

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



Využití voltametrie v analýze vybraných opioidů
Utilization of voltammetry in analysis of selected opioids

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jan Mádr
Studijní program:	Chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

2022 Olomouc

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jan Mádr
Název práce:	Využití voltametrie v analýze vybraných opioidů
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2022
Anotace:	<p>Bakalářská práce se zabývá voltametrickou detekcí dvou vybraných opioidů, heroinu a fentanylu s cílem vyvinout rychlou a levnou screeningovou metodu s možností využití v terénu. V teoretické části byla přiblížena problematika opioidů. Experimentální část se zabývá možností měření s využitím tištěných uhlíkových elektrod. Byly nastaveny optimální podmínky experimentu jako doba adsorpce opioidu na povrch pracovní elektrody, potenciál preelektrolýzy a vhodné prostředí. Následným proměřením kalibrační závislosti fentanylových roztoků byly stanoveny <i>LOD</i> a <i>LOQ</i> použité SWV metody. Na závěr byly zkoumány směsné roztoky fentanylu s heroinem. Experimenty potvrdily možnost aplikace vyvinuté metody pro analýzu fentanylu v heroinu.</p>
Klíčová slova:	heroin, fentanyl, opioidy, voltametrie, SPCE, SWV
Počet stran:	44
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jan Mádr

Title: Utilization of voltammetry in analysis of selected opioids

Type of thesis: Bachelor's thesis

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

The year of submission: 2022

Annotation: The Bachelor's thesis deals with the voltammetric detection of two selected opioids, heroin and fentanyl, with the aim to develop a fast and inexpensive screening method applicable in the field. In the theoretical part, the opioids were overviewed. The experimental part deals with the possibility of measurements using screen-printed carbon electrodes. Optimal experimental conditions such time of the opioid adsorption on the working electrode surface, pre-electrolysis potential and the appropriate medium were set. Subsequent measurements of the calibration dependences of the fentanyl standard solutions made it possible to determine the *LOD* and *LOQ* of the SWV method used. Finally, mixed solutions of fentanyl with heroin were investigated. The experiments confirmed the possibility of applying the developed method for the analysis of fentanyl in heroin.

Keywords: heroin, fentanyl, opioids, voltammetry, SPCE, SWV

Number of pages: 44

Number of appendices: 2

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 1. 7. 2022

.....

Podpis

Poděkování

Tímto chci velice poděkovat vedoucí své bakalářské 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 panu Mgr. Radku Jergovi patří mé díky za jeho pomoc a věcné komentáře během práce v laboratoři. A v neposlední řadě chci poděkovat své rodině, přítelkyni a blízkým za jejich schovívavost, pevné nervy a podporu během studia.

Velké díky 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_2021_021 a IGA_PrF_2022_023) a Grantovou agenturou České republiky (projekt 20-07350S).

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Fentanyl	10
2.1.1 Vlastnosti.....	10
2.1.2 Závislost na fentanylu.....	11
2.2 Heroin	12
2.2.1 Vlastnosti.....	13
2.2.2 Závislost na heroinu	14
2.3 Metody analýzy opioidů	15
2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	15
2.3.2 Voltametrie	17
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 Vybavení.....	19
3.1.1 Chemikálie.....	19
3.1.2 Přístroje a pomůcky	19
3.2 Pracovní postupy	20
3.2.1 Příprava vzorků a roztoků	20
3.2.2 Příprava elektrod	21
3.2.3 Voltametrická měření	22

4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	25
4.1	Měření s elektrodou ze skelného uhlíku	25
4.2	Měření na SPCE	27
4.2.1	Ověření možnosti použití SPCE.....	27
4.2.2	Optimalizace podmínek pro měření na SPCE	29
4.2.3	Kalibrační závislost fentanylových roztoků	33
4.2.4	Detekce fentanylu v heroinu.....	36
5	ZÁVĚR.....	39
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40
7	PŘÍLOHY	43

Seznam použitých zkratk

BRP	Britton-Robinsonův pufr
CSWV	Cyklická square-wave voltametrie
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
F	Roztok fentanylu
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
H	Roztok heroinu
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MF	Mobilní fáze
NFF	Nefarmaceutický fentanyl
SCE	Nasycená kalomelová elektroda
SPCE	Tištěná uhlíková elektroda
SPGE	Tištěná grafenová elektroda
SWAdSV	Adsorpční stripping square-wave voltametrie
SWV	Square-wave voltametrie
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZE	Základní elektrolyt

1 ÚVOD

Toxikologické údaje potvrzují časté míchání fentanylu s heroinem v pouličních drogách. Před rokem 2013 byly hlášeny pouze občasné výskyty heroinu kontaminovaného fentanylem. Od té doby byla zjištěna přítomnost fentanylu téměř v každém zdroji heroinu. Detekovaný fentanyl v drogách pochází zejména ze dvou zdrojů. V západní Evropě a Austrálii je z největší části získáván ze zneužitých fentanylových léků, zatímco v Severní Americe a východní Evropě jsou drogy pančovány fentanylem vyrobeným v nelegálních varnách. Důvodem tohoto přimíchávání fentanylu do heroinu, přičemž vzniká tzv. „fake“ heroin, je mnohonásobné zvýšení účinnosti a současné snížení pořizovacích nákladů. V závislosti na tomto faktu, resp. z důvodu zamezení nebo alespoň snížení počtu předávkování opioidy, byly vynalezeny a distribuovány fentanylové testovací proužky. Studie ukázaly, že lidé užívající drogy vyvinuli zájem o možnost otestovat si látku před samotnou aplikací do těla. Díky tomu se částečně zvýšila kontrola drogového trhu. [1-4]

Hlavní rozdíly mezi „fake“ heroinem a čistým heroinem spočívají v extrémní rychlosti nástupu a síle účinků, s tím spojené krátké době stavu „pod vlivem“, která trvá zhruba jednu až dvě hodiny, a v překonání tolerance získané na čistý heroin. Hlášeny byly také nežádoucí účinky jako potíže s dýcháním i viděním, snížená citlivost spojená s mravenčením a brněním, hlavně v oblasti krku a týlní části hlavy. V současné době je obrovským problémem fakt, že jedinci užívající heroin byli z více než poloviny pozitivně testováni na fentanyl i přesto, že deklarovali, že jej nikdy neužívali. Kombinace heroinu a fentanylu významně zvýšila letalitu směsi, čímž výrazně vzrostl počet úmrtí. [1, 5]

Předávkování spojené s užitím pančovaného heroinu je otázkou jednotek minut, jelikož se dostaví silné smrtelné respirační deprese. Zatímco po aplikaci letální dávky nepančovaného heroinu dochází k exitu přibližně po dvaceti minutách, tudíž je možné jedince zachránit, jestliže se mu dostane rychlé první pomoci. [1,6]

Z důvodu výše zmíněné problematiky bylo cílem této práce vyvinout metodu, která bude dostatečně rychlá, selektivní, nenáročná na přístrojové vybavení či chemikálie, a hlavně použitelná v terénu. Důvodem byla snaha usnadnit bezpečnostním složkám práci, aby byl možný screening zabavené látky již na místě činu. Pro tyto účely byla zvolena voltametrická analýza s použitím tištěné uhlíkové elektrody, kterou lze využít v systémech s přenosnými miniaturizovanými potenciostaty. Spojením potenciostatu s chytrým telefonem přes Bluetooth je možné provádět analýzy a získávat výsledky v reálném čase. [7]

2. TEORETICKÁ ČÁST

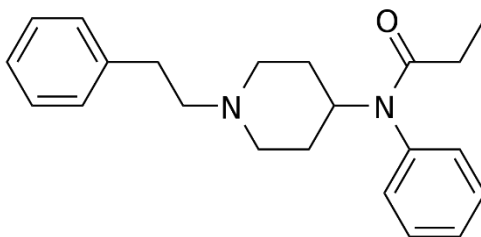
2.1 Fentanyl

Jedná se o silný synteticky vyrobený opioid. Paul Janssen jej roku 1959 připravil jako náhradu zastaralých anestetik. Ostatní vědci ho začali bedlivě studovat, zprvu testovat na zvířatech a posléze i na lidech. Směs fentanylu (50-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) společně s kyslíkem (100%) se začala jako první využívat při anestezii pacientů, kteří podstupovali operace mitrální chlopně či koronární tepny. Nyní se fentanyl používá jako narkotický analgetický doplněk při celkových i částečných anesteziích například při léčbě rakoviny. Velkou úlohu plní při léčbě chronických bolestí, kdy je aplikován transdermálně ve formě náplastí. Kromě příjmu skrze pokožku se dá aplikovat intravenózně, intranasálně, bukálně (stykem se sliznicí tváře, např. mezi dásně a tvář) nebo sublingválně (pod jazykem). [1, 8, 9]

Podle analgetického žebříčku WHO fentanyl náleží mezi velmi účinná analgetika 3. stupně. V České republice patří mezi přísně kontrolované léky, předepisované na recept s modrým proužkem a spadá pod nařízení vlády č. 463/2013 Sb., tj. Nařízení o seznamech návykových látek. [10] Na českém farmaceutickém trhu jej nalezneme pod značkami Adolor, Dolforin, Durogesic, Fentalis, Fentanyl Mylan, Fentanyl-Ratiopharm či Matrifen. [11-13]

2.1.1 Vlastnosti

Systematickým názvem dle IUPAC *N*-fenyl-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]propanamid patří mezi sloučeniny anilinového typu se sumárním vzorcem $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}$ (Obr. 1). Stručný přehled jeho fyzikálně-chemických vlastností je uveden v Tab. I. Fentanyl je v porovnání s morfinem zhruba 100krát silnější, značně lipofilní ($\log P = 2,3$ při pH 7,4 [14], $\log K_{ow} = 4,05$ [15]), tzn. že lehce prostupuje skrze polopropustné membrány buněk, což vysvětluje jeho vysokou biodostupnost (92 %) přes kůži. Po transdermálním vstřebávání mají účinky fentanylu zpoždění přibližně 6 až 12 hodin od aplikace. V průběhu 3 až 6 dnů dojde k ustálení stavu a po odstranění náplastí zůstane pod kůží rezervoár látky, kdy clearance může trvat i 24 hodin. [1, 12, 16]



Obr.1: Struktura fentanylu

Fentanyl se váže na opioidní receptory nervového systému jako agonista, což zapříčiňuje komplexní buněčné změny snižující vnímání bolesti a reakce na bolest, jinak řečeno zvyšují na ni toleranci. [16]

Tab. I: Fyzikálně-chemické vlastnosti fentanylu [12, 14, 15]

Molární hmotnost	336,471 g · mol ⁻¹
Struktura	krystalická
Teplota varu	461,1 °C
Teplota tání	84,1 °C
Rozpustnost ve vodě	200 mg · dm ⁻³ (při 25 °C)
log <i>P</i>	2,3 (při pH = 7,4)
log <i>K</i> _{OW}	4,05
p <i>K</i> _A (citrát)	8,3
p <i>K</i> _A	8,43

Primárně dochází k biotransformaci fentanylu v játrech za pomoci CYP3A4. Během studií na krysách se ukázalo, že se fentanyl oxiduje na různé polární produkty. Studie *in vivo* odhalily jako hlavní oxidační metabolit fentanylu norfentanyl, ale byla zjištěna i minoritní přítomnost dalších metabolitů, jako například despropionylfentanylu, hydroxyfentanylu či hydroxynorfentanylu. Po intravenózní aplikaci opioidu do těla byl během studie z těla vyloučen z více než 80 % ve formě metabolitů, přičemž 76 % bylo vyloučeno močí a 8 % výkaly. [17, 18]

2.1.2 Závislost na fentanyle

Obecně je největším původcem vzniku závislosti dlouhodobé nebo nadměrné užívání léků, tak je tomu i u fentanylu. Vyvolává podobné účinky jako ostatní opioidy, mezi něž patří ospalost, relaxace, euforie (i když méně výrazná než u heroinu/morfinu), závratě či halucinace. V případech aplikace vyšších dávek je s užíváním fentanylu spjata deprese dýchání (vedoucí až k apnoe), nevolnost, zvracení, zácpa, zadržování moči nebo také bradykardie (zpomalení srdeční frekvence pod fyziologickou mez). [1]

Dlouhodobé zneužití fentanylu vede k silným nežádoucím účinkům jako je tvorba pěny v dutině ústní, záchvaty a neschopnost zapamatovat si nové informace. Při aplikaci opioidu skrze nos, šňupáním prášku, nebo kouřením dochází k poškození plic. Při odvykání si se projevují typické abstinenní příznaky jako je třes, křeče (nejčastěji v oblasti dutiny břišní), průjem, kosterní bolest, zvýšené pocení a úzkosti. [1]

Fentanylová epidemie

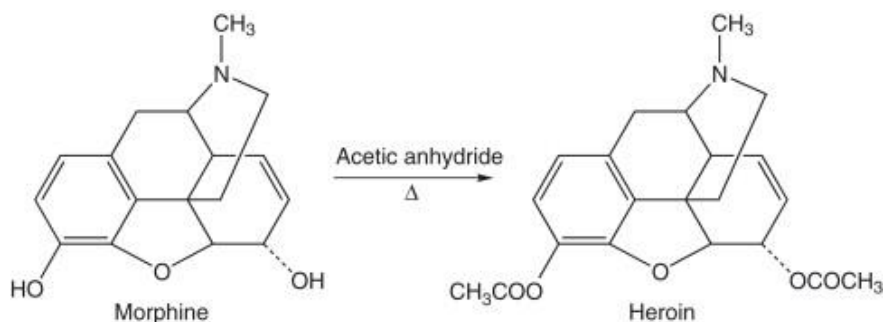
Již od 70. let 20. století jsou ve Spojených státech známy případy zneužívání, resp. předávkování se fentanylem nebo NFF. Epidemiologické zprávy a také informace soudního lékařství ukázaly, že postupem času se tento problém mnohonásobně rozšířil a již se netýká pouze Severní Ameriky, ale i Austrálie a Evropy. [1, 4]

Například v Britské Kolumbii (BK) mezi lety 2016 a 2018 byl fentanyl detekován v 88 % zkoumaných vzorků pouličních opioidních drog. Také zde v roce 2016 došlo k téměř 80% nárůstu počtu předávkování ve srovnání s rokem 2015, což tehdy vedlo k zavedení zdravotní nouze v této provincii. BK je považována za epicentrum krize v Kanadě, kde fentanyl způsobil 84 % úmrtí z předávkování (24,4 na 100 000 obyvatel v roce 2017). [19] Bylo vyzorováno, že v Kanadě zemře v důsledku předávkování fentanylem jeden člověk denně. [21] Dalším příkladem závažnosti fentanylové epidemie je fakt, že v USA zemřelo předávkováním za rok 2013 stejné množství lidí, jako za roky 2005, 2006 a 2007 dohromady. [20] V České republice bylo mezi lety 2016-2021 hlášeno 79 případů zneužití fentanylu, přičemž 30 % z nich bylo za účelem spáchání sebevraždy. [14]

Byla vytvořena strategie ke zmírnění této krize, jejíž součástí je distribuce naloxonu (léku potlačujícího účinky opioidů), zvýšená kontrola opioidních léčiv či vytvoření míst pro kontrolovanou aplikaci drog. [22]

2.2 Heroin

Poprvé byl syntetizován roku 1874 C. R. Wrightem, původem z Velké Británie, a o dvacet čtyři let později, roku 1898, byl německou firmou uveden na trh jako komerčně dostupné analgetikum. Prvním účelem jeho využití byla podpora léčby onemocnění plic, nejčastěji tuberkulózy, náhradou za morfin či kodein. Po zjištění vysoké toxicity a rychle se zvyšující tolerance na opioid bylo okolo roku 1920 jeho terapeutické použití zakázáno. Momentálně se jedná o celosvětově nejnebezpečnější a nejrozšířenější drogu opioidního typu. Aplikace heroinu nejčastěji probíhá intravenózní cestou, dalšími méně častými způsoby jsou skrze nosní sliznici – šňupáním, kouřením anebo také inhalačně. Způsob příjmu heroinu závisí na formě, v jaké se vyskytuje. Bílý heroin (heroin-hydrochlorid) bývá aplikován prvními dvěma způsoby, tzv. hnědý heroin, většinou obsahující jako příměs strychnin, který je méně rozpustný, bývá přijímán zbylými dvěma cestami. Pokud se k němu přidá kyselina citronová, čím se zvýší rozpustnost, je možno jej podat intravenózní cestou. Nejčastějším způsobem výroby je acetylace morfinu (Obr. 2). [23-25]

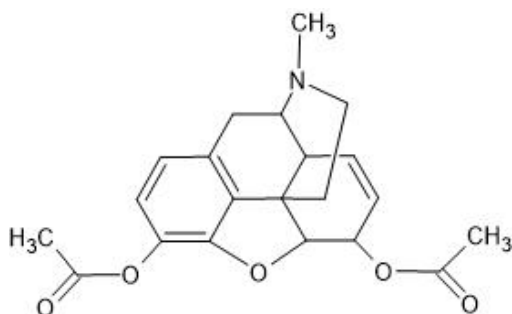


Obr. 2: Výroba heroinu acetylací morfinu, převzato z [23]

V České republice je evidován jako nelegální návyková látka. Stejně jako výše zmíněný fentanyl i heroin spadá pod nařízení vlády č. 463/2013 Sb., tj. Nařízení o seznamech návykových látek [10]

2.2.1 Vlastnosti

3,6-diacetylmorfin, nebo dle IUPAC (5*R*,6*S*)-4,5-epoxy-17-methylmorfin-7-en-3,6-diyldiacetát (Obr. 3), je narkotické analgetikum se sumárním vzorcem $C_{21}H_{23}NO_5$. Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v Tab. II. Oplývá podobnými účinky jako morfin, je však jen 5-10x silnější, což v porovnání s fentanylem zastává zhruba desetinu jeho síly. [26, 27]



Obr. 3: Struktura heroinu

Tab. II: Fyzikálně-chemické vlastnosti heroinu [26, 27]

Molární hmotnost	369,416 g · mol ⁻¹
Struktura	krystalická
Teplota varu	272-274 °C
Teplota tání	173 °C
Rozpustnost ve vodě	600 mg · dm ⁻³ (při 25 °C)
Rozpustnost v chloroformu	1 g / 1,5 cm ³
log <i>P</i>	1,69
log <i>K</i> _{OW}	1,58
p <i>K</i> _A	7,95 (při 25 °C)

Metabolismus heroinu probíhá v krvi, hlavně v játrech, kde deacetylací přechází na 6-acetylmorfin, který posléze opět deacetyluje na morfin. Ten poté přechází působením enzymu UGT2B7 na neaktivní metabolit morfin-3-glukuronid, v menší míře na morfin-6-glukuronid. Působením jaterního enzymu CYP3A4 je morfin schopný *N*-demethylace na normorfin. Vysoký podíl vzniklých metabolitů je následně z těla vyloučen močí, přičemž zhruba 10 % opustí tělo ve formě stolice. [27-29]

Biodostupnost heroinu po orálním požití je malá, jelikož dochází k úplnému first-pass efektu jater a extrajaterních účinků. Působení nastává až po přechodu na 6-acetylmorfin či morfin. Téměř všechny metabolity heroinu, resp. morfinu se v dnešní době analyzují z krve a moči. Po intravenózní aplikaci heroinu (12-20 mg) byl ve vzorcích krve morfin pozorován zhruba po dvaceti hodinách. V případě vykouření 10,5 mg heroinu byl morfin detekován v časovém rozmezí desítek minut až dvou hodin. V případě detekce 6-acetylmorfinu a morfinu v moči se časové intervaly pohybovaly v rozmezích dvou až jedenácti hodin a sedmi až padesáti třech hodin, v závislosti na velikosti aplikované dávky. [28]

Čistota heroinu na evropském trhu se pohybuje v rozmezí 11 % až 40 %, přičemž průměrná hodnota byla stanovena na 15 % až 29 %. Jedním z vizuálních indikátorů čistoty je barva prášku, jelikož čistý heroin má bílou barvu, zatímco znečištěné formy jsou zbarvené přes béžovou až po tmavě hnědou. [30]

2.2.2 Závislost na heroinu

Po aplikaci jedinec nabude stavu omámení, provázeného potížemi s koordinací a s tím spojenými zpomalenými reakcemi. Vizuálně lze pozorovat extrémní zúžení očních zornic. Dále je pozorovatelná vyprahlost v ústech, provázená zvracením a také mravenčení/svědění těla. Při nadměrném užívání a vybudované toleranci člověku bledne kůže a ztrácí hmotnost. Mimo jiné mu zvodnatí oči a nos, čímž jsou způsobené výtoky. Jako další jsou dobře viditelná místa vpichů, jelikož se užití drogy opakuje častěji a častěji. Celkově narušuje chod orgánů, jako je mozek, cévní soustava nebo játra. Při intravenózní aplikaci, zejména v pokročilém stádiu závislosti, je velmi časté spojení s tvorbou infekcí (opakované používání nehygienických jehel), což se týká žloutenek všech typů, přenosu HIV (sdílení jehel) a s tím spojeného oslabení imunity. Toto způsobuje zejména náchylnost plic k onemocněním, např. tuberkulózou.

Abstinenční příznaky se po vysazení objevují velmi rychle, v řádech hodin. Jsou provázeny velkými bolestmi svalového i kosterního aparátu, spojenými s křečemi a zimnicemi. Člověk má problémy se zažívacím traktem, průjmami a zvracením. [25]

2.3 Metody analýzy opioidů

2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Tato separační metoda slouží jak ke kvantitativnímu (z plochy píku), tak i ke kvalitativnímu (z retenčního času) určení analyzovaných směsí. Z důvodu vysoké citlivosti, selektivity a možnosti využití malých navážek je vhodnou metodou pro zkoumání opioidů. Velmi užitečnou a využívanou variantou je také její spojení s hmotnostní spektrometrií, které poskytuje téměř kompletní spektrum potřebných informací. Toto spojení doprovázejí určitá omezení ve složení mobilní fáze, jelikož musí být těkavá a nesmí interferovat s analytem. [5, 12, 20, 31]

Například využívání HPLC kolon, obsahujících monolitický oxid křemičitý (jeden kus vysoko porézního silikagelu), dovolí zvýšit průtok, což zvyšuje a zároveň zrychluje schopnost separace. Na základě této vlastnosti byla vyvinuta rychlá metoda analýzy heroinu.

Byla použita kolona Merck Chromolith RP_18e (100 × 4,6 mm) a UV detektor (při 210 nm). Jako složka A MF byl zvolen fosfátový pufr o koncentraci 15 mmol · dm⁻³, přičemž složkou B byl acetonitril. První tři minuty o průtoku 3 ml · min⁻¹ se mobilní fáze skládala z 90 % z fosfátového pufru a v průběhu pěti minut (5 ml · min⁻¹) se obsah acetonitrilu lineárně změnil z 10 % na 25 %. Následně byla MF zregenerována během tří minut (3 ml · min⁻¹) na původní poměr. Celkově jedna analýza trvala jedenáct minut.

Chromatogram, který poskytla uměle vytvořená směs obsahující obvyklé příměsi (morfin, paracetamol, kodein, papaverin, ...), potvrdil absolutní separaci složek. Všechny analyty se za zvolených podmínek eluovaly do sedmi minut, přičemž heroin měl retenční čas okolo 5,7 minut. Analýza reálného vzorku poskytla výsledky se stejnými retenčními časy a píky byly také dobře rozlišitelné, čímž byla potvrzena možnost využití této metody pro rychlou a jednoduchou analýzu. [32]

Během jiného experimentu byl UV detektor nastaven na měření při 230 nm. Použila se kolona Zorbax C₈ (150 × 4,6 mm, 5 μm) temperovaná na teplotu 31 °C. Složkou A mobilní fáze byla 0,1% (v/v) kyselina fosforečná, složkou B byla směs zmíněné kyseliny a 90% acetonitrilu. Průtok byl nastaven na 2 ml za sekundu s lineárním gradientem mobilní fáze z 0 → 100 % B/A během třiceti minut. Pomocí této metody se analyzovaly desítky léčiv, včetně fentanylu, který poskytl retenční čas 24,0 minut v bazickém systému HPLC. [31]

Jelikož se s rozšiřováním trhu objevují stále nové deriváty fentanylu, které mají také schopnost agonistické aktivity, vyskytují se i analoga výrazně zvyšující účinky (respirační deprese, ...) i při malých dávkách. Proto byla vyvinuta metoda ultra vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí (UPHLC-Ion Trap-MSⁿ). Společně s experimenty byla vytvořena knihovna spekter nových fentanylových analogů.

Během experimentu se pracovalo s reálnými vzorky plné krve, moči, tkáňovými homogenizáty mozku či jater. Byla využita kolona Thermo Scientific Acclaim RSLC 120 C18 (2,1 × 100 mm, 2,2 μm, 120 Å). Jako vodná mobilní fáze se využívala směs 2 mmol · dm⁻³ mravenčanu amonného, 0,1% kyseliny mravenčí a 1% acetonitrilu ve vodě (MF A). Organická fáze se skládala z 2 mmol · dm⁻³ mravenčanu amonného, 0,1% kyseliny mravenčí a 99% acetonitrilu ve vodě (MF B). Vstříkovalo se 5 μl vzorku, přičemž systémem protékalo 500 μl za minutu. Počáteční podmínky složení MF 99:1 (A:B) se lineárně, během osmi minut, měnily na 1:99 (A:B), kdy se vyeluovaly všechny sloučeniny. Během dalších tří minut se systém vrátil do původního stavu.

Touto metodou bylo analyzováno zhruba 500 vzorků (všechny kvůli důvodnému podezření, že jedinec užíval drogy). Bylo nalezeno 375 případů výskytu fentanylu nebo alespoň jednoho jeho analogu. Spolu s detekcí furanylfentanylu byl v 90 % nalezen i despropionylfentanyl. Pouze v jednom případě se neuváděl analog fentanylu jako jedna z příčin smrti. Tato metoda byla shledána jako neocenitelný nástroj pro identifikaci opiátů, resp. sledování a výzkum nových sloučenin. [5]

Byla vyvinuta vysoce citlivá, selektivní a spolehlivá analytická separační metoda, vhodná pro kvantifikaci fentanylu, deseti jeho analogů a heroinu v pouličních drogách. Metoda využívá spojení HPLC s duální UV a amperometrickou (AD) detekcí. Pro separaci byla využita kolona XDB-C8 (4,6 × 150 mm, 5 μm) temperovaná na 25 °C. Detekce probíhala při vlnové délce 205 nm. MF tvořil acetonitril a směs 20 mmol · dm⁻³ mravenčanu amonného o pH 7 s 100 mmol · dm⁻³ chloridem draselným v poměru 3:7 (v/v). Průtoková rychlost byla nastavena na 1,5 ml za minutu, separace trvala 30 min. Amperometrická detekce byla zajištěna wall-jet průtokovou celou využívající pracovní tištěnou grafitovou makroelektrodu, jejíž potenciál byl nastaven na hodnotu 1 V proti Ag/AgCl. Meze detekce dosahovaly koncentrací 0,45 mg · dm⁻³ (AD) a 0,16 mg · dm⁻³ (UV) pro heroin a 0,77 mg · dm⁻³ (AD), 0,54 mg · dm⁻³ (UV) pro fentanyl. Metoda byla využita k analýze policií zabavených pouličních drog. Příprava vzorku zahrnovala pouze rozpuštění navážky

vzorku drogy (12,5 mg) v mobilní fázi (25 ml) a filtraci přes 0,2 μm PTFE stříkačkový filtr. [20]

2.3.2 Voltametrie

Elektrochemická metoda, při které se sleduje závislost proudu na vkládaném potenciálu z vnějšího zdroje. Výsledkem měření je tzv. voltamogram, který tento vztah popisuje. Během voltametrických měření je možné dvouelektrodové (pracovní a referentní) či tříelektrodové zapojení (navíc přidána pomocná). Pracovní elektrody mohou být tvořeny buď rtuťí anebo tuhým materiálem, jako GCE, která je ideální pro měření uměle syntetizovaných látek. Referentními elektrodami bývají obvykle elektrody II. druhu, zatímco pomocné jsou tvořeny nejčastěji platinou nebo skelným uhlíkem. Také je možné použít SPCE, kdy jsou všechny tři elektrody nanášeny na jednu keramickou destičku. Během měření jsou tyto elektrody ponořeny ve voltametrické cele naplněné zkoumaným roztokem. [12, 33]

Využitím SWAdSV s SPCE byla vytvořena nízkonákladová, rychlá, jednoduchá a citlivá metoda určená pro identifikaci a částečnou kvantifikaci fentanylu ve vzorcích léků. Byly používány SPCE (vyrobené na sítotiskové tiskárně DEK 248), složené ze stříbrných vodičů, pseudoreferentní Ag/AgCl elektrody, uhlíkové pracovní elektrody a protielektrody. Nejprve byla provedena anodická předúprava pracovního povrchu (zvětšuje aktivní povrch elektrody a zároveň odstraní kontaminanty) v roztoku Tris-HCl o pH 8,5 (1,5 V, 40 s). Samotné analýzy byly provedeny za pomoci SWAdSV buď po 320s adsorpci z 5 ml roztoku nebo ze 100 μl kapky nanášené na SPCE. Měření bylo provedeno v potenciálovém rozmezí od -0,5 V do 1,6 V, s potenciálovým krokem 12 mV, amplitudou 75 mV a frekvencí 100 Hz.

Nejlepší odezvu poskytoval fentanyl v prostředí o pH 8,5. Kalibrační závislost proudové odezvy na koncentraci při adsorpci z roztoků ($0,075 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} - 6,88 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) vykazovala dvojitou lineární závislost. První tvořily roztoky $0,075 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} - 0,637 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a druhou směsí s koncentracemi $1,31 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} - 6,88 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Při adsorbování z kapky ($0,302 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} - 6,88 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) byla pozorována pouze jedna lineární závislost. Rozdíl pravděpodobně zapříčila možnost míchání směsi během adsorpce, celkové dynamiky a saturace povrchu elektrody. Zároveň byly vypočítány hodnoty *LOD* pro obě metody, přičemž pro první byla získána hodnota $0,037 \pm 0,017 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a pro druhou $0,233 \pm 0,025 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Celkově bylo prokázáno, že metoda je vhodná pro kvalitativní určení fentanylu

v zadržených vzorcích drog a také pro kvantitativní analýzu metodou kalibrační křivky. [34]

Další studie využila možnosti modifikovat povrch SPCE krystalickým porézním koordinačním organozinečnatým polymerem. Touto úpravou bylo docíleno zvětšení aktivní plochy, rychlejšího přenosu elektronů, snížení přepětí a celkového zvýšení účinnosti tištěné elektrody. Zinek zároveň katalyzoval oxidaci na SPCE. Během experimentu se používalo tříelektrodové zapojení voltametrické cely s referentní argentchloridovou, platinovou pomocnou a ne/modifikovanou SPCE pracovní elektrodou. Zkoumány byly $100\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vzorky fentanylu a měření probíhalo v prostředí fosfátového pufru ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) při pH 7,0 metodou DPV s potenciály od 0,4 V do 1,2 V.

Lepší výsledky poskytovaly vzorky měřené na modifikované SPCE v porovnání s nemodifikovanou, jelikož k oxidaci docházelo při o 0,2 V nižším potenciálu a zároveň se několikanásobně zvýšila proudová odezva. Při měření směsných roztoků (přidán oxykodon, dopamin, paracetamol, ...), kdy příměsi byly v tisícinásobném nadbytku, nebyla detekce fentanylu nijak ovlivněna. [21]

Metoda SWV s využitím SPGE byla využita pro rychlý screening vzorků falšovaného heroínu v prostředí o pH 7 a 12. Tištěná elektroda se skládala z grafitové pracovní, uhlíkové protielektrody a pseudoreferentní stříbrné elektrody. Měřilo se vždy po nakápnutí 50 μl analytu na SPGE. Parametry metody byly zvoleny: potenciál 0-1,2 V, potenciál kroku 5 mV s amplitudou 25 mV a frekvencí 10 Hz. Před samotným měřením vzorku bylo využíváno kondicionování elektrody při -0,8 V po dobu 180 s.

Byl stanoven detekční limit pro heroin $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s lineárním rozsahem do $500 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při měření v prostředí o pH 7 a maximálně $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při pH 12. Přičemž při vyšším pH poskytl heroin lepší přesnost detekce ve směsných roztocích. Jestliže se ale jednalo o směs obsahující heroin, kokain a paracetamol, bylo jako nejlepší prostředí pro rozlišení látek experimentálně zjištěno pH 5. Studie vcelku objasnila elektrochemický otisk prstu heroínu při zvolených podmínkách, zejména pH a SPGE. [30]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vybavení

3.1.1 Chemikálie

Opioidy

Heroin (Lipomed, Švýcarsko)

Fentanyl (Lipomed, Švýcarsko)

Kyseliny

Kyselina fosforečná 85% p. a. (Penta, Chrudim, Česká republika)

Kyselina boritá $\geq 99,5\%$ (Lachema, Brno, Česká republika)

Kyselina octová $\geq 99,8\%$ w/v (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Penta, Chrudim, Česká republika)

Báze

Hydroxid sodný $\geq 98\%$ p. a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)

Rozpouštědla

Methanol HPLC grade (Honeywell, USA)

Deionizovaná voda (18,2 M Ω , připravená systémem čištění vody Direct-Q 3 UV, Milli-Q, Merck, Německo)

Ostatní

Tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol) 99,9% (Sigma-Aldrich, Německo)

Suspenze aluminy Al₂O₃ 0,3 g/25 ml H₂O; velikost částic ≤ 50 nm (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Při přípravě roztoků byly použity automatické pipety Eppendorf Research Plus (Hamburk, Německo) s rozsahy 20-200 μ l a 100-1000 μ l, mikrostríkačka Hamilton 1-10 μ l (Bonaduz, Švýcarsko), magnetická míchačka IKA lab disk (Staufen, Německo) a zároveň bylo sledováno pH roztoku na pH metru InoLab pH 720, ve kterém byla zapojena kombinovaná elektroda s teplotním čidlem SenTix 41 (WTW, Německo). Vzorky a reagentie byly navažovány na analytických vahách Kern ALS 220-4 (Německo) nebo Mettler Toledo XSE205 DualRange (Ohio, USA). Pro komplexní promíchání a odplynění roztoků byla použita ultrazvuková lázeň BANDELIN Sonorex Digitech DT 31 H (Berlín, Německo).

Voltametrické experimenty byly prováděny s potenciostatem/galvanostatem Autolab PGSTAT128N v tříelektrodovém zapojení, řízeným pomocí softwaru Nova 1.11 (vše Metrohm Autolab, Utrecht, Nizozemsko). Během experimentů byly použity tištěné uhlíkové elektrody Metrohm DropSens SPCE DRP-C100 (Llanera, Španělsko) s pracovní uhlíkovou elektrodou, pseudoreferenční stříbrnou a pomocnou uhlíkovou elektrodou. Alternativní elektrochemický článek sestával z pracovní elektrody ze skelného uhlíku (GCE MF-2012, BASi, West Lafayette, USA), referenční kalomelové (Monokrystaly, Turnov, Česká republika) a pomocné platinové elektrody.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava vzorků a roztoků

Pufry

Pro zajištění stability a stejných pracovních podmínek při měření bylo připraveno 250 ml Britton-Robinsonova pufru. Zásobní roztok BRP o přibližném pH 2, který je složený ze směsi kyselin fosforečné, borité a octové (všechny o koncentracích $c = 0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), byl dotitrován na požadované pH 8,5 pomocí $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku hydroxidu sodného.

Dále bylo připraveno 100 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku Tris, který byl dotitrován $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem kyseliny chlorovodíkové na potřebné pH 8,5.

Vzorky opioidů

Byly připraveny roztoky heroinu a fentanylu o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Po navážení byly opioidy rozpuštěny v methanolu a promíchány v ultrazvukové lázni. Tyto zásobní roztoky byly následně používány pro přípravu měřených směsí. Polovinu objemu směsi tvořil BRP, k němuž se přidalo potřebné množství zásobního roztoku opioidu a deionizované vody k získání požadované koncentrace.

Složení roztoků fentanylu (F) pro konstrukci kalibračních závislostí je uvedeno v Tab. III.

Tab. III: Příprava kalibračních roztoků; obsahuje parametry: celková koncentrace fentanylu v kalibračním roztoku (c); objem (V) BRP, vody a zásobního roztoku fentanylu

Číslo roztoku	c [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	V (BRP) [μl]	V (H_2O) [μl]	V ($1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ F) [μl]
Roztok č. 1	$1 \cdot 10^{-4}$	500	400	100
Roztok č. 2	$5 \cdot 10^{-5}$	500	450	50
Roztok č. 3	$2,5 \cdot 10^{-5}$	500	475	25
Roztok č. 4	$1 \cdot 10^{-5}$	500	490	10
Roztok č. 5	$5 \cdot 10^{-6}$	500	495	5
Roztok č. 6	$2,5 \cdot 10^{-6}$	500	497,5	2,5
Roztok č. 7	$1 \cdot 10^{-6}$	500	499	1

Směsné vzorky fentanylu (F) a heroinu (H) byly připraveny podle Tab. IV. Kvůli nežádoucímu vysokému podílu methanolu v roztocích byly roztoky s vyšším obsahem heroinu připraveny ze zásobního roztoku heroinu o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tab. IV: Příprava směsných roztoků fentanylu s heroinem; obsahuje parametry: výsledný poměr opioidů v roztoku, objem (V) BRP, vody, zásobního roztoku fentanylu a zásobního roztoku heroinu

Číslo směsi	Poměr F:H	V (BRP) [μl]	V (H_2O) [μl]	V ($1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ F) [μl]	V ($10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ H) [μl]
Směs č. 1	1:1	500	300	100	100*
Směs č. 2	1:10	500	420	40	40
Směs č. 3	1:100	500	390	10	100
Směs č. 4	1:1000	500	399	1	100

*byl použit $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok heroinu (H)

3.2.2 Příprava elektrod

Uhlíkové tištěné elektrody (SPCE)

Před i po každém měření byla SPCE důkladně opláchnuta destilovanou vodou. Čištění elektrod bylo zkušeno chemicky za použití organických rozpouštědel jako methanol, ethanol či hexan. Bohužel se všechna zvolená rozpouštědla ukázala jako nevhodná, protože zvyšovala proudové pozadí, nebo v horším případě rozpustila části SPCE.

Následně se elektrody začaly čistit elektrochemicky v roztoku BRP pH 8,5. Základem bylo kondicionování elektrod při potenciálu 1,5 V po dobu 40 sekund. Po 10s ekvilibraci byly elektrody kontrolovány cyklickou square-wave voltametrií (CSWV) s parametry, které jsou v Tab. V.

Tab. V: Parametry CSWV metody pro kontrolu SPCE po kondicionování při $E = 1,5 \text{ V}$, $t = 40 \text{ s}$ v roztoku BRP pH 8,5

Počáteční potenciál katodického skenu [V]	1
Koncový potenciál katodického skenu [V]	-0,6
Počáteční potenciál anodického skenu [V]	-0,6
Koncový potenciál anodického skenu dráhy [V]	1
Amplituda pulzu [mV]	50
Potenciál kroku [mV]	4
Časový interval kroku [ms]	40
Frekvence [Hz]	25

Elektroda ze skelného uhlíku (GCE)

Před měřením každého roztoku byla elektroda ze skelného uhlíku leštěna (krouživými pohyby ve tvaru čísla 8) na textilní lešticí podložce napuštěné vodnou suspenzí aluminy. Poté byla GCE důkladně opláchnuta destilovanou vodou.

Všechny ostatní použité elektrody (pomocná a referentní) byly před použitím opláchnuty destilovanou vodou. Pokud se v danou chvíli nepoužívaly, byly uchovávány v příslušných roztocích.

3.2.3 Voltametrická měření

Voltametrická měření byla prováděna technikou square-wave voltametrie (SWV). Pro všechna níže zmíněná měření byly nastaveny tyto parametry: amplituda pulzu $\pm 50 \text{ mV}$, potenciálový krok $\pm 4 \text{ mV}$, časový interval pulzu 40 ms , frekvence 25 Hz , rychlost polarizace $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$, prodleva před skenem 5 s .

Cyklická SWV s GCE

Touto metodou se analyzovaly roztoky základního elektrolytu (BRP pH 8,5), fentanylu ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a heroinu ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Voltametrická měření se prováděla ve dvoudílné cele. Přípravené vzorky analytů byly odměřeny v objemu $200 \mu\text{l}$ do vnitřní voltametrické nádoby, ve které byla ponořena pomocná platinová a naleštěná pracovní elektroda ze skelného uhlíku. Do vnější nádoby obsahující 2 ml BRP pH 8,5 byla vložena referentní nasycená kalomelová elektroda. Roztoky v obou nádobkách byly odděleny vycorovou fritou, která umožnila vodivé propojení elektrochemického článku. Při měření byly nastaveny podmínky uvedené v Tab. VI.

Tab. VI: Parametry měření metodou CSWV s GCE; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Potenciál kondicionování [V]	0,95
Čas kondicionování [s]	0
Počáteční potenciál katodického skenu [V]	0,95
Koncový potenciál katodického skenu [V]	-0,4
Počáteční potenciál anodického skenu [V]	-0,4
Koncový potenciál anodického skenu [V]	0,95

Roztoky základního elektrolytu, fentanylu a heroinu o stejném složení, jaké bylo uvedeno výše, a také roztok směsi fentanylu a heroinu (koncentrace obou opioidů $c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byly analyzovány pomocí CSWV s modifikovanými parametry. Nejprve byla pracovní GCE polarizována v anodickém směru, poté v katodickém a opět v anodickém směru. Nastavení hodnot potenciálů je uvedeno v Tab. VII.

Tab. VII: Parametry měření modifikovanou metodou CSWV s GCE; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Potenciál kondicionování [V]	0
Čas kondicionování [s]	0
Počáteční potenciál 1. anodického skenu [V]	-0,4
Koncový potenciál 1. anodického skenu [V]	1,4
Počáteční potenciál katodického skenu [V]	1,4
Koncový potenciál katodického skenu [V]	-0,4
Počáteční potenciál 2. anodického skenu [V]	-0,4
Koncový potenciál 2. anodického skenu [V]	1,4

Transferová adsorpční cyklická SWV s SPCE

Touto metodou s SPCE byly sledovány závislosti výšky píku fentanylu na době jeho adsorpce z externího roztoku na elektrodu, na potenciálu preelektrolýzy, na poměru fentanylu a heroinu (Tab. IV) a byla proměřena kalibrační řada roztoků fentanylu (Tab. III).

K potenciostatu byla připojena SPCE, která se při rozpojeném elektrodovém obvodu vkládala do zkumavky obsahující analyzovaný roztok (1 – 1,5 ml). Po určité době adsorpce byla SPCE vyjmuta z roztoku analytu, opláchnuta destilovanou vodou a vložena do roztoku základního elektrolytu (750 μl BRP a 750 μl H₂O). Podmínky měření viz. Tab. VIII.

Tab. VIII: Parametry měření metodou transferové adsorpční CSWV s SPCE; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Potenciál preelektrolýzy [V]	1,2
Čas preelektrolýzy [s]	5
Počáteční potenciál katodického skenu [V]	1
Koncový potenciál katodického skenu [V]	-0,6
Počáteční potenciál anodického skenu [V]	-0,6
Koncový potenciál anodického skenu [V]	1

Cyklická SWV s SPCE

Měřením CSWV s SPCE bylo provedeno ověření, zda je možné, za pomoci této metody, resp. elektrody, detekovat fentanyl v roztoku. Dále byla touto metodou zjištěna závislost mezi výškou píku fentanylu a počtem opakování měření na jedné elektrodě. Analyzovaly se roztoky základního elektrolytu (750 μl BRP o pH 8,5 + 750 μl H₂O), 0,1mmol \cdot dm⁻³ fentanylu (750 μl BRP + 600 μl H₂O + 150 μl 1mmol \cdot dm⁻³ F) a elektrody v základním elektrolytu, na kterých byl naadsorbován fentanyl z externího roztoku. Podmínky byly nastaveny podle Tab. IX.

Tab. IX: Parametry měření metodou CSWV s SPCE; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Potenciál kondicionování [V]	0
Čas kondicionování [s]	0
Počáteční potenciál 1. anodického skenu [V]	-0,4
Koncový potenciál 1. anodického skenu [V]	1,2
Počáteční potenciál katodického skenu [V]	1,2
Koncový potenciál katodického skenu [V]	-0,4
Počáteční potenciál 2. anodického skenu [V]	-0,4
Koncový potenciál 2. anodického skenu [V]	1,2

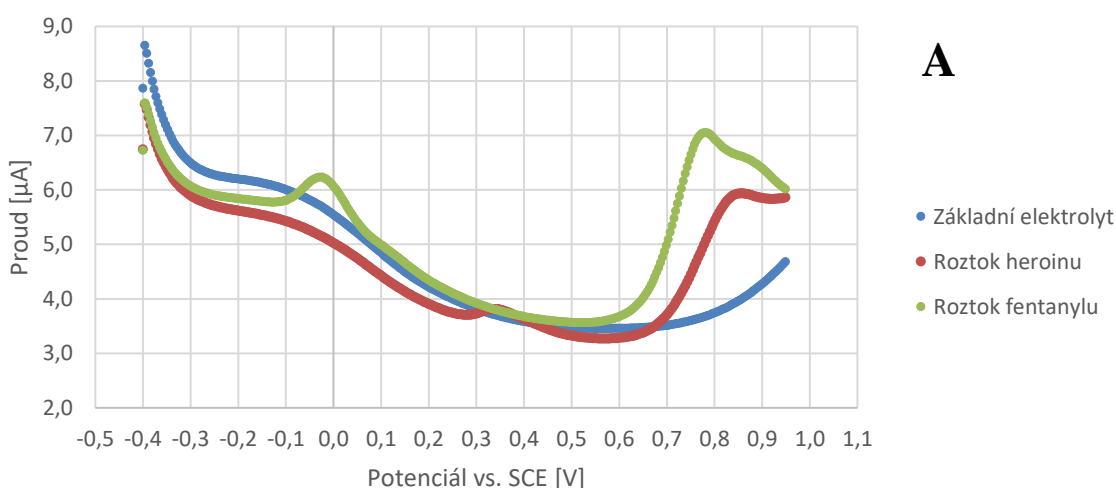
Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru QC.Expert 3.2 (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Česká republika). Hodnoty *LOD* a *LOQ* byly vypočítány podle vztahů $LOD = 3s_b/a$, $LOQ = 10s_b/a$, kde s_b je směrodatná odchylka úseku, a je směrnice kalibrační přímky.

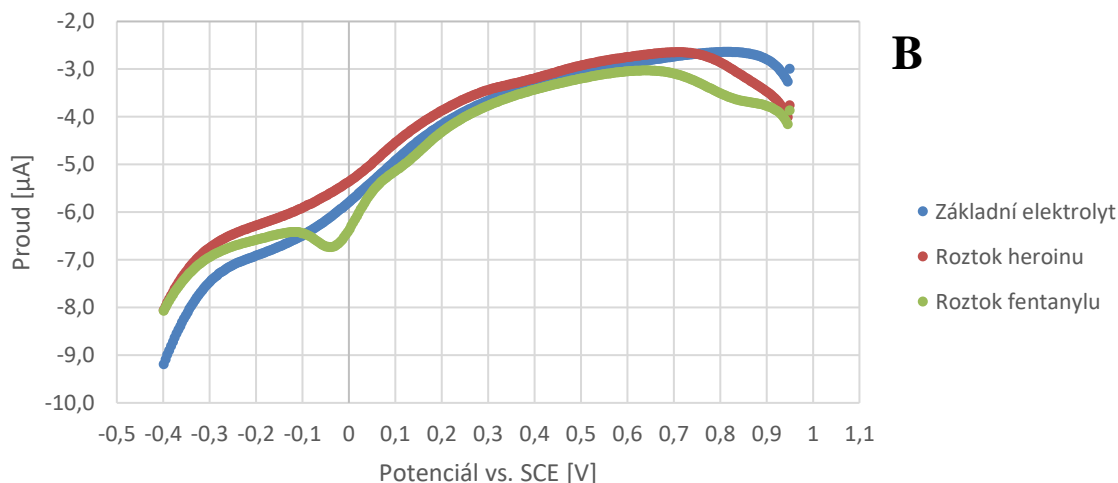
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Měření s elektrodou ze skelného uhlíku

Metodou cyklické SWV v elektrochemickém článku s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku bylo testováno, zda lze heroinu v roztoku voltametricky odlišit od fentanylu. Metoda využívá polarizace elektrody nejprve v katodickém směru. Počáteční potenciál byl nastaven na hodnotu 0,95 V, při které se očekává elektrochemická oxidace obou analytů. Pokud při elektrochemické reakci vznikne redukovatelná látka, projeví se v katodickém směru polarizace elektrody proudovým signálem. Po opětovném otočení směru polarizace je v následujícím skenu možné sledovat proudový signál jak samotného analytu, tak případně i dalších vzniklých reakčních produktů. Ostatní parametry měření i složení analyzovaných roztoků jsou popsány výše v kapitole 3.2.3.

Z Obr. 4 je dobře viditelné, že zatímco v okolí potenciálu 0,8 V poskytly v anodickém směru polarizace proudový signál oba analyty, fentanyl i heroin, tak kolem 0 V poskytl pík pouze fentanyl, a to jak v katodickém, tak anodickém směru polarizace. To znamená, že oxidací fentanylu vzniká látka, která se v katodickém skenu elektrochemicky redukuje a produkt této reakce se v obráceném směru polarizace zpětně oxiduje. Heroin podobnou reakci neposkytuje. Analýza tedy potvrdila možnost použití voltametrie na rozlišení obou vybraných opioidů. Z tohoto zjištění vycházely další experimenty.

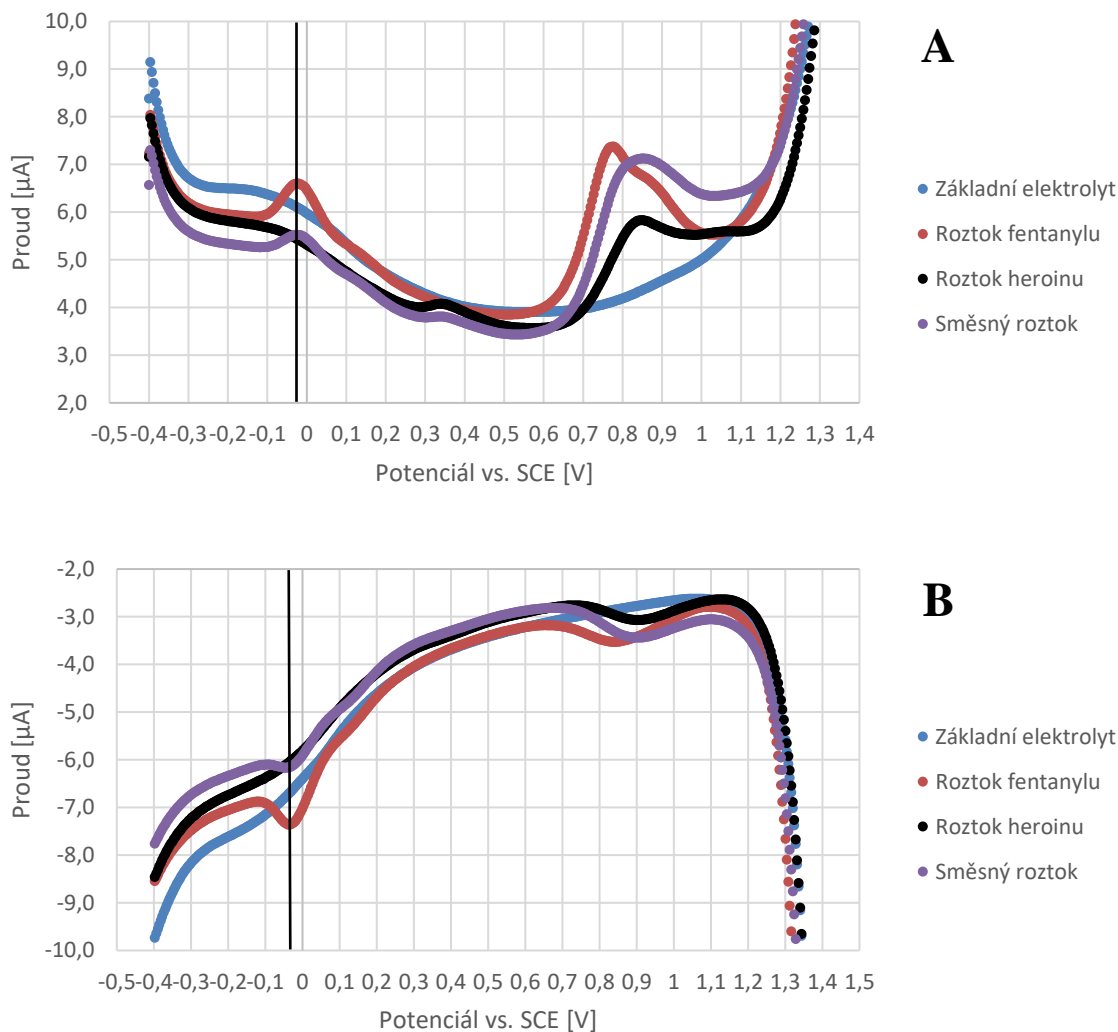




Obr. 4: CSW voltamogramy ZE (BRP pH 8,5), fentanylu ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a heroinu ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na GCE; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

S použitím CSWV s elektrodou ze skelného uhlíku byly proměřeny roztoky popsané v kap 3.2.3 a zjišťovalo se, zda je možné analyzovat roztok směsi obou opioidů s cílem detekovat fentanyl ve směsném vzorku.

Při voltametrické analýze směsi heroinu a fentanylu byl při potenciálu, kde poskytují oba opioidy signál, pozorován jediný široký proudový pík (Obr. 5). Specifický fentanylový pík/protipík při potenciálu kolem 0 V nebyl nijak ovlivněn přítomností heroinu. Toto zjištění otevírá možnost detekovat pomocí CSWV heroin pančovaný fentanylem. Z hlediska praktické aplikace metody pro analýzu v terénních podmínkách byly další experimenty prováděny na tištěných uhlíkových elektrodách (SPCE), které integrují tříelektrodový elektrochemický článek na jedné keramické destičce a jsou primárně určeny pro rychlé jednorázové použití.



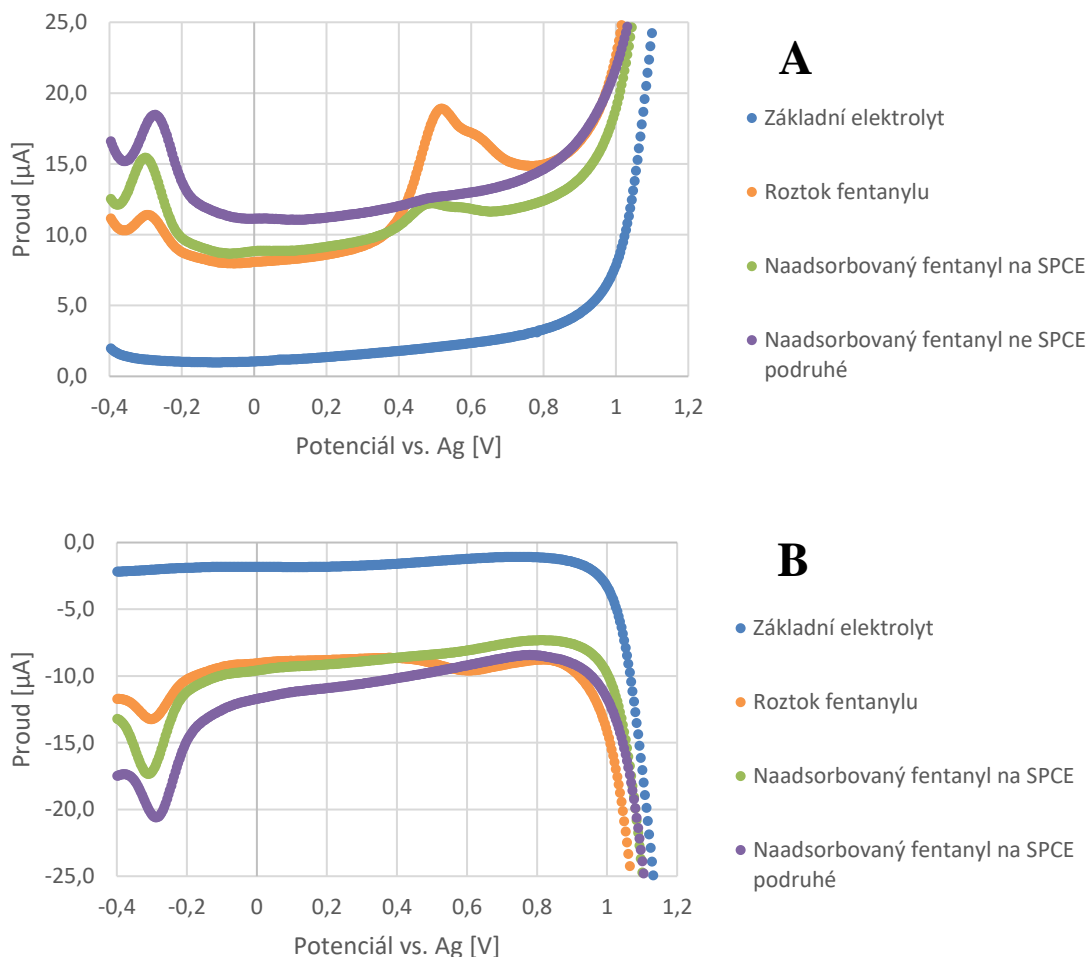
Obr. 5: CSW voltamogramy základního elektrolytu (BRP pH 8,5), fentanylu ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), heroinu ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a směsného roztoku ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ obou analytů) na GCE; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

4.2 Měření na SPCE

4.2.1 Ověření možnosti použití SPCE

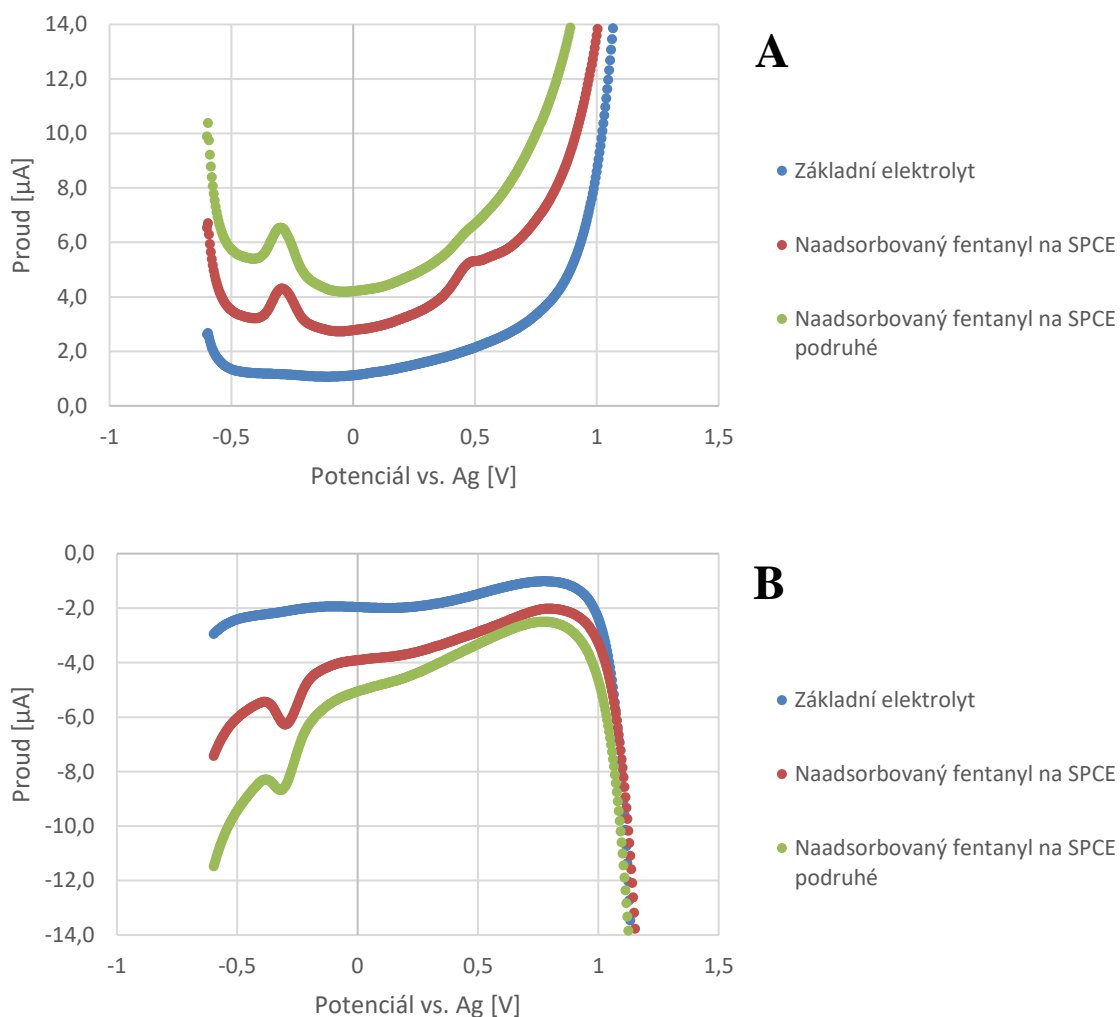
Metodou cyklické SWV s SPCE byly proměřeny roztoky fentanylu a heroinu v základním elektrolytu BRP pH 8,5 popsané v kapitole 3.2.3. Provedení analýzy ukázalo, že voltamogramy na tištěné uhlíkové elektrodě se velmi podobají záznamům pořízeným s GCE a poskytují dobře detekovatelný fentanylový pík/protipík. Rozdílem oproti měření v elektrochemickém článku s pracovní GCE a referentní nasycenou kalomelovou elektrodou bylo posunutí proudových píků do záporných hodnot potenciálů. Toto posunutí je způsobeno použitím jiné referentní elektrody, kterou je v případě SPCE síťotiskovou technikou nanesený proužek stříbrného inkoustu. Potenciál této pseudoreferentní elektrody má

přibližně o 0,27 V pozitivnější hodnotu oproti potenciálu SCE (0,241 V proti SHE při 25 °C) a vykazuje menší stabilitu oproti SCE. Z Obr. 6 je zřetelné, že vyšší proudovou odezvu při -0,3 V poskytuje fentanyl naadsorbovaný na elektrodě z externího roztoku než fentanyl přítomný v analyzovaném roztoku.



Obr. 6: CSW voltamogramy s SPCE: ZE (BRP pH 8,5), fentanyl v roztoku ($c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), naadsorbovaný fentanyl na SPCE - změřený poprvé a bezprostředně podruhé na stejné SPCE; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Tato informace se ukázala jako klíčová pro vývoj postupu analýzy fentanylu vedle heroínu. Další experimenty byly prováděny technikou transferové adsorpční cyklické SWV, kdy se analyt naadsorboval na pracovní elektrodu z roztoku opioidů a voltamogram se zaznamenával v roztoku čistého základního elektrolytu BRP o pH 8,5 (kap. 3.2.3). Výsledné voltamogramy (Obr. 7) ukazují křivku samotného základního elektrolytu a křivky fentanylu, jednou naadsorbovaného z externího roztoku o koncentraci $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po prvním a druhém skenu na těžce SPCE. Na obou křivkách je zřetelný fentanylový pík/protipík při potenciálu okolo -0,3 V.



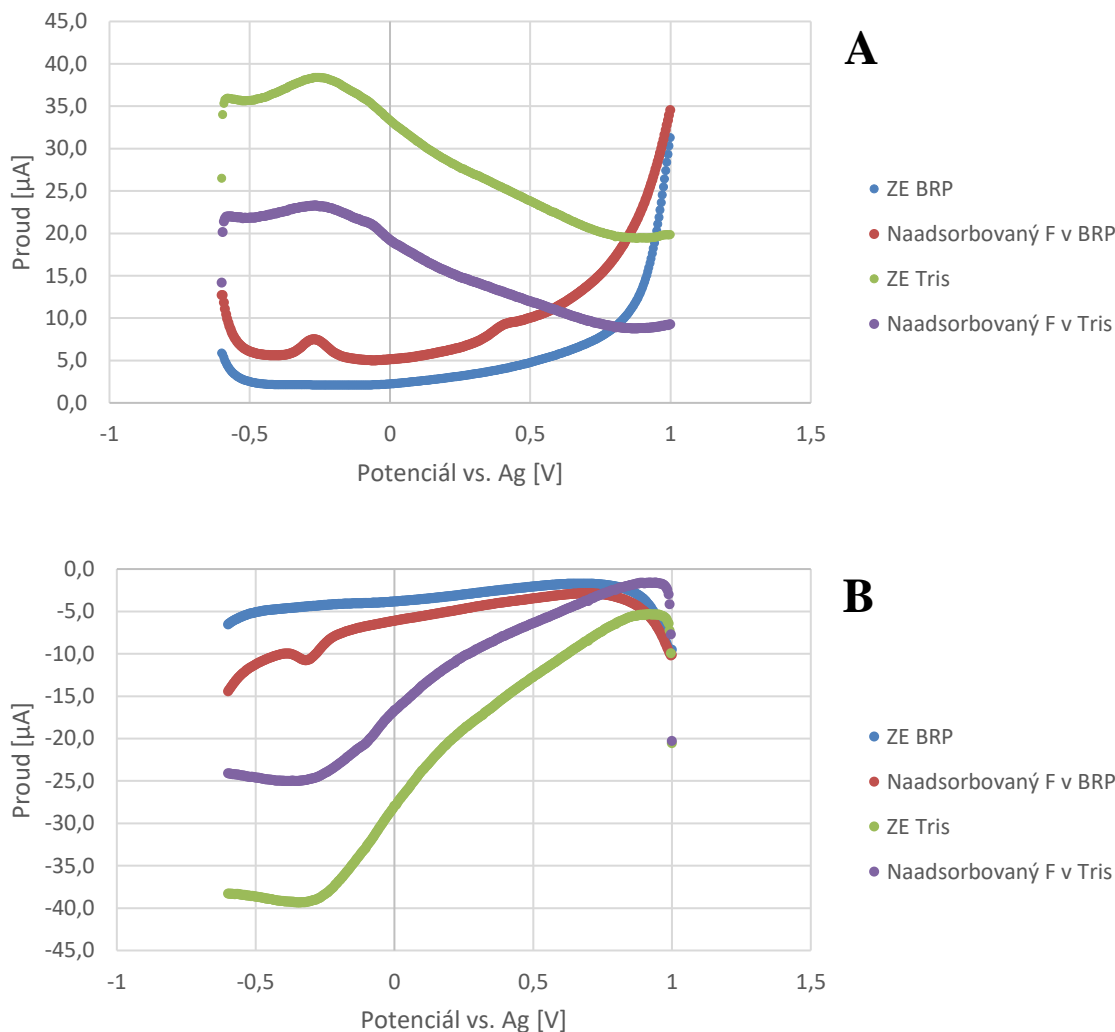
Obr. 7: Transferové adsorpční CSW voltamogramy ZE (BRP pH 8,5), naadsorbovaného fentanylu ($z F o c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) změřeno poprvé a podruhé na téže SPCE; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

4.2.2 Optimalizace podmínek pro měření na SPCE

Složení vzorku

Jedním z rozhodujících faktorů reprodukovatelnosti a opakovatelnosti analýzy je stabilita prostředí. Té bylo docíleno použitím vhodného pufru. Vedle BRP o pH 8,5 byl testován pufr Tris o stejném pH, který však poskytoval vysokou proudovou odezvu v potenciálové oblasti -0,4 až -0,2 V, která je specifická pro výskyt fentanylového píku/protipíku (Obr. 8). Proto byl shledán jako nevhodný a dále se nepoužíval.

Bylo zjištěno, že pokud je v externím roztoku, z něhož se má fentanyl naadsorbovat na elektrodový povrch, více než 20 % methanolu, dochází pravděpodobně ke konkurenční adsorpci methanolu, která se projeví nárůstem kapacitního proudu, v němž se ztrácí signál fentanylu. Toto prostředí je tudíž pro transferovou voltametrickou metodu nepoužitelné.



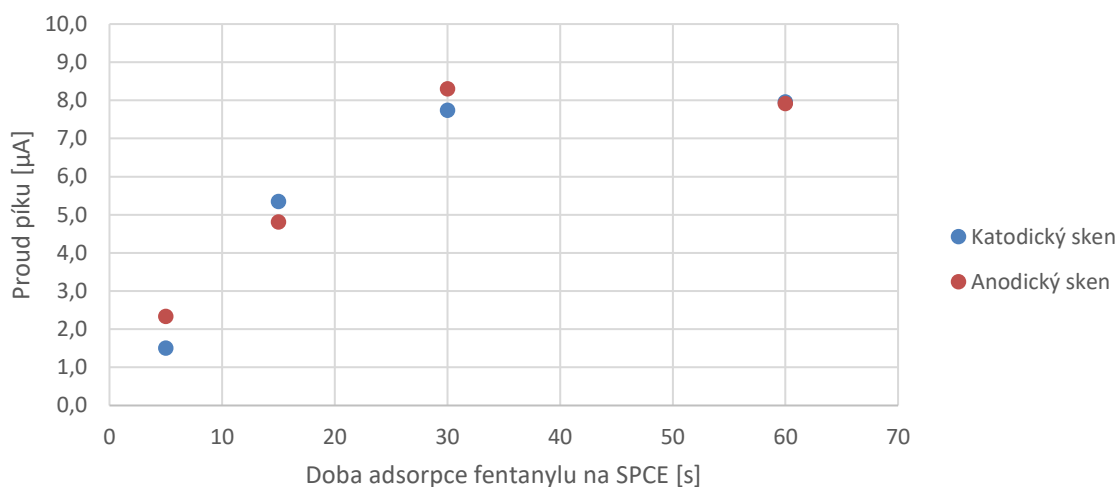
Obr. 8: Transferové adsorpční CSW voltamogramy ZE (BRP pH 8,5), adsorbovaného fentanylu v BRP ($z F o c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), ZE (Tris pH 8,5), adsorbovaného fentanylu v Tris ($z F o c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$); A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Vliv doby adsorpce fentanylu na elektrodu

Pro zjištění nejlepších podmínek měření byla sledována závislost výšky proudové odezvy fentanylu na době jeho adsorpce na elektrodu. Fentanyl byl adsorbován z 1,5 ml roztoku o koncentraci $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v BRP o pH 8,5 s obsahem methanolu 15 % (v/v). Po přípravě elektrody (kap. 3.2.2) byla SPCE ponořena do roztoku na definovanou dobu a poté opět opláchnuta destilovanou vodou. Pro měření byla použita metoda transferové adsorpční CSWV.

Z výsledků (Obr. 9) je patrné, že nejvhodnější doba adsorpce je 30 s, protože fentanyl vykázal největší proudovou odezvu. Signál analytu při adsorpci prováděné do půl minuty rostl téměř lineárně. Při době adsorpce 30 s bylo pravděpodobně dosaženo saturace povrchu

elektrody a při delší době adsorpce se proud píku nezvýšil, tudíž nebylo třeba adsorpci dále prodlužovat.

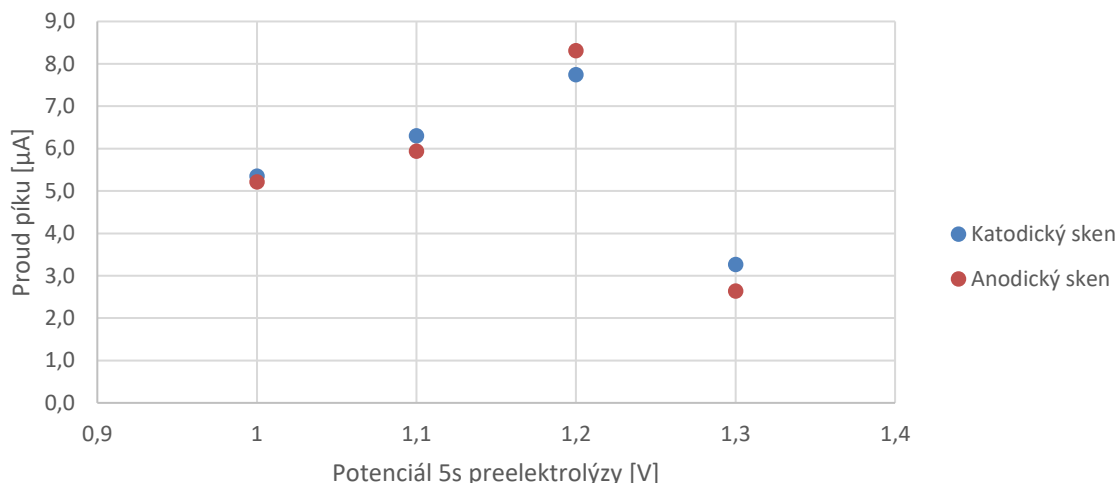


Obr. 9: Závislost proudové odezvy fentanylu naadsorbovaného z roztoku o $c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na době adsorpce fentanylu na povrch SPCE; měřeno metodou transferové adsorpční CSWV; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Vliv potenciálu preelektrolýzy

Dalším testovaným parametrem byl potenciál preelektrolýzy adsorbovaného fentanylu. Během preelektrolýzy je naadsorbovaný fentanyln oxidován na formu, která poskytuje v následujících potenciálových skenech typický pík/protipík na square-wave voltamogramu. Doba preelektrolýzy byla při každém pokusu nastavena na 5 s. Všechny ostatní parametry byly zachovány jako v předešlé kapitole, kde se určila vhodná doba adsorpce opioidu na elektrodu.

Na Obr. 10 je viditelné zvyšování proudu píku s rostoucím potenciálem preelektrolýzy, které dosahuje maxima při 1,2 V. S dalším nárůstem potenciálu proud píku klesá. Důvodem může být další elektrodová reakce fentanylu, resp. jeho oxidačního (mezi)produktu.

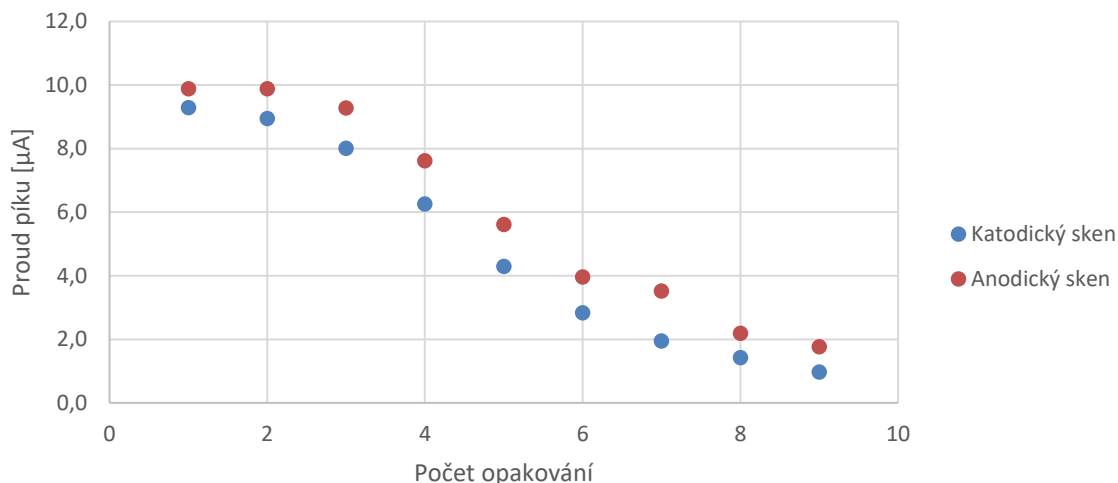


Obr. 10: Závislost proudové odezvy fentanylu naadsorbovaného z roztoku o $c = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na velikosti potenciálu aplikovaného na SPCE během 5s preelektrolýzy; měřeno metodou transferové adsorpční CSWV; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Vliv počtu opakování měření na jedné elektrodě

I přesto, že je známo, že SPCE je elektroda vyrobená a určená na jedno použití, bylo testováno, jak se bude chovat analytický signál fentanylu při opakovaném měření na jedné elektrodě. Závislost výšky píku/protipíku fentanylu na počtu opakovaných analýz na jedné SPCE byla sledována za optimalizovaných podmínek (viz výše) metodou CSWV. Cyklus zahrnoval adsorpci fentanylu z $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku, opláchnutí elektrody a následně 9krát zopakovanou voltametrickou analýzu CSWV se stejnou elektrodou ve stejném roztoku ZE.

Dle Obr. 11 je zřetelné, že první dvě opakování analýzy poskytly téměř stejné proudové odezvy analytu, využitelné pro jeho kvantitativní analýzu. Opakovaným měřením ale proudová odezva fentanylu sigmoidně klesala a zároveň rostl kapacitní proud pozadí, který překrýval píky fentanylu a znesnadňoval jejich vyhodnocení. Tyto signály je tedy možné použít jen na kvalitativní určení přítomnosti fentanylu.



Obr. 11: Závislost proudové odezvy jednou naadsorbovaného fentanylu (z F o c = 0,1 mmol · dm⁻³) na počtu opakování měření na jedné SPCE; měřeno metodou CSWV; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

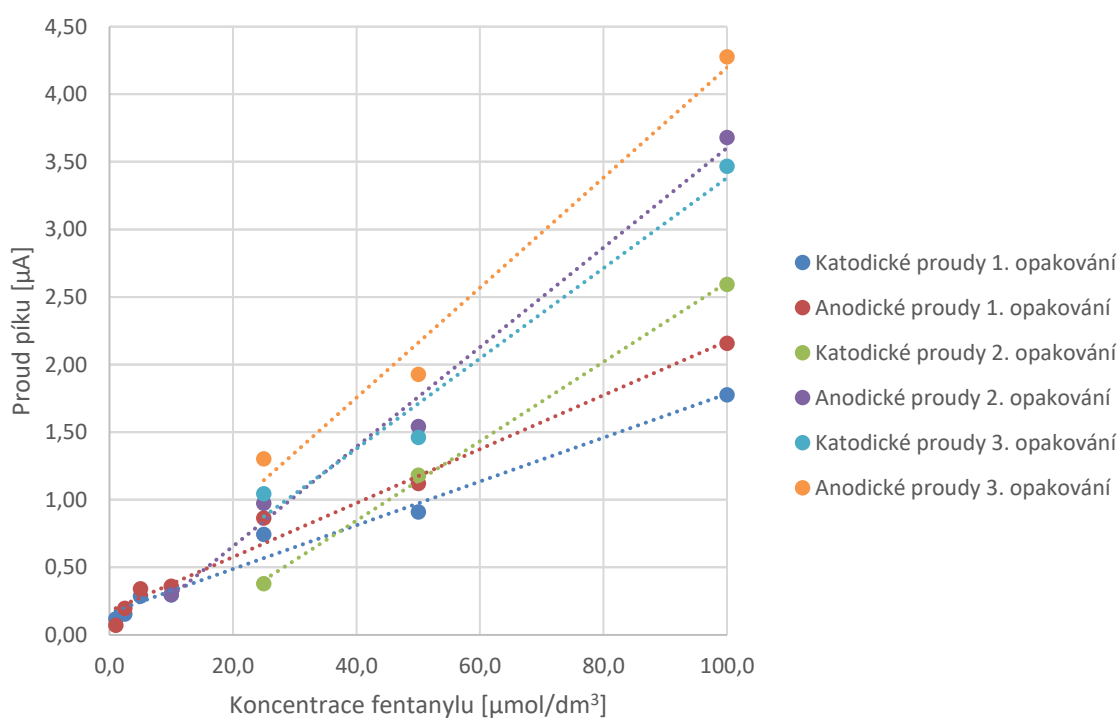
4.2.3 Kalibrační závislost fentanylových roztoků

Série kalibračních roztoků připravená dle kapitoly 3.2.1 v koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-4}$ mol · dm⁻³ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol · dm⁻³ byla měřena metodou transferové adsorpční CSWV za optimalizovaných podmínek. Z důvodu omezené opakovatelnosti měření na jedné SPCE zjištěné v předchozím experimentu byla první série měření provedena tak, že každý kalibrační roztok byl analyzován vždy na nové elektrodě. Posléze byla série měření opakována ještě dvakrát (vždy na příslušné elektrodě), aby se zjistilo, zda i méně koncentrované roztoky poskytnou adekvátní odezvu na již použitých elektrodách.

Z proudů píků zaznamenaných po adsorpci fentanylu z jednotlivých kalibračních roztoků (Tab. III) byly sestrojeny kalibrační závislosti, které byly proloženy regresními přímkami (Obr. 12). Parametry regresních přímek jsou uvedeny v Tab. X. Proudové odezvy pro nižší koncentrace ($1 \cdot 10^{-5}$ mol · dm⁻³ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol · dm⁻³) bylo možné vyhodnotit pouze z první série měření. Z regresních závislostí byly vypočteny hodnoty $LOD = 1,73$ µmol · dm⁻³ a $LOQ = 5,76$ µmol · dm⁻³ pro katodický sken. Vypočítané hodnoty anodického skenu byly velmi podobné, $LOD = 1,05$ µmol · dm⁻³ a $LOQ = 3,50$ µmol · dm⁻³. V případě druhého a třetího opakování bylo možné odečíst signály pouze u tří nejkonzentrovanejších roztoků ($1 \cdot 10^{-4}$ mol · dm⁻³, $5 \cdot 10^{-5}$ mol · dm⁻³ a $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol · dm⁻³). Důvodem bylo již zmíněné zvyšování kapacitního proudu, které znesnadňovalo vyhodnocení analytického signálu.

Tab. X: Parametry regresních kalibračních přímek ($y = ax + b$), směrodatné odchylky směrnice (s_a) a úseku (s_b) a korelační koeficient R pro fentanyl, měřeno metodou transferové adsorpční CSWV na SPCE; $\alpha = 0,05$

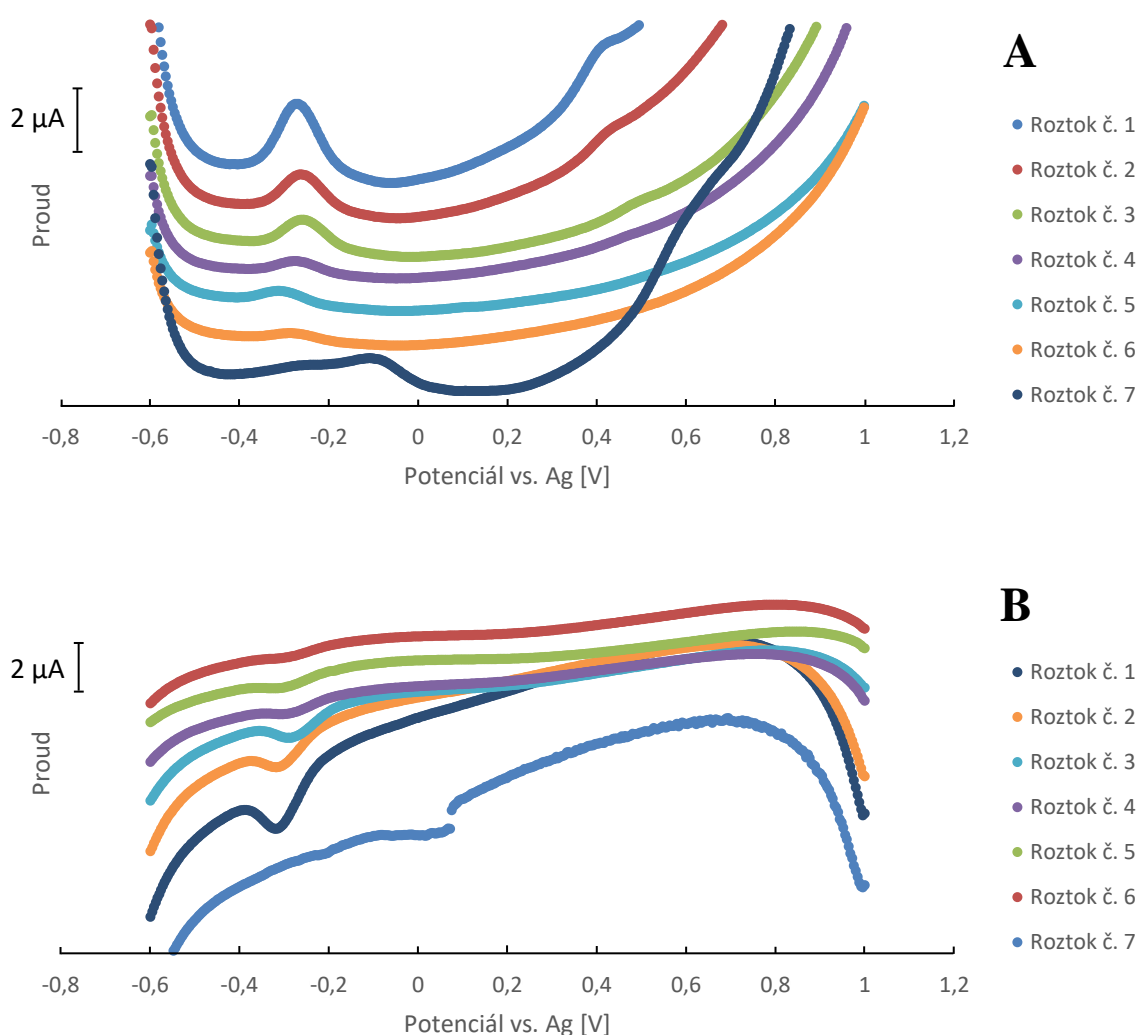
Číslo měření/sken	Koncentrační rozsah [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	$a \pm s_a$ [$\mu\text{A} \cdot \text{dm}^3 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$]	$b \pm s_b$ [μA]	R
1/katodický	1-100	$0,0162 \pm 0,0011$	$0,163 \pm 0,046$	0,9897
1/katodický	1-5	$0,0428 \pm 0,0075$	$0,064 \pm 0,025$	0,9849
1/anodický	1-100	$0,0200 \pm 0,0012$	$0,177 \pm 0,053$	0,9907
1/anodický	1-5	$0,0666 \pm 0,0071$	$0,013 \pm 0,023$	0,9944
2/katodický	25-100	$0,0293 \pm 0,0010$	$-0,327 \pm 0,065$	0,9995
2/anodický	25-100	$0,0371 \pm 0,0050$	$-0,097 \pm 0,329$	0,9911
3/katodický	25-100	$0,0335 \pm 0,0058$	$0,035 \pm 0,383$	0,9854
3/anodický	25-100	$0,0408 \pm 0,0054$	$0,125 \pm 0,357$	0,9914



Obr. 12: Kalibrační křivky závislosti proudů píků fentanylu naadsorbovaného na SPCE z kalibračních roztoků o koncentracích (1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); měřeno optimalizovanou metodou transferové adsorpční CSWV; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Průběhy transferových adsorpčních CSWV křivek získaných při měření kalibračních roztoků ukazuje Obr. 13. Pro lepší názornost jsou voltamogramy v obrázku vzájemně posunuty, aby nedocházelo k překryvu proudových odezev analytu.

Je zřejmé, že pro všechny koncentrace fentanylu, s výjimkou nejnižší koncentrace ($1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), jsou píky poskytované opioidem viditelné a vyhodnotitelné. V případě roztoku o $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se měření použitou metodou dostalo k *LOD*, které je rovno $1,72 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (v katod. skenu) a $1,05 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (v anod. skenu). V Příloze 1 jsou voltamogramy pro zmíněnou koncentraci přiblíženy. Píky jsou stále pozorovatelné, ale jsou značně zkreslené vysokým kapacitním proudem.

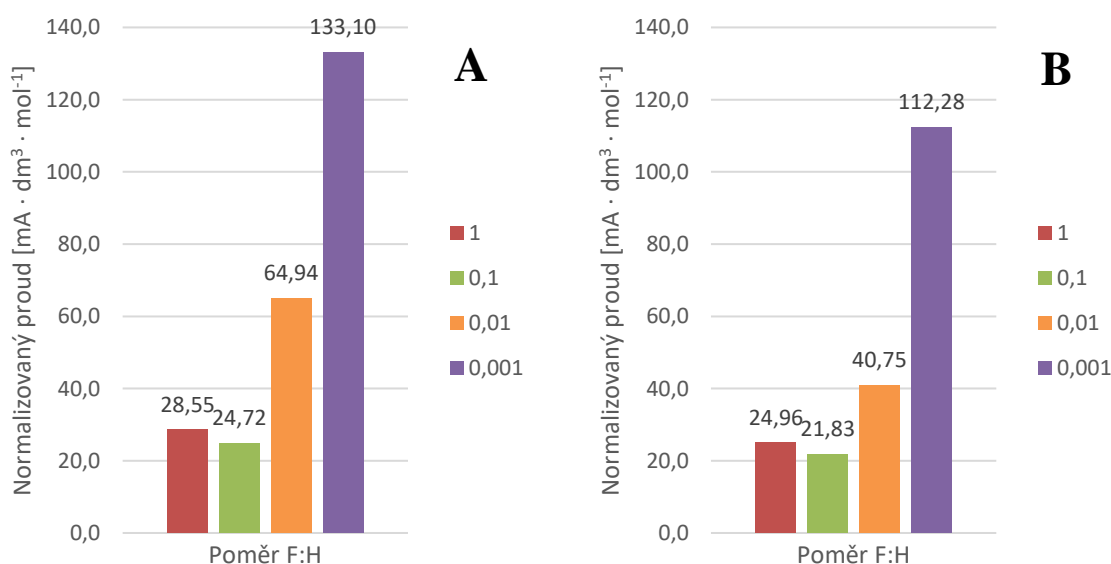


Obr. 13: Transferové adsorpční CSW voltamogramy fentanylu adsorbovaného z kalibračních roztoků (Tab. III); A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

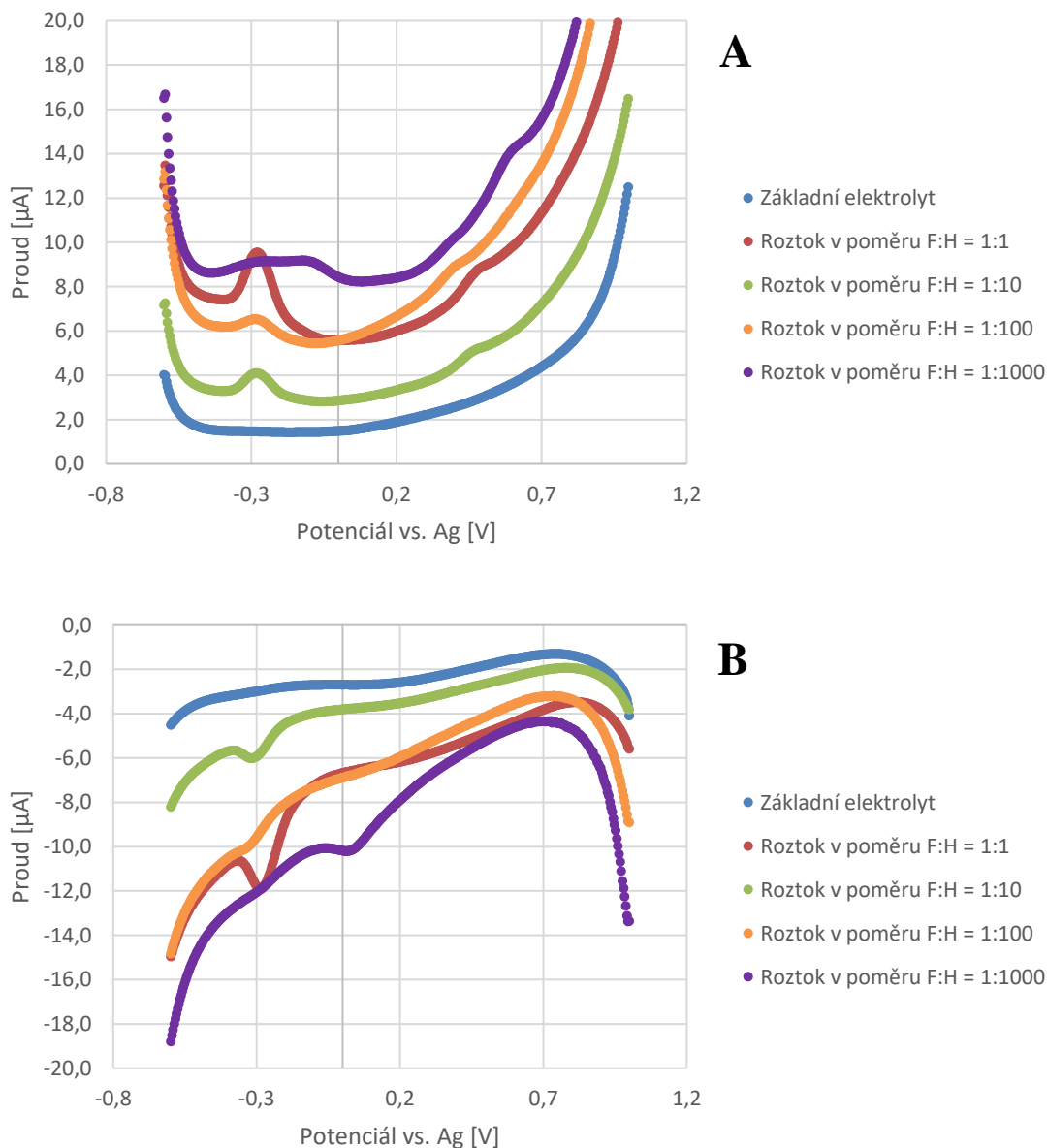
4.2.4 Detekce fentanylu v heroinu

Směsné roztoky fentanylu s heroinem byly připraveny podle postupu v kapitole 3.2.1. Stejně jako při měření kalibračních závislostí (kapitola 4.2.3), byla pro každou analýzu použita vždy nová elektroda. Po nastavení experimentálně zjištěných optimálních podmínek byly vzorky změřeny metodou transferové adsorpční CSWV.

Obr. 14 vyjadřuje vztah mezi normalizovaným proudem v závislosti na poměru koncentrace fentanylu ku heroinu v externím roztoku vzorku, z něhož byl analyt adsorbován na SPCE. Normalizovaný proud byl vypočítán jako proud analytického signálu fentanylu (v A) dělený skutečnou koncentrací fentanylu (v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v roztoku směsného vzorku (násobeno tisícem). Důvodem pro normalizaci proudu byl fakt, že výsledné koncentrace fentanylu ve vzorcích s heroinem se měnily tak, aby bylo dosaženo požadovaného poměru fentanylu k heroinu (Tab. IV) a zároveň aby byl udržen nízký obsah methanolu ve vzorku (methanol byl použit k přípravě zásobních roztoků opioidů). Směsi o poměrech fentanylu ku heroinu 1:1, 1:10 a 1:100 poskytly relativně srovnatelné normalizované hodnoty proudu analytu, avšak normalizovaný proud pro roztok s poměrem F:H 1:1000 byl již zatížen poměrně velkou chybou. Příčinou je nízká koncentrace fentanylu ve směsi ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), která se vyskytuje mírně pod *LOD* (viz. výše).



Obr. 14: Vypočtené normalizované proudy fentanylu adsorbovaného ze směsných roztoků v závislosti na poměru fentanylu ku heroinu (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000); A – anodický sken, B – katodický sken; měřeno metodou transferové adsorpční CSWV; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV



Obr. 15: Transferové adsorpční CSW voltamogramy ZE (BRP pH 8,5), fentanylu naadsorbovaného ze směsných roztoků fentanylu s heroinem v poměrech 1:1, 1:10, 1:100 a 1:1000; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV

Obr. 15 ukazuje transferové adsorpční CSW voltamogramy zaznamenané pro směsné vzorky heroinu a fentanylu. Různý obsah methanolu ve směsích způsobil rozdílné velikosti kapacitního proudu u jednotlivých roztoků. Stejně jako v předešlé kapitole jsou proudové odezvy fentanylu dobře viditelné až na nejméně koncentrovaný roztok. Voltamogramy směsi v koncentračním poměru fentanylu ku heroinu 1:1000 jsou přiblíženy v Příloze 2, kde je stále pozorovatelný fentanylový pík/protipík. Tato informace potvrdila fakt, že je touto metodou možné pozorovat fentanylný pík i v tisícinásobném zředění. Vzhledem k podobným molárním hmotnostem fentanylu (336,471 g/mol) a heroinu (369,416 g/mol)

odpovídá uvedený poměr látkových koncentrací 1:1000 přibližně obsahu fentanylu v heroinu 0,1 %. Ten se shoduje s minimálním používaným obsahem fentanylu při pančování heroinu. [35]

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na voltametričnou analýzu heroinu a fentanylu. První analýzy byly provedeny za použití elektrochemického článku s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku. Tyto experimenty potvrdily možnost elektrochemické detekce fentanylu ve směsném roztoku s heroinem.

Během experimentů při měření s SPCE byly testovány různé pracovní podmínky, které byly následně vyhodnoceny a optimalizovány. Jako nejvhodnější pro adsorpci fentanylu na SPCE byla pozorována doba třicet sekund. Nejvyšší proudovou odezvu poskytovaly vzorky, které prošly pětisekundovou preelektrolýzou při potenciálu 1,2 V. Dále bylo zjištěno, že při obsahu methanolu ve vzorku vyšším než 20 % (v/v) byly výsledky ovlivněny extrémně vysokým kapacitním proudem pozadí a proudové signály fentanylu tudíž nebyly vyhodnotitelné. Experimentálně se zjistilo, že SPCE lze opakovaně použít se stejným výsledkem pouze dvakrát. Při dalším opakovaném používání docházelo k nárůstu kapacitního proudu, který komplikoval vyhodnocení proudového signálu fentanylu.

Po nastavení optimálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost fentanylových roztoků o koncentracích v rozmezí od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byly zkonstruovány grafy, vypočteny parametry regresivní přímky a hodnoty *LOD* a *LOQ*, které byly $1,73 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $5,76 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro katodický sken, $1,05 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $3,50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro sken anodický.

V poslední řadě byly analyzovány směsné vzorky fentanylu a heroinu. Roztoky s poměry koncentrací fentanylu ku heroinu 1:1, 1:10 a 1:100 poskytly dobře viditelný charakteristický pík/protipík fentanylu. V nejméně koncentrované směsi s poměrem 1:1000 byl signál stále vyhodnotitelný, ale vysoký kapacitní proud způsobil zkreslení signálu, který se zdál být nadhodnocen. Pro takto malý obsah fentanylu ve směsném roztoku je vyvinutá metoda použitelná pro kvalitativní důkaz přítomnosti fentanylu, nikoli však pro kvantitativní stanovení.

Byla vyvinuta metoda, která by mohla být využita pro screeningovou analýzu pouličních drog k odhalení, zda je heroin pančovaný fentanylem. V porovnání s ostatními metodami je její obrovskou výhodou, že je možné ji provádět v terénních podmínkách, s minimálním vybavením, rychle a levně.

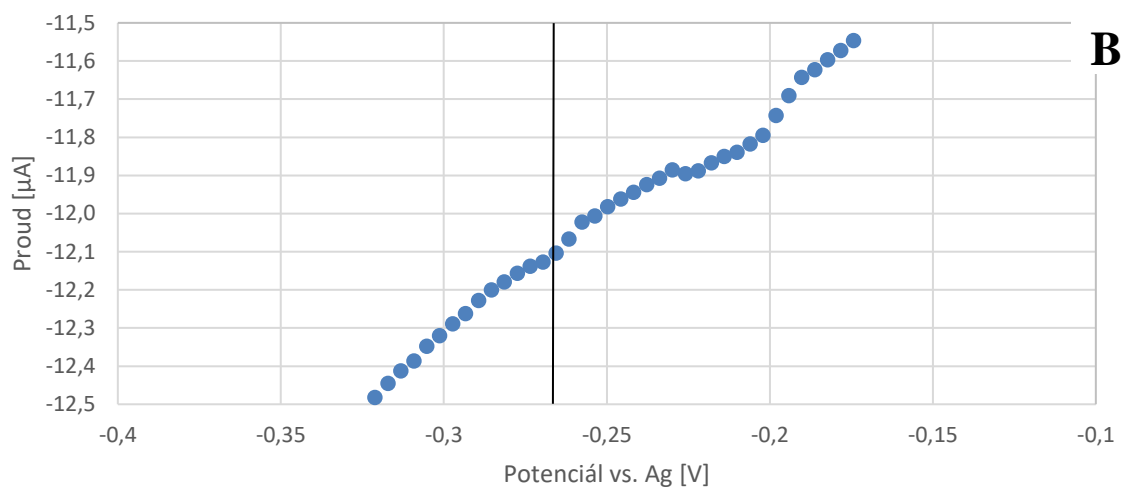
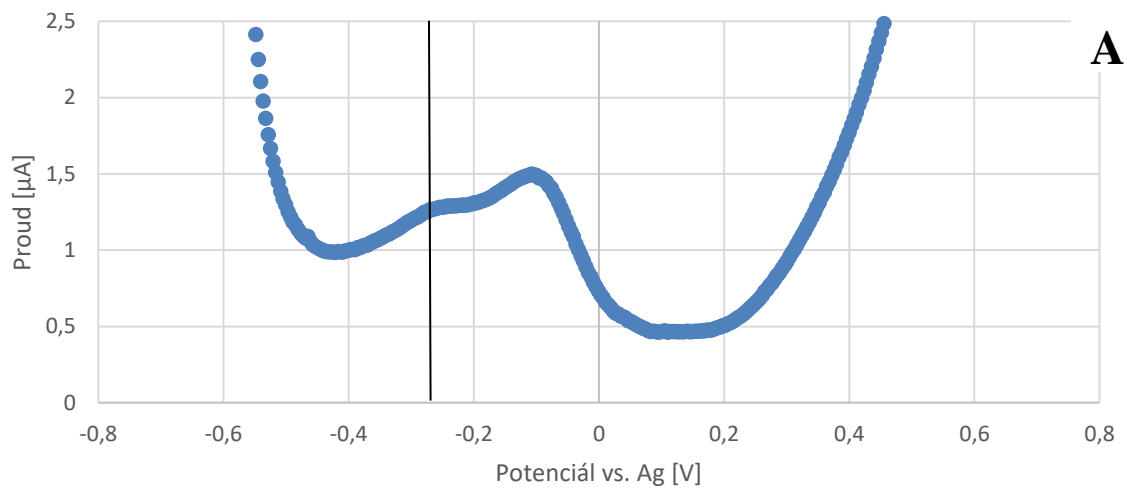
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] K. Kuczyńska, P. Grzonkowski, Ł. Kacprzak, J. B. Zawilska, Abuse of fentanyl: An emerging problem to face, *Forensic Sci. Int.*, 289 (2018) 207-214.
- [2] N. P. Wiecker, J. Owczarzak, G. Urquhart, J. Park, S. Rouhani, R. Ling, M. Morris, S. Sherman, Agency in the fentanyl era: Exploring the utility of fentanyl test strips in an opaque drug market, *Int. J. Drug Policy*, 84 (2020) art. 102900.
- [3] P. Armenian, K. T. Vo, J. Barr-Walker, K. L. Lynch, Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review, *Neuropharmacology*, 134 (2018) 121-132.
- [4] J. Suzuki, S. EL-Haddad, A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls, *Drug Alcohol Depend.*, 171 (2017) 107-116.
- [5] E. N. Shoff, M. E. Zaney, J. H. Kahl, G. W. Hime, D. M. Boland, Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn, *J. Anal. Toxicol.*, 41 (2017) 484-492.
- [6] R. Hill, R. Santhakumar, W. Dewey, E. Kelly, G. Henderson, Fentanyl depression of respiration: Comparison with heroin and morphine, *Br. J. Pharmacol.*, 177 (2020) 254-266.
- [7] X. Shen, F. Ju, G. Li, L. Ma, Smartphone-Based Electrochemical Potentiostat Detection System Using PEDOT: PSS/Chitosan/Graphene Modified Screen-Printed Electrodes for Dopamine Detection, *Sensors*, 20 (2020) 2781.
- [8] T. H. Stanley, The history and development of the fentanyl series, *J. Pain Symptom Manag.*, 7 (1992) S3-S7.
- [9] R. Jelínková, Problematika zneužívání opiátů fentanylového typu a možnosti jejich stanovení instrumentální analýzou, *Drugs and Forensics Bulletin*, 25 (2019) 3-10.
- [10] Zákony pro lidi, <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2013-463>, staženo: 29. 6. 2022
- [11] P. Ševčík, M. Hakl, Transdermální fentanyly na českém trhu, *Remedia*, č. 4 (2007).
- [12] J. Albrecht, Studium elektrochemických přeměn nových syntetických drog, Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2019.
- [13] Nonstop-lékárna.cz, <https://nonstop-lekarna.cz/leky-podle-ucinne-latky/fentanyl-fentanylum-104>, staženo: 29. 6. 2022
- [14] M. Choińska, I. Šestáková, V. Hrdlička, J. Skopalová, J. Langmaier, V. Maier, T. Navrátil, Electroanalysis of Fentanyl and Its New Analogs: A Review, *Biosensors* 12 (2022) 26.
- [15] PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3345>, staženo: 29. 6. 2022

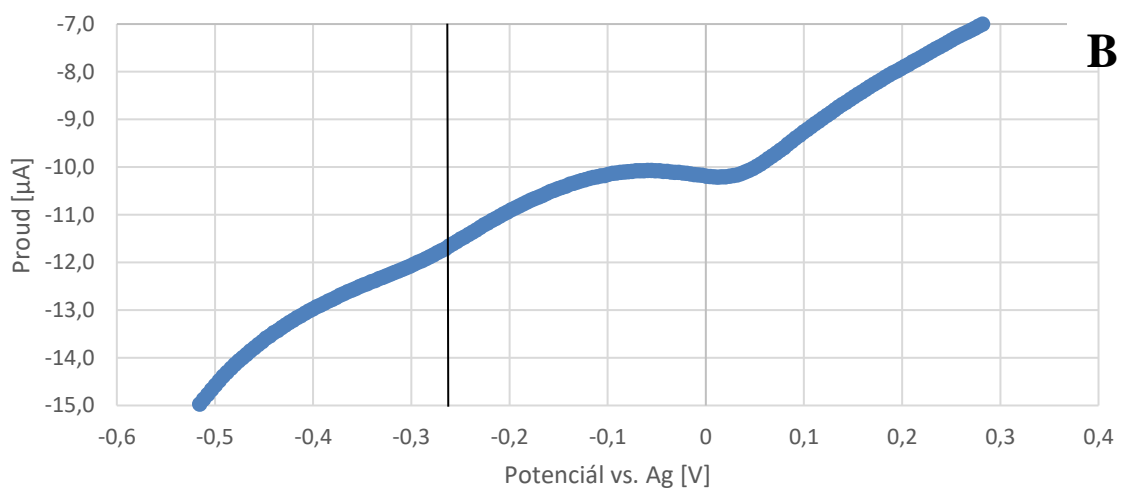
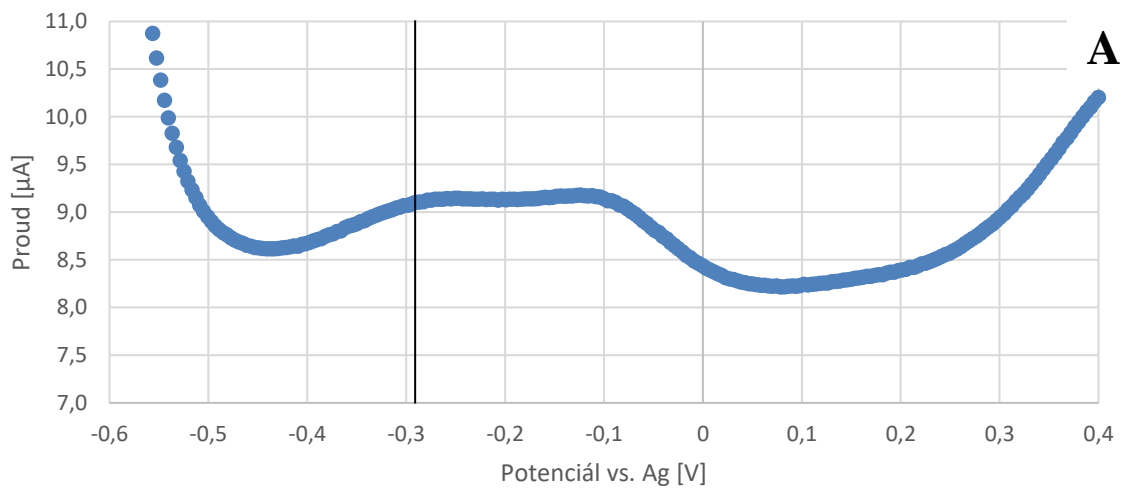
- [16] S. Derry, R. Knaggs, P. J. Wiffen, C. Stannard, D. Aldington, P. Cole, R. A. Moore, Fentanyl for neuropathic pain in adults (Protocol), Cochrane Database of Systematic Reviews, Wiley, 2015.
- [17] D. E. Feierman, J. M. Lasker, Metabolism of fentanyl, a synthetic opioid analgesic, by human liver microsomes, Role of CYP3A4, *Drug Metab. Dispos.*, 24 (1996) 932-939.
- [18] R. B. Labroo, M. F. Paine, K. E. Thummel, E. D. Kharasch, Fentanyl metabolism by human hepatic and intestinal cytochrome P450 3A4: Implications for interindividual variability in disposition, efficacy, and drug interactions, *Drug Metab. Dispos.*, 25 (1997) 1072-1080.
- [19] R. M. Krausz, M. Nikoo, K. Jang, F. Choi, The North American Overdose Crisis and the European-American “Fentanyl and Treatment Gap”, *Eur. Addict. Res.*, 27 (2021) 304-310.
- [20] H. M. Elbardisy, C. W. Foster, L. Cumba, L. H. Antonides, N. Gilbert, C. J. Schofield, T. S. Belal, W. Talaat, O. B. Sutcliffe, H. G. Daabees, C. E. Banks, Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection, *Anal. Methods*, 11 (2019) 1053-1063.
- [21] E. Naghian, E. Marzi Khosrowshahi, E. Sohoul, F. Ahmadi, M. Rahimi-Nasrabadi, V. Safarifard, A new electrochemical sensor for the detection of fentanyl lethal drug by a screen-printed carbon electrode modified with the open-ended channels of Zn(ii)-MOF, *New J. Chem.*, 44 (2020) 9271-9277.
- [22] A. Ivsins, J. Boyd, L. Beletsky, R. McNeil, Tackling the overdose crisis: The role of safe supply, *Int. J. Drug Policy*, 80 (2020) art. 102769.
- [23] M. L. Merves, B. A. Goldberger, Heroin, v knize: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (ed.), *Encyclopedia of Analytical Science*, second ed., Elsevier, Amsterdam 2005, str. 260-266.
- [24] J. Minařík, 3/2 Opioidy a opiáty, K. Kalina a kol., *Drogy a drogové závislosti: mezioborový přístup 1*, 1. vyd., Úřad vlády České republiky, Praha 2003, str. 159-163.
- [25] Národní zdravotnický informační portál, <https://www.nzip.cz/clanek/247-heroin>, staženo: 29. 6. 2022
- [26] PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5462328>, staženo: 29. 6. 2022
- [27] N. Mikulová, Využití elektroanalytických technik pro studium elektrochemického chování a stanovení vybraných opioidů, Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2022.

- [28] H. H. Maurer, C. Sauer, D. S. Theobald, Toxicokinetics of Drugs of Abuse: Current Knowledge of the Isoenzymes Involved in the Human Metabolism of Tetrahydrocannabinol, Cocaine, Heroin, Morphine, and Codeine, *Ther. Drug Monit.*, 28 (2006) 447-453.
- [29] R. J. Dinis-Oliveira, Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel, *J. Forensic Leg. Med.*, 61 (2019) 128-140.
- [30] A. Florea, J. Schram, M. de Jong, J. Eliaerts, F. Van Durme, B. Kaur, N. Samyn, K. De Wael, Electrochemical Strategies for Adulterated Heroin Samples, *Anal. Chem.*, 91 (2019) 7920-7928.
- [31] D. W. Hill, K. J. Langer, HPLC photodiode array UV detection for toxicological drug analysis, *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (1987) 377-409.
- [32] M. Macchia, S. Bertini, C. Mori, C. Orlando, C. Papi, G. Placanica, Efficient application of monolithic silica column to determination of illicit heroin street sample by HPLC, *Il Farmaco*, 59 (2004) 237-239.
- [33] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, 1. vyd., Karolinum, Praha 2005.
- [34] C. E. Ott, H. Cunha-Silva, S. L. Kuberski, J. A. Cox, M. J. Arcos-Martínez, L. E. Arroyo-Mora, Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications, *J. Electroanal. Chem.*, 873 (2020) art. 114425.
- [35] A. Haddad, M. A. Comanescu, O. Green, T. A. Kubic, J. R. Lombardi, Detection and Quantitation of Trace Fentanyl in Heroin by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 90 (2018) 12678-12685.

7 PŘÍLOHY



Příloha 1: Transferové adsorpční CSW voltamogramy fentanylu naadsorbovaného z kalibračního roztoku o $c = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV



Příloha 2: Transferové adsorpční CSW voltamogramy fentanylu naadsorbovaného ze směsného roztoku fentanylu s heroinem v poměru 1:1000; A – anodický sken, B – katodický sken; frekvence 25 Hz, amplituda 50 mV