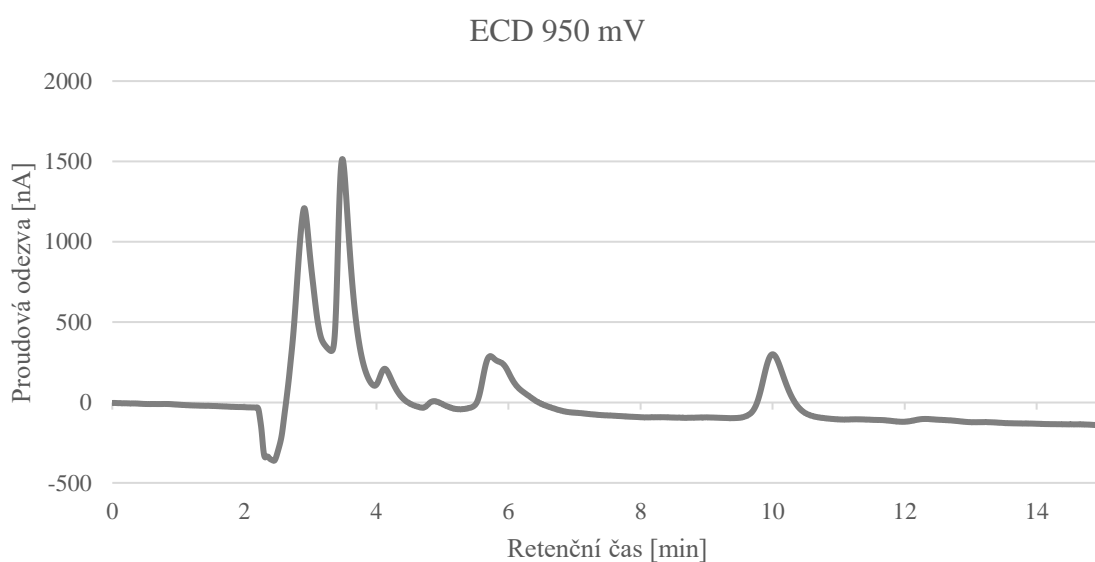
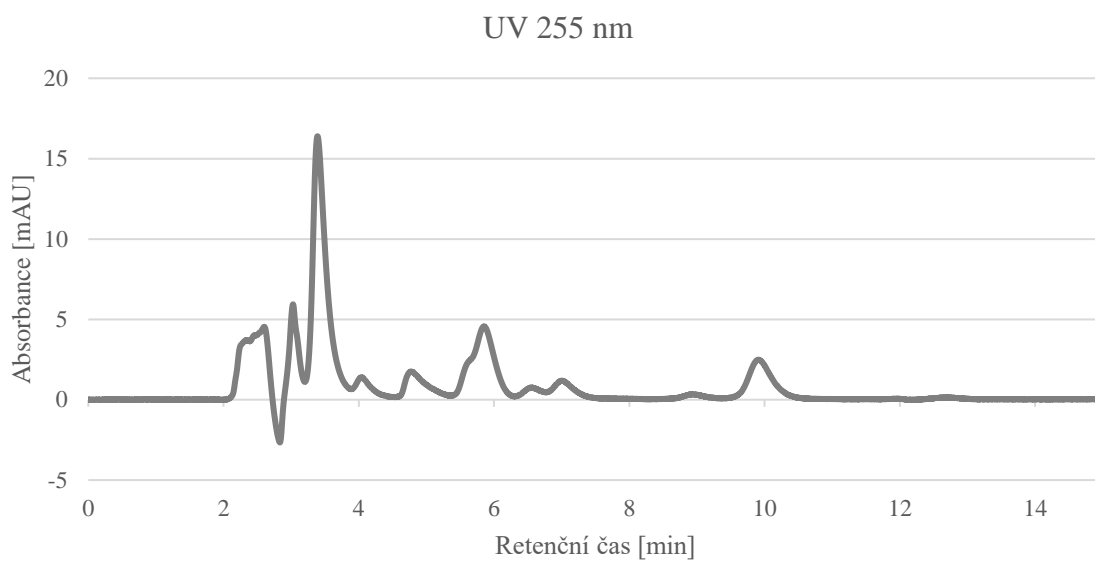
Příloha 1: AdsCSW voltamogramy (druhé anodické skeny) kalibračních roztoků fentanylu (sada A) 1. měřicího cyklu; černá – 100 $\mu\text{mol/l}$, tm. modrá – 50 $\mu\text{mol/l}$, sv. modrá – 25 $\mu\text{mol/l}$, zelená – 10 $\mu\text{mol/l}$, oranžová – 5 $\mu\text{mol/l}$, růžová – 2,5 $\mu\text{mol/l}$, červená – 1 $\mu\text{mol/l}$; měřeno metodou AdsCSWV-II pro SPE 110CNT



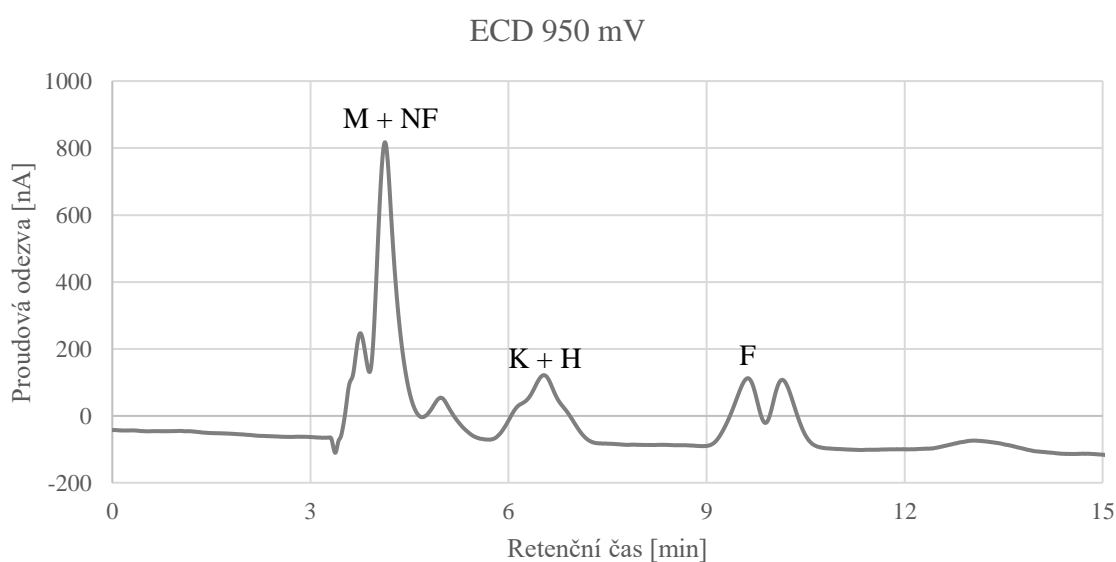
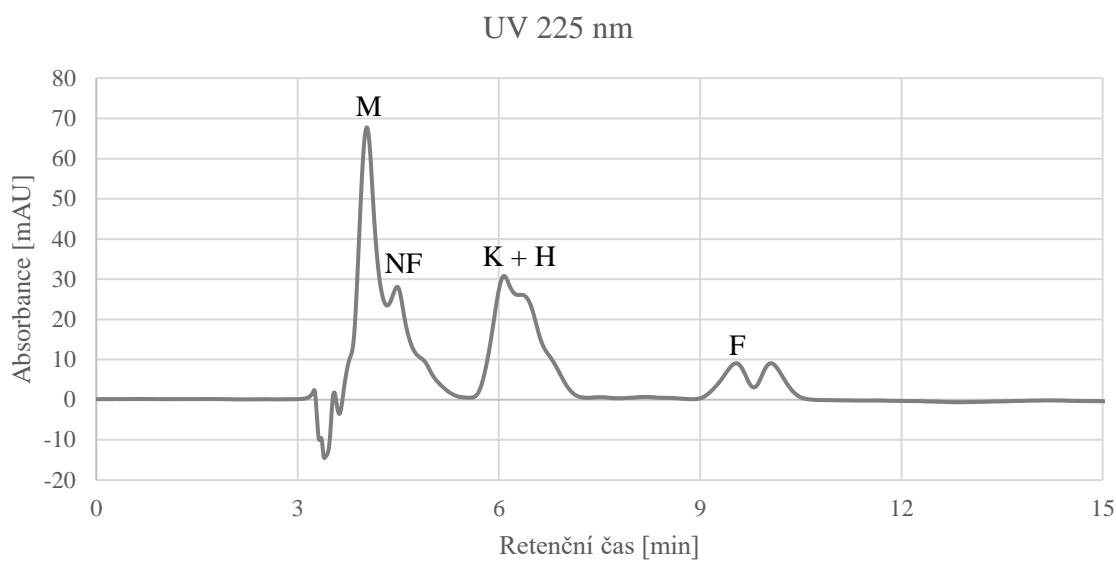
Příloha 2: Absorpční spektra studovaných opioidů; měřeno v rozmezí 190 nm – 400 nm, přibliženo 190 nm – 270 nm; roztoky opioidů (50 $\mu\text{mol/l}$ v ACN), použitý blank ACN



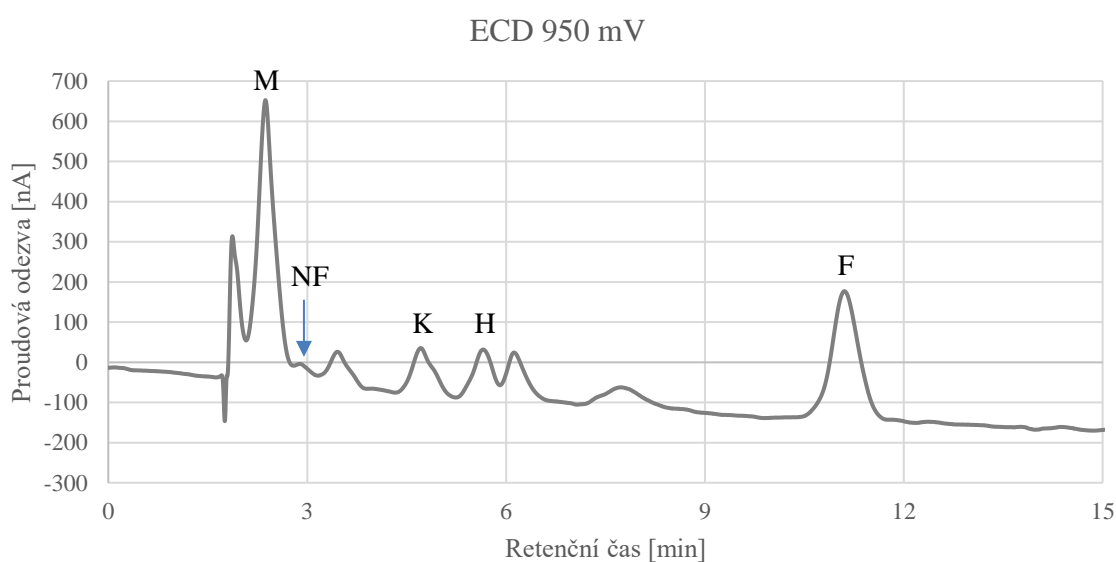
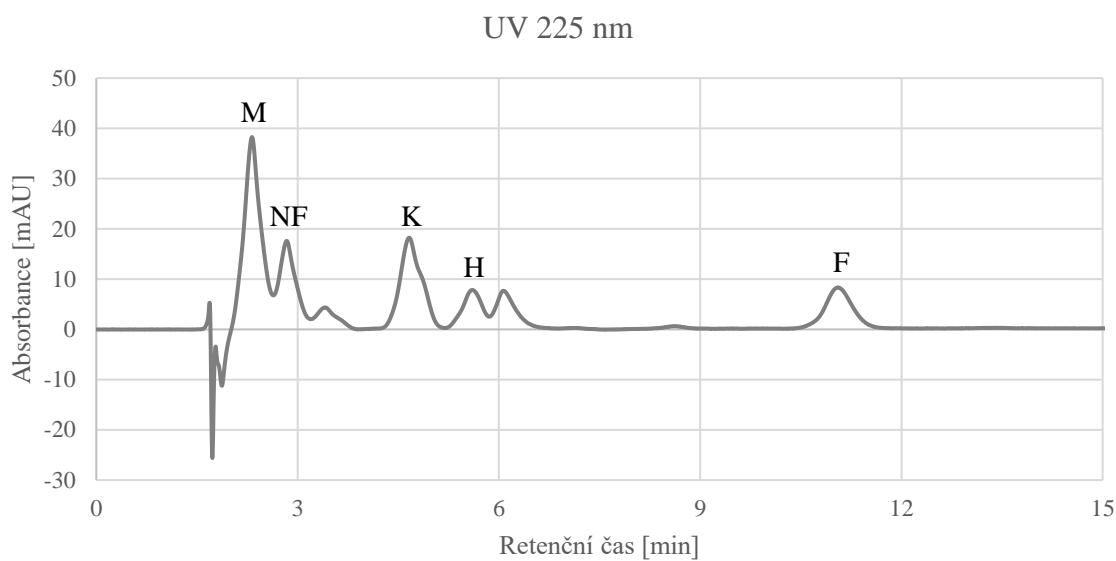
Příloha 3: Chromatogramy směsi všech opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); C_{18} kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$ a pH 9) : ACN, 45 : 55 (v celé směsi 50 mmol/l KCl), průtoková rychlost 0,5 ml/min



Příloha 4: Chromatogramy směsi všech opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); C_{18} kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$ a pH 9) : ACN, 50 : 50 (v celé směsi 50 mmol/l KCl), průtoková rychlost 0,5 ml/min

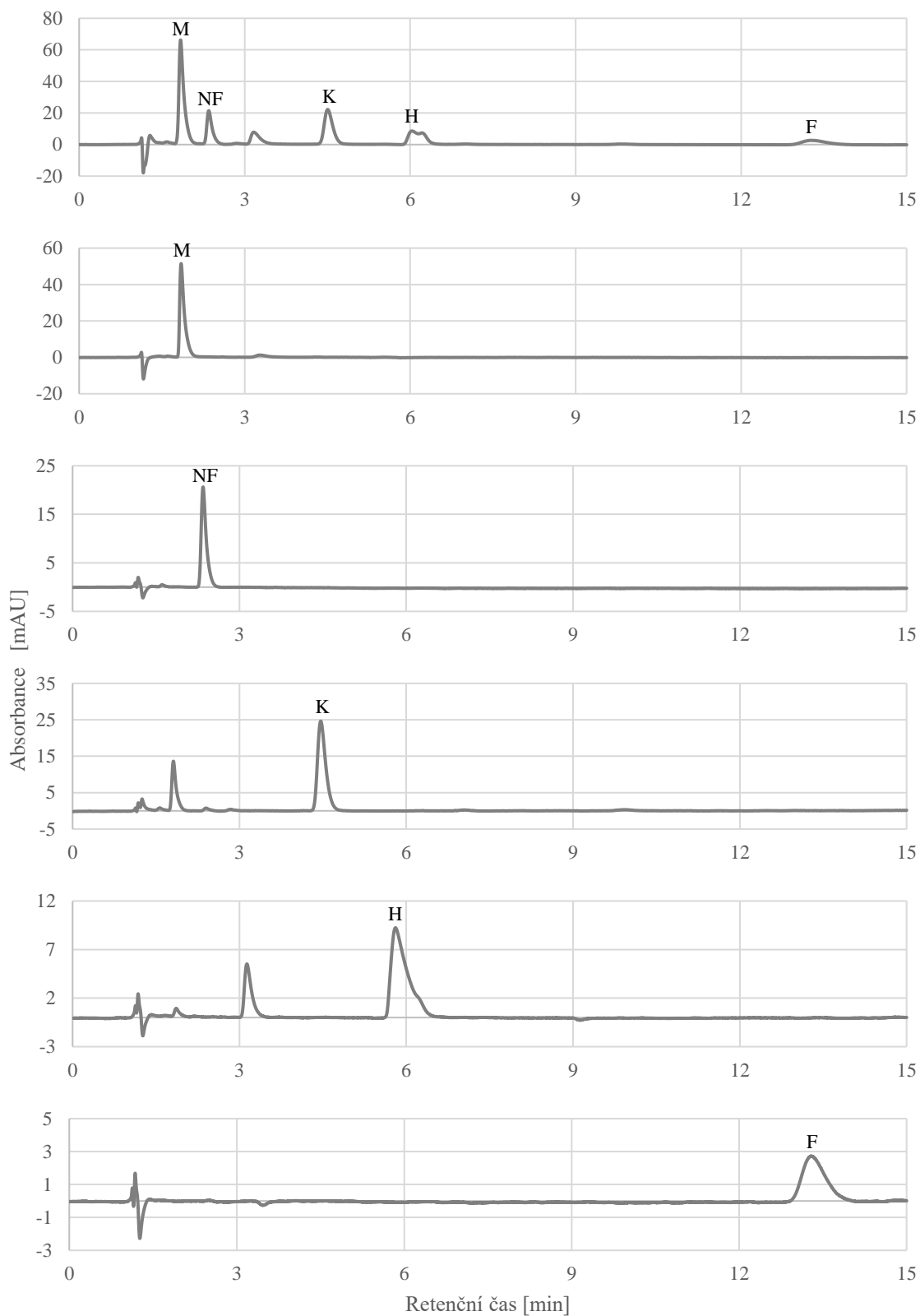


Příloha 5: Chromatogramy směsi všech opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); CN-kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 7 : ACN, 70 : 30, průtoková rychlost 0,5 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl

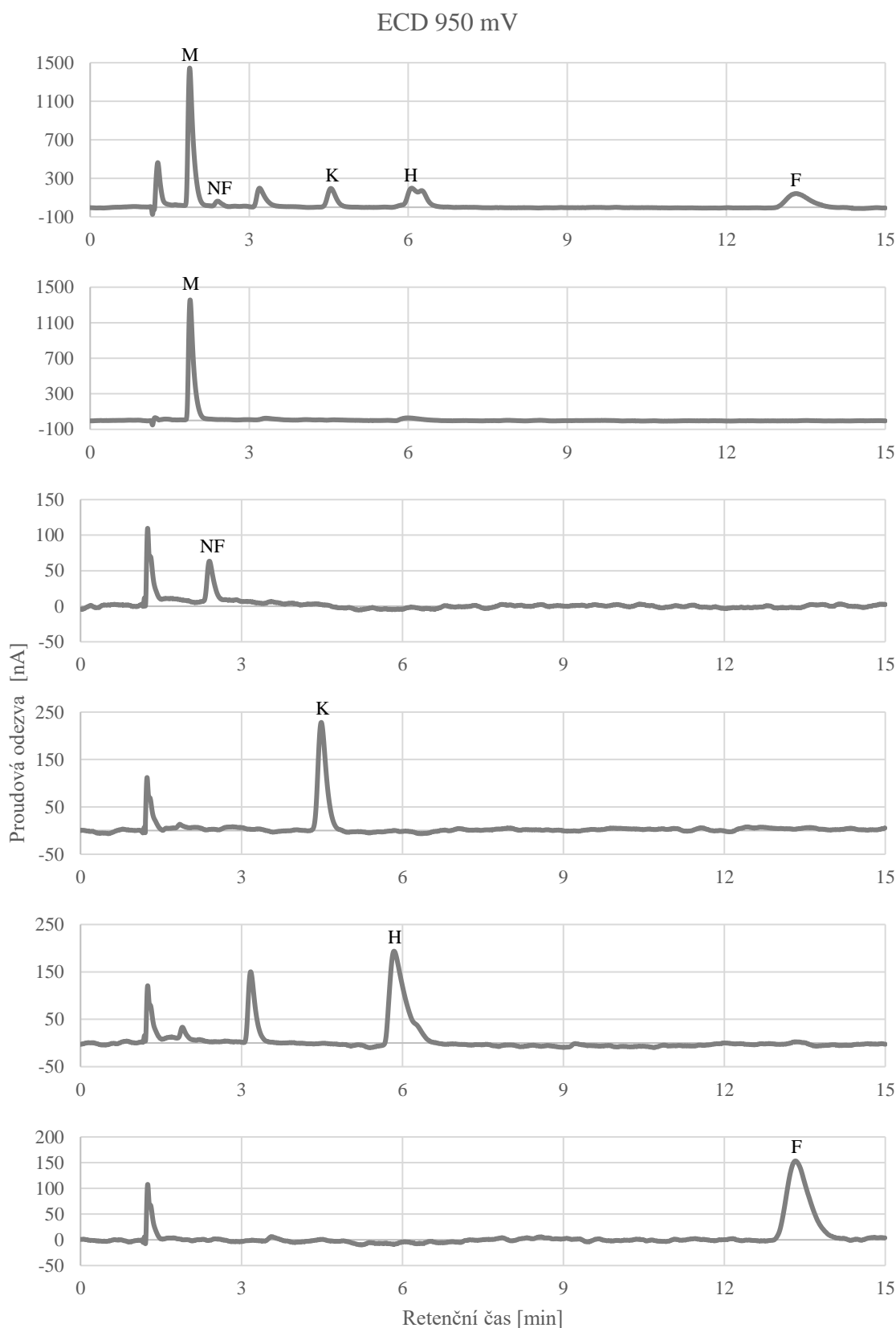


Příloha 6: Chromatogramy směsi všech opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); CN-kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 7 : ACN, 80 : 20, průtoková rychlost 1 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl

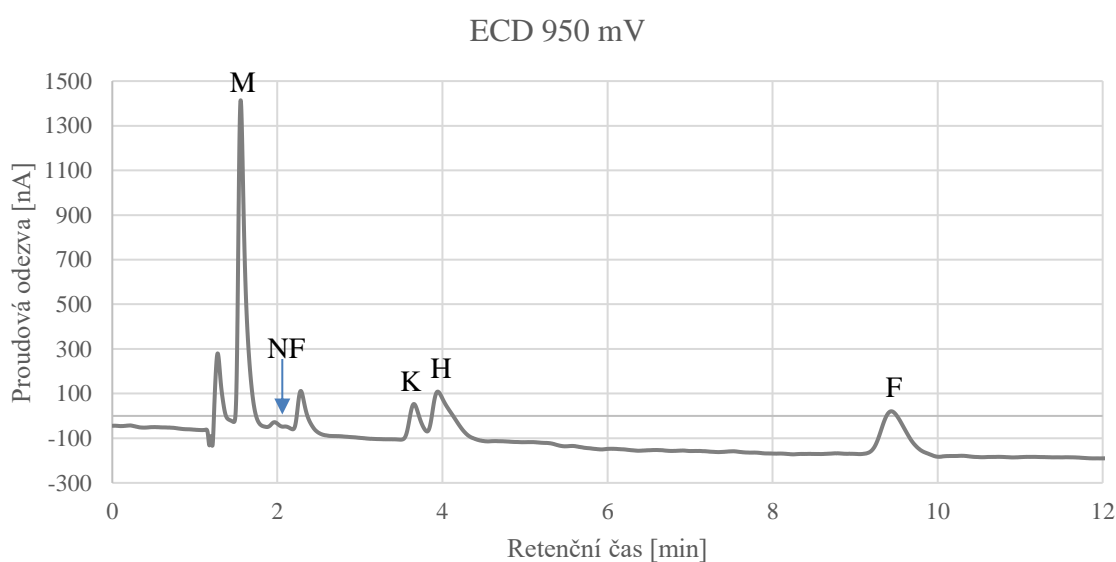
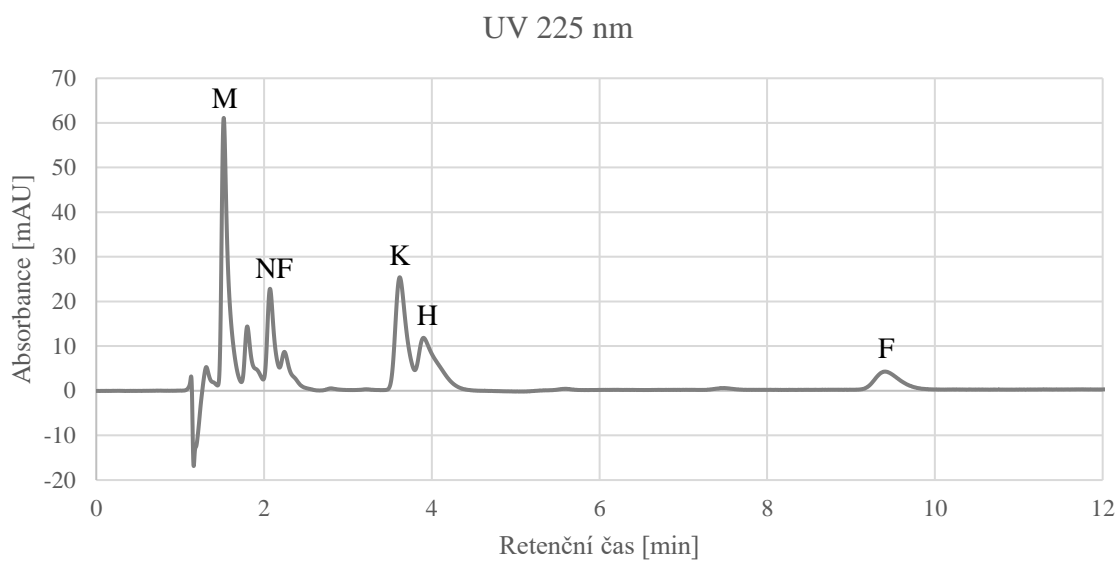
UV 225 nm



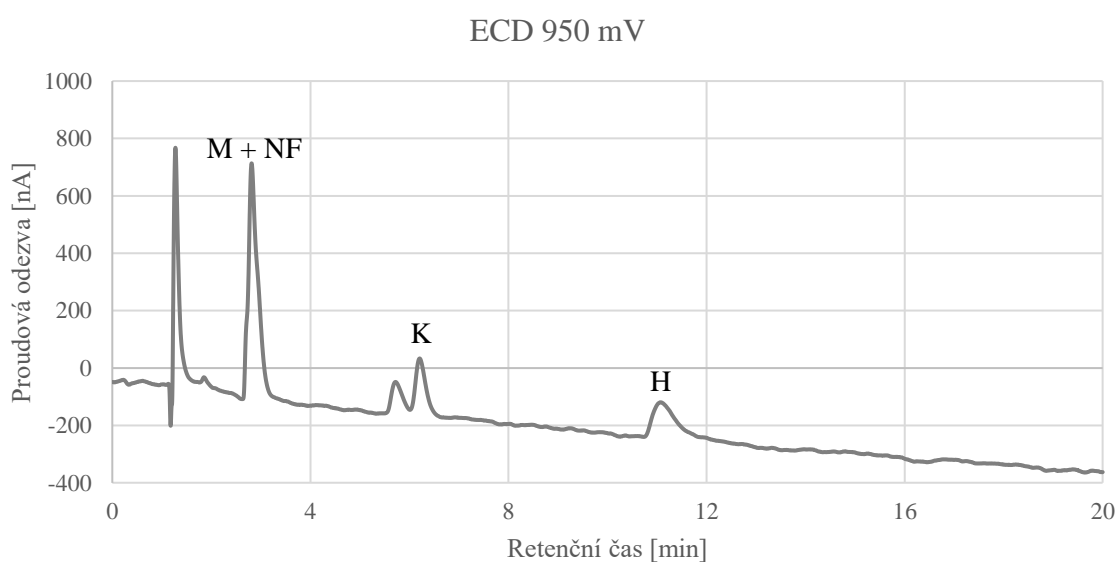
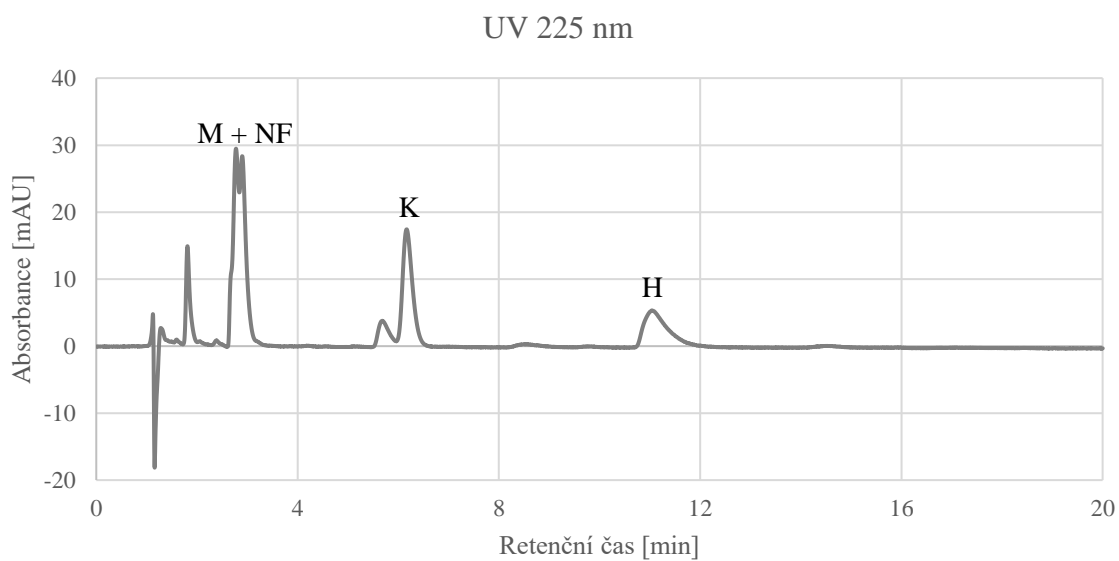
Příloha 7: Chromatogramy opioidů (50 $\mu\text{mol/l}$) a směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, MF 80 : 20); CN-kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl



Příloha 8: Chromatogramy opioidů (50 $\mu\text{mol/l}$) a směsi opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, MF 80 : 20); CN-kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 7 : ACN; 85 : 15), průtoková rychlost 1 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl



Příloha 9: Chromatogramy směsi všech opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); CN-kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 6 : ACN, 85 : 15, průtoková rychlost 1 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl



Příloha 10: Chromatogramy směsi všech opioidů (každý o $c = 50 \mu\text{mol/l}$ ve směsi, ACN); CN-kolona, MF: HCOONH_4 ($c = 50 \text{ mmol/l}$) + KCl ($c = 50 \text{ mmol/l}$), pH 8 : ACN, 85 : 15, průtoková rychlost 1 ml/min; M – morfin, NF – norfentanyl, K – kokain, H – heroin, F – fentanyl