

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Studium metod pro *in situ* detekci drog a jejich
prekurzorů pro forenzní účely**

Bakalářská práce

Jméno autora: Jan Albrecht
Studijní obor: Chemie
Vedoucí práce: RNDr. Martin Švidrnoch, Ph.D.
Rok: 2016/2017

Olomouc 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil pouze podklady uvedené v příloženém seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci dne

.....
Jan Albrecht

Poděkování

Tímto textem bych chtěl poděkovat především vedoucímu bakalářské práce RNDr. Martinu Švidrnochovi Ph.D., za jeho trpělivost, ochotu, zkušenosti se zpracováním vzorků a čas, která mi během provádění experimentu poskytl.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Rostislavu Halouzkovi, za pomoc při měření UV/VIS spekter a jeho odborných rad.

Nemalé poděkování patří mé rodině za podanou pomocnou ruku, motivaci a inspiraci po celou dobu mého studia.

Bibliografická Identifikace

Jméno a příjmení: Jan Albrecht
Název práce: Studium metod pro *in situ* detekci drog a jejich prekurzorů pro forenzní účely
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra analytické chemie
Vedoucí práce: RNDr. Martin Švidrnoch Ph.D.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá studiem metod identifikace vybraných návykových látek a jejich prekurzorů pro *in situ* detekci. Teoretická část bakalářské práce se věnuje obecnému úvodu a vlastnostem vybraných návykových látek včetně jejich farmakologického chování. Součástí práce je i popsání mechanismu návykových reakcí látek se studovanými činidly. Experimentální část práce je zaměřena zejména na stanovení limitu detekce, studium stability vzniklých produktů reakcí (např. komplexů apod.). Dále byla studována stabilita činidel.

Bibliographical identification

First and surname: Jan Albrecht
Title: Study of *in situ* methods for detection of drugs and their precursors for forensic purposes
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of analytical chemistry
Supervisor: RNDr. Martin Švidrnoch Ph.D.

Abstract

Bachelor thesis deals with the study of methods of selected addictive substances and their precursors for *in situ* detection. The theoretical part of the bachelor's thesis deals with the general introduction of properties of selected addictive substances including their pharmacological part. The mechanism of reaction with reagents is also included. The experimental part of the bachelor's thesis is especially focused on assessment of limit of detection, study of stability final products (complexes) and their UV-VIS spectra. The stability of reagents was also examined.

Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST.....	1
1.1	Návykové látky.....	1
1.2	Farmakologie.....	3
1.2.1	Farmakokinetika.....	3
1.2.2	Farmakodynamika.....	6
1.3	Vybrané návykové látky.....	9
1.3.1	Benzodiazepiny.....	9
1.3.2	Barbituráty.....	12
1.3.3	Efedriny.....	14
1.3.4	Amfetaminy.....	15
1.3.5	Kodein.....	18
1.3.6	Kanabinoidy.....	20
1.3.7	Ketamin.....	22
1.3.8	Zolpidem.....	23
1.3.9	Kokain.....	24
2	Experimentální část.....	26
2.1	Materiály a chemikálie.....	26
2.1.1	Chemikálie.....	26
2.1.2	Materiál a přístroje.....	26
2.2	Příprava Standardů.....	27
2.3	Chen-Kao Test: Detekce efedrinu a pseudoefedrinu.....	28
2.4	Zimmermannův Test: Detekce benzodiazepinů.....	29
2.5	Simonsův test: Detekce amfetaminu a methamfetaminu.....	33
2.6	Test na přítomnost kanabinoidů.....	36
2.7	Liebermannův test.....	38

2.8	Dille – Koppanyi test: Detekce barbiturátů	38
2.9	Zwikkerův test: Detekce barbiturátů.....	40
2.10	Ehrlichův test: Detekce LSD, Kodeinu	42
2.11	Modifikovaný Scottův test: Detekce kokainu a ketaminu	43
3	Výsledky a diskuze.....	46
4	Závěr.....	49
5	Literatura	50
6	Seznam zkratk	52

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Návykové látky

Návykové látky, jsou látky, které se váží na své cílové receptory, a touto vazbou ovlivňují funkce příslušné neurální sítě. Indukované změny produkují negativní nebo pozitivní fenomény v behaviorálních a kognitivních doménách, vnímané subjektem jako vysoce žádoucí, a tak navozují jeho tužbu po další (již patologické) aktivaci těchto receptorů, závislost neboli adikci. V molekulární rovině provází rozvoj závislosti strukturální a funkční změny receptorů, např. jejich zvýšenou expresivitu, zvětšení počtu receptorů nebo změny vazebné afinity dané látky vůči příslušnému receptoru [1, 2].

Návykové látky jsou známy lidstvu od nepaměti. Byly součástí rituálních obřadů (halucinogenní vlastnosti), našly využití pro posílení endurativních aktivit (listy koka amerických indiánů) nebo byly již v této době užívány k rekreačním účelům. V současné době jsou návykové látky využívány hlavně v medicíně, ale jsou stále zneužívány k rekreačním účelům, zejména mezi mládeží. V současnosti patří látky s potenciální návykovou charakteristikou do běžné praxe legální medicíny řady oborů s využitím především v léčbě chronických bolestivých stavů (analgosedace) a farmakoterapii rozšiřujícího se spektra psychiatrických či neurologických onemocnění. Jmenujme alespoň cannabis a jeho deriváty v terapii neurodegenerativních demencí při Huntingtonově chorobě nebo potlačení patologických motorických projevů Parkinsonovy choroby nebo spastických projevů při míšních traumatech nebo mozkomíšní skleróze [3, 4].

Pro své psychotropní účinky je současně řada těchto látek a z nich odvozených derivátů ilegálně zneužívána širokým spektrem populace, a nemalým problémem je z hlediska distributora drogy i vysoká výtěžnost jejich nelegálního šíření. Tyto chemické substance lze třídit z hlediska řady charakteristik, legálnosti či nelegálnosti, adiktivní potence nebo na látky přírodního či syntetického původu. Jedním z kritérií charakterizujících drogu je její potenciální návykovost a z tohoto hlediska lze návykové látky třídit na látky s relativně nízkým stupněm návykovosti, jmenovitě např. alkohol, cannabis, MDMA. Naopak mezi látky potenciálně vysoce návykové, tedy se schopností vyvolat adikci po prvním nebo již jen několika podáních, jsou řazeny např. kokain či heroin. Obecným hlediskem návykovosti je schopnost způsobit změny organismu v rovině somatické a zásahem do metabolických procesů vyvolat fyzickou závislost, nebo indukovat změny v neurofyziologické behaviorálně-

kognitivní rovině a vést k rozvoji psychické závislosti. Je ale zřejmé, že vzhledem k závislosti psychických okruhů na vlastním metabolismu se toto třídění stírá a vzájemně prolíná [5, 6]. Dalším z mnoha skupin rozdělení lze roztřídit podle návykovosti. Mezi slabé návykové látky patří například cannabis, MDMA. Mezi silné návykové látky zařazujeme obvykle látky, které již po krátkém užívání vyvolávají silnou touhu po další dávce. Do této skupiny například heroin, opium, kokain a jiné [7].

Tabulka č. 1: Přehled návykových látek

Droga	Fyzická návykovost	Psychická návykovost	Legální dostupnost
Cannabis	Není	Mírná	Na předpis
Benzodiazepiny	Střední	Střední	Na předpis
Barbituráty	Vysoká	Vysoká	Na předpis
Amfetaminy	Žádná	Vysoká	Ne
Methamfetaminy	Žádná	Vysoká	Ne
Kodein	Žádná	Vysoká	Na předpis
Morfium	Vysoká	Vysoká	Na předpis
Heroin	Vysoká	Vysoká	Ne
Alkohol	Vysoká	Vysoká	Ano
Nikotin	Střední	Vysoká	Ano
LSD	Střední	Střední	Ne

Z uvedených hledisek je zřejmé, že problematika návykových látek zasahuje do řady životních aktivit, mezi jinými medicínských, pracovních nebo forezních, a tak stále naléhavěji vyplývá i potřeba u daného jedince potenciálně užívajícího nebo zneužívajícího takovou látku detekovat. Kvalitativní metody detekce těchto látek jsou v biomedicíně v indikovaných případech medicíny součástí běžných laboratorních panelů, a patří i k možnostem screeningového vyšetření z biologických vzorků jako je krev a moč, avšak narůstá potřeba rychle a jednoduše stanovit přítomnost dané látky kvantitativně. Kvantitativní hodnocení s dostatečnou senzitivitou a specificitou musí být obecně dostupné, dostatečně jednoduché a rychlé, a především pak splňovat i náročná kritéria z hlediska legislativy. Příkladem může být duální koncepce stanovení koncentrace ethanolu v dechu a krevním odběru.

Cílem práce je vyhodnocení jednoduchých testů s rychle dostupnými výsledky kvalitativní analýzy vybraných látek řazených mezi potenciálně návykové především z hlediska jejich aplikovatelnosti ve srovnání s klasickými standardizovanými metodami, kdy výsledky jsou dostupné až s výraznou časovou prodlevou.

1.2 Farmakologie

Farmakologie se jako vědní obor zabývá distribucí, metabolismem a účinkem exogenních látek na lidský organismus. Obecně se rozděluje na farmakokinetiku a farmakodynamiku, které jsou diskutovány v následujících kapitolách.

1.2.1 Farmakokinetika

Farmakokinetika zkoumá a popisuje jednotlivé látky z hlediska dynamiky dějů probíhajících od jejího podání až po jeho exkreci z organismu. Charakteristika absorpce substance je závislá především na fyzikálně – chemických vlastnostech a na místě jejího průniku do organismu. Kontaktem s cílovou strukturou, nejčastěji receptorem, je následně vyvolán farmakologický (fyziologický) účinek. Následně pak dochází k eliminaci podané látky [8].

Distribuce dané substance v organismu závisí na jejím tvaru, velikosti a rozdělovacím koeficientu mezi polární a nepolární fázi, který udává poměr, jak se daná látka rozdělí mezi lipidovou dvojvrstvou biomembrány a vodnou fázi fyziologického prostředí organismu [9]. Jedná se o 6 – 10 nm velkou buňku ohraničující semipermeabilní strukturu tvořenou dvouvrstvou polárních lipidů (tzv. lipidovou dvouvrstvou), do které jsou zasazeny membránové bílkoviny vytvářející specifické struktury, zajišťující více či méně selektivní průchod pouze některých látek. Lipidy jsou amfifilního charakteru, jeden z konců obsahuje hydrofilní a druhý hydrofobní část; hydrofilní konce směřují vně buňky a zajišťují interakci s vodou a v ní rozpuštěných látek [8].

Jednotlivé psychotropní látky prostupují skrze biologické membrány po směru nebo proti směru svého koncentračního gradientu. Mezi základní postupy patří pasivní difuze a aktivní transport. Pasivní difúze je děj probíhající ve směru koncentračního gradientu. Principem je prostup molekul díky koncentračnímu rozdílu volné neionizované formy psychoaktivní látky na obou stranách membrány. Dále jsou některé sloučeniny přenášeny i specifickými transportéry. Tato difúze probíhá bez dodání energie. Následně může docházet k volné difúzi, kde postupují pouze lipofilní látky, jejichž molární hmotnost je menší než 150 Da. Mohou postupovat i větší látky, ale musí být dostatečně lipofilní, nebo mohou takto difundovat látky jako například kyslík, oxid uhličitý, voda, kyseliny a zásady, ale prostup těchto látek je ale omezen z důvodu jejich možného disociačního stupně. Obecně se kyseliny

vstřebávají v žaludku, zatímco bazické látky se absorbují ve střevech. Dalším možným způsobem pasivní difuze může být tzv. usnadněná difuze, která umožňuje transport látek, které mají nízký rozdělovací koeficient. Je zprostředkována tzv. přenašeči, které se uplatňují zejména u látek dobře rozpustných ve vodě, kde dochází k vzniku komplexu přenašeč-psychoaktivní látka, který pak snadno proniká membránou a poté se uvnitř buňky rozpadá. Vzniklý komplex je ale závislý na afinitě psychoaktivní látky k přenašeči [8, 9].

Aktivní transport je zprostředkován obdobně jako usnadněná difuze, avšak probíhá proti koncentračnímu gradientu. Děj je energeticky závislý nejčastěji štěpením ATP. Substance je přenášena přes semipermeabilní membránu proti gradientu elektrochemického potenciálu. Aktivní transport je zprostředkován integrálními membránovými proteiny [9].

Absorpce léčiva je určena průnikem látek z místa podání do krve, a její rychlost závisí na způsobu podání. Perorální podání psychoaktivních látek je jedním z nejčastějších možných způsobů. Díky vysokému prokrvení ústní dutiny (především pod jazykem) dochází k rychlé absorpci substance. Udává se, že po tomto podání je látka detekovatelná v krvi přibližně po 20 minutách (vždy však závisí na konkrétních vlastnostech dané látky). Perorální absorpce je závislá na hodnotách pH v ústní dutině, rozpustnosti látky a řadě dalších faktorů. V žaludku se absorbují zejména látky kyselého povahy a jeho stěnou prostupují prostou difuzí. Obecně je známa závislost transportu chemických substancí do střeva a následná exkrece v návaznosti na příjem potravy a jejího složení. Absorpce látky po perorálním podání se ale řadí mezi cesty s pomalým nástupem účinku [8, 9]. Mezi další podání řadíme například rektální podání, výhodné v tom, že se omezuje efekt průchodu játry a možnost podání větší dávky než v případě perorálního podání. Avšak nevýhodou je možné zneužití této cesty. Například při per rektálním podání alkoholu, může i malé množství může způsobit otravu alkoholem. Absorpce per rektum je mnohem rychlejší než v případě perorálního podání a udává se, že účinek psychoaktivních látek nastupuje do 15 minut. Podání substance přímo do krevního oběhu je pak nejrychlejší z hlediska nástupu účinku dané látky. O něco pomalejší je pak vstřebávání přes nosní sliznicí [10].

Eliminace podané látky zajišťuje ukončení jejího orgánového působení. Odehrává se nejčastěji metabolickým rozkladem na již dále neaktivní meziproducty s vlastními cestami exkrece.

Polčas eliminace je čas nezbytný ke snížení původní plazmatické koncentrace psychoaktivní látky na polovinu své počáteční hodnoty. Udává se nejčastěji v hodinách, avšak

mohou být použity i minuty nebo sekundy. Obecně se dá vypočítat z rovnice (1), kde k_e je eliminační konstanta charakteristická pro danou látku a nejčastěji mívá jednotku h^{-1} [8].

$$k_{1/2} = \frac{0,693}{k_e} \quad (1)$$

Biotransformace je proces, kdy se lidský organismus snaží vyloučit nepolární látky z těla. Různými reakcemi se snaží zvýšit její polaritu, jelikož je většina odpadních látek vyloučena z těla právě do moči. V drtivé většině se uplatňují při těchto reakcích enzymatické systémy. Tyto procesy jsou často ovlivněny věkem, pohlavím, rasou a v neposlední řadě také patologickým stavem daného jedince [5, 9].

Ve většině případů podání tělu exogenních látek dochází k tzv. first pass efektu. Jedná se o proces, kdy je látka ještě před vstupem do oběhového systému částečně metabolizována, a to převážně v játrech, střevech a plicích. U řady látek takto dochází k jejich biodegradaci, avšak mohou se objevit případy, kdy se naopak při tomto ději bioaktivita zvýší a původně neaktivní látky se transformují na látky s výrazným farmakologickým účinkem. Takové látky jsou nazývány proléčiva. Mezi něž patří například dopamin, morfin apod. [10].

V biotransformaci I. fázi jsou látky především oxidovány, redukovány nebo hydrolyzovány. Při tomto procesu dochází ke zvýšení polaritě látek a to tak, že se na psychoaktivní substance naváží polární funkční skupiny, jako jsou například hydroxy-, amino- nebo karbonylové či karboxylové případně merkpto skupiny. Ve většině případů jsou katalyzovány jaterním enzymem CYP450 a jeho isoformami. Jestliže xenobiotika, substance, jež tělu nejsou známy a jsou ve většině případu uměle připraveny, obsahují, již některou z těchto funkčních skupin nemusí podléhat první fázi metabolismu vůbec nebo pouze v omezené míře. Obecně při biotransformaci I. fáze dochází k změně účinku a toxicity metabolizované látky [9, 11].

Další částí metabolismu je biotransformace II. neboli konjugační fáze. Jedná se o proces, kdy dochází k interakci chemické substance z biotransformace I. fáze s konjugačním činidlem. Konjugační činidlo je látka, která je součástí biodegradačního systému a není tedy pro lidské tělo cizí. Lze mezi ně zařadit látky jako glycin, glutamin, glutathion, kyselinu glukuronovou aj. V důsledku konjugace dochází k opětovnému zvýšení polaritě látky. Vzniklý produkt biotransformace II. fáze se nazývá konjugát, který zpravidla bývá neschopný reabsorbce a proto je vyloučen z organismu. Obecně dochází ke změně

rozpustnosti látky. Glukuronidace je reakce kyseliny glukuronové a je katalyzována enzymy ze skupiny UDP-glukuronosyltransferaz. Dochází k vzniku esterové nebo etherové vazby mezi kyselinou glukuronovou a chemickou substancí z biotransformace I. fáze. Dalším možným způsobem biotransformace II. fáze je tzv. sulfatace. Jedná se o významné reakce v lidském organismu podílející se na konjugační biotransformaci, která je katalyzována sulfotransferázami. Podmínkou pro vstup sulfátu do konjugační reakce je aktivace a následná přeměna na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS). Těto konjugace se zúčastňují zejména xenobiotika, obsahující ve své molekule aminoskupinu, dále pak primární a sekundární alkoholy. Udává se, že sulfatace je charakteristická pro metabolismus malých, v tucích málo rozpustných chemických substancí [9, 10, 12].

Exkrece léčiv je proces vylučování metabolizované substance z organismu. O exkreci léčiva rozhodují zejména jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Exkrece může probíhat majoritně přes ledviny, dále pak játra a plicemi. Při exkreci játry dochází k vylučování látek, které byly konjugačními reakcemi konjugovány s kyselinou glukuronovou. Tento způsob exkrece je nejčastěji zprostředkován aktivním transportem, avšak v minoritních případech může být zprostředkován i prostou difúzí. Eliminace játry je ovlivněna zejména množstvím a funkcí hepatocytů či průtokem krev játry [9, 11].

1.2.2 Farmakodynamika

Farmakodynamika zkoumá a popisuje účinky psychoaktivních substancí a jejich mechanismů v závislosti na dávce a cestě příjmu do organismu. Mechanismus účinku může být nespecifický a specifický. Nespecifický účinek vyplývá především z jeho fyzikálně-chemických vlastností (pH, osmóza, adsorpce, povrchového napětí, ovlivňování acidobazických rovnováh). Specifický účinek substance je dán vazbou na strukturální komponenty cílových struktur (např. buněčných membrán) a je podmíněn odpovídající molekulární strukturou (konformací) dané látky („klíče“) vstupující do interakce s receptorovou strukturou („zámkem“). Tímto mechanismem dochází k aktivaci receptoru a následně změně toku iontů nebo chemických sloučenin kanalikulární strukturou, aktivaci enzymů nebo je umožněna vazba podané sloučeniny na specifický transportní systém-přenašeč [10].

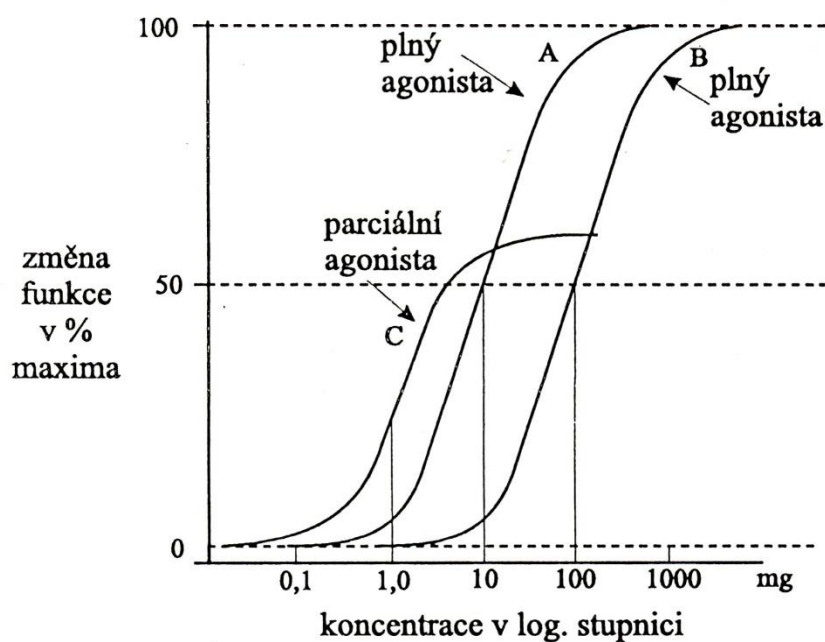
Receptory jsou komplexy endogenních molekul, které mají schopnost rozpoznat a poutat specifickou molekulu do aktivního vazebného místa na svém extracelulárním oddíle

za vzniku komplexu molekula-receptor se schopností indukce specifických sekundárních intracelulárních dějů. Základní roli sehrává afinita molekuly, tj. schopnost vazby se specifickým typem receptoru. Receptory jsou obvykle spjaty s iontovými kanálky nebo mohou působit aktivací „druhých posílů“ (second messenger). Aktivace iontových kanálků je spjata s řadou základních biologických funkcí, např. převodem vzruchů nervových vláken nebo indukci aktivit intracelulárních metabolických kaskád, v důsledku čehož dochází k přenosům vzruchů a nastává účinek. Podle intracelulárně navozovaných dějů jsou receptory tříděny na (I.) spřažené s iontovými kanálky; (II.) spřažené s G-proteiny; (III.) spřažené s protein kinázami; a (IV.) receptory indukující transkripci genů [8, 11].

Iontové kanálky, jsou specifické struktury buněčných membrán, složené obvykle z několika molekulárních podjednotek, utvářející místo průchodu daných aniontů nebo kationtů. Jejich extracelulární oddíl (receptor) zprostředkovává selektivní vazbu specifické látky k danému receptoru; intramembranózní oddíl zajišťuje transport daného iontu intra- nebo a nitrobuněčný oddíl souvisí s funkčním stavem příslušného kanálku (otevřený, uzavřený nebo neaktivní) [11].

Xenobiotikum má dále vlastnost tzv. vnitřní aktivity což je schopnost látek vyvolat účinek, v důsledku jeho vazby na receptor. Dle vnitřní aktivity rozdělujeme látky na agonisty a antagonisty. Agonista je látka, která se váže na receptor a vazba rezultuje, díky vysoké afinitě. Agonisty dělíme dle jejich vnitřní účinnosti následovně:

- (1) Plný agonista, je látka, jejichž vlastností umožňují vyvolat maximálním dosažitelný efekt, a jeho vnitřní aktivita je rovna 1, resp. 100 %.
- (2) Parciální agonista je látka, který vyvolává méně výrazný efekt oproti plnému agonistovi (vnitřní aktivita je menší než 1, resp. 100 %) [11].



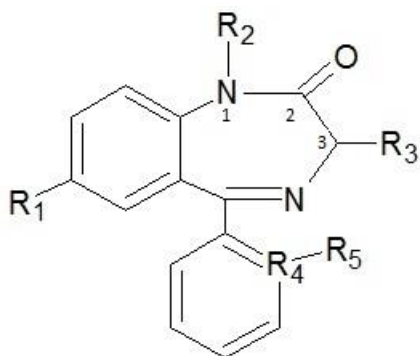
Obrázek 1- Grafické vyjádření antagonistického působení látek A – jedná se o plného agonistu, jehož vnitřní aktivita je 100 %; B – jedná se o plného agonistu, s vnitřní aktivitou 100 %, avšak výrazně nižší afinitou k receptorům. V důsledku toho je třeba větší dávka; C – parciální agonista, jehož maximální účinek je pouze nad 50 % [11]

Antagonista je substance, která se váže na receptorové místo kanálku nebo enzymu a blokuje řetězově navázané otevření nebo uzavření kanálu nebo aktivitu enzymu. Takto jsou dané funkce jednotlivých struktur potlačeny, a navíc zabraňuje i účinkům agonisty. Antagonisté se dělí na kompetitivní, kdy látka reaguje se stejným receptorem jako agonista, má vysokou afinitu, avšak nevykazují vnitřní aktivitu, váže se reverzibilně v závislosti na koncentraci antagonistů a je možné je vytěsnit z vazby, Nekompetitivní antagonisté se jako substance navazují na receptor ireverzibilně a ani zvýšení koncentrace agonisty je nedokáže vytěsnit [11].

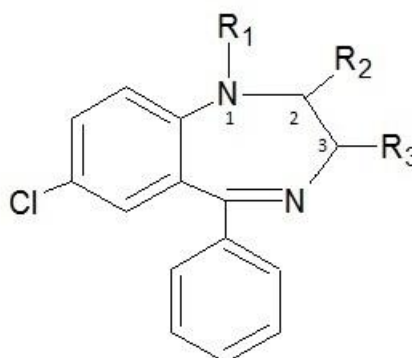
1.3 Vybrané návykové látky

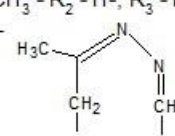
V následující kapitole jsou stručně uvedeny charakteristické vlastnosti skupin testovaných látek.

1.3.1 Benzodiazepiny



Bromazepam - R₁ - Br-, R₂ - H-, R₃ - HO-, R₄ - -N=
Klonazepam - R₁ - O₂N-, R₂ - H-, R₃ - H-, R₄ - -C=, R₅ - Cl-
Diazepam - R₁ - Cl-, R₂ - CH₃-, R₃ - H-, R₄ - -C=, R₅ - H-

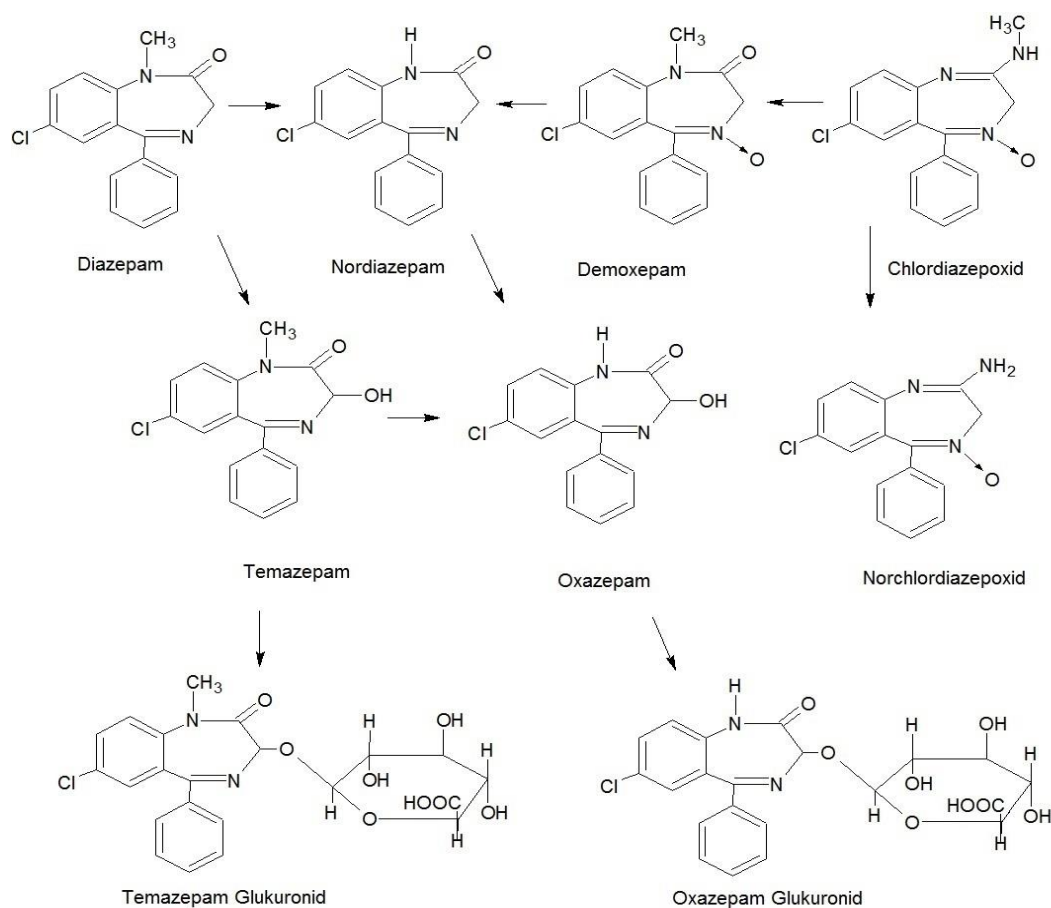


Oxazepam - R₁ - H-, R₂ - O=, R₃ - HO
Medazepam - R₁ - CH₃- R₂ - H-, R₃ - H-
Alprazolam - R₁, R₂ -  R₃ - H -

Obrázek 2-Chemická struktura vybraných derivátů benzodiazepinů

Benzodiazepiny jsou látky, které od 60. let 20. století postupně nahradily barbituráty díky svým vlastnostem, a to především menším rizikem intoxikace a vzniku závislosti. Toto široké spektrum látek se od sebe liší jednak délkou účinku a poločasem eliminace a různou afinitou ke GABA receptorům. Například klonazepam operuje pouze na centrálním GABA_A receptoru, zatímco diazepam se váže s receptory GABA_A i GABA_B. Pro svou vysokou absorpční schopnost se podávají obvykle perorálně, k dosažení rychlejšího efektu je ale možno je podávat i parenterálně popřípadě per rektum (např. diazepam). Udává se, že u dospělých jedinců se nejvyšší koncentrace diazepamu dosáhne po perorálním podání během jedné hodiny, u mladších subjektů do 30 minut. Tato absorpční vlastnost se vysvětluje zejména vysokou lipofilitou diazepamu. Naproti tomu u méně lipofilních benzodiazepinů je rychlost absorpce výrazně nižší [5].

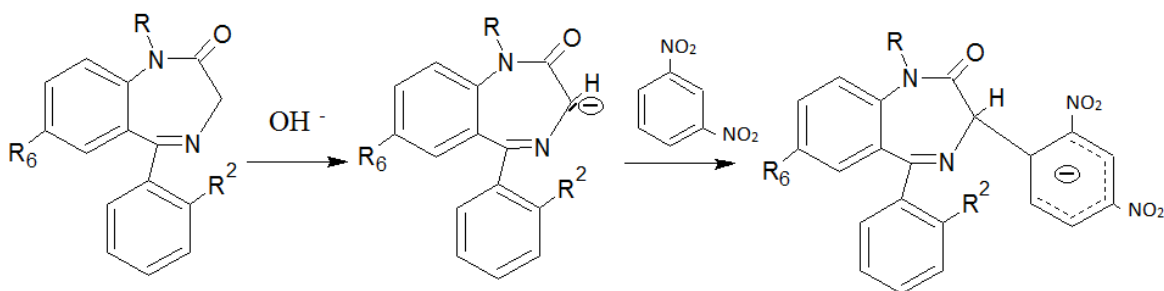
Distribuce benzodiazepinů závisí především na jejich polaritě. Platí pravidlo, že méně polární látky jsou rychleji distribuovány než látky více polární. Metabolismus benzodiazepinů je se odehrává primárně v biotransformaci I. fáze pomocí hydroxylace, kdy se na uhlík C₃ (na Obr. č. 2 vyznačen u přehledu vybraných derivátů benzodiazepinů) navažuje hydroxy skupina, která následně slouží v biotransformaci jako spojnice mezi kyselinou glukuronidovou. Kromě toho jsou benzodiazepiny po I. metabolické fázi často rovněž biologicky aktivní a výsledný glukurovaný konjugát může být zcela odlišný od původního podaného léčiva (viz schéma metabolismu diazepam a chlordiazepoxidu na Obr. č. 1). V případě diazepam jsou biologicky aktivní všechny metabolity vzniklé v I. fázi biotransformace, přičemž konečným produktem endogenního metabolismu je např. glukuronid oxazepamu [4, 5].



Obrázek 3-Jedna z možných cest metabolismu diazepam a chlordiazepoxidu

Benzodiazepiny jsou obecně látky léčebně využívány pro své účinky sedativní, myorelaxační (snížení napětí příčně pruhovaných svalů), antikonvulzivní, k potlačení úzkosti (tzv. anxiolytika), nejistoty, dezorientace, jako hypnotika indukují navození spánku, avšak celkový spánkový rytmus nezpůsobuje spánek fyziologický se střídáním jeho REM a NREM fází. K dlouhodobé léčbě insomnie však nejsou pro riziko vzniku tolerance a závislosti vhodná. Naopak mají minimální adverzivní efekt na kardiovaskulární systém, mírně zvyšují srdeční tep, ale snižují srdeční výdej a mohou tak doplňovat léčbu některých forem srdečního selhání [3].

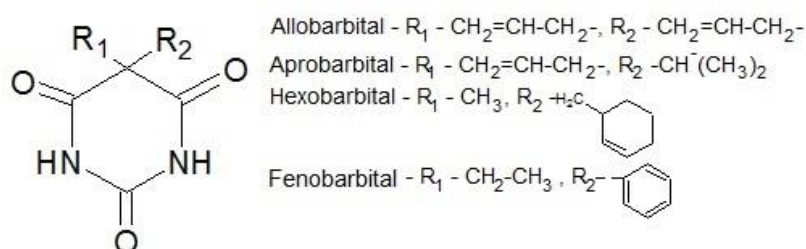
Většinu benzodiazepinů lze prokázat tzv. Zimmermannovým testem. Reakce je založena na sloučení benzodiazepinů s dvěma Zimmerovými činidly. Podmínkou reakce je přítomnost karbonylové funkční skupiny na uhlíku C₂. Jestliže není přítomná, nedochází k adici *m*-dinitrobenzenu na zmiňovaný uhlík C₃. Reakcí lze prokázat bromazepam, klonazepam, diazepam, oxazepam a jiné, které obsahují takto specifickou strukturu. První činidlo je 15 % (w/v) roztok hydroxid sodný rozpuštěného ve vodě. Druhé činidlo je 1 % (w/v) roztok *m*-dinitrobenzenu rozpuštěného v methanolu. Reakce probíhá tak, že z benzodiazepinů se v důsledku zásaditého prostředí odštěpuje v důsledku hyperkonjugace kyselý vodík z polohy C₃, čímž vzniká karbaniont, který následně reaguje s druhým činidlem, *m*-dinitrobenzenem, za vzniku tzv. Meisenheimova komplex, který je zabarven do červeno-fialové barvy [13-15].



Obrázek 4-Reakce obecné struktury benzodiazepinů se Zimmermanovým činidlem

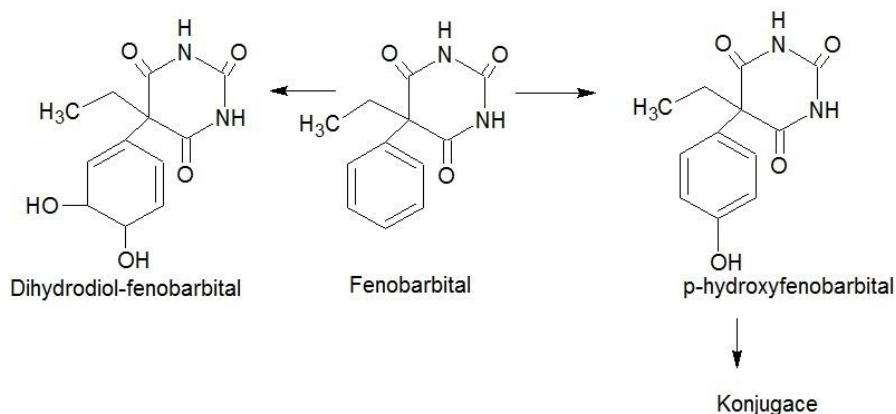
1.3.2 Barbituráty

Barbituráty byly poprvé syntetizovány v 70. letech 19. století. Začátkem 20. století bylo prokázáno, že barbituráty mají anti-anxietní, sedativní, hypnotické vlastnosti. V dnešní moderní době byly zcela nahrazeny lepšími, a bezpečnějšími substancemi především benzodiazepiny a tzv. nebenzodiazepinovými analogy (např. zolpidem, zopiklon atp.) Avšak lze se s nimi pořád setkat jako antikonvulziva, kde dosud se využívá fenobarbital či thiopental, popřípadě jako lék pro úvod do anestezie [16]. Obecná struktura barbiturátů je zobrazena na Obr. č. 5.



Obrázek 5-Obecná chemická struktura barbiturátů

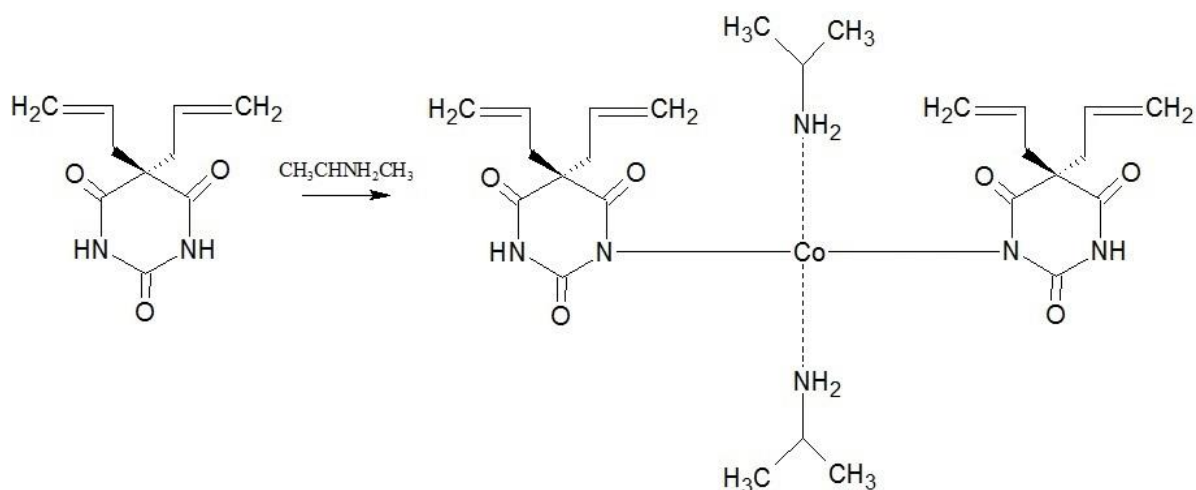
Na centrální nervovou soustavu působí vazbou na GABA_A receptory. Podávány jsou převážně perorálně. Maximální koncentrace při perorálním podání je dosažena v rozmezí 10 až 60 minut 100 %. Intravenózně podávané barbituráty slouží zejména ke krátkodobé anestézii s rychlým nástupem účinku. Díky svým fyzikálně – chemickým vlastnostem jsou rychle absorbovány a distribuovány v těle, zejména ty, které jsou podávány intravenózně. Nejčastěji jsou metabolizovány oxidací na poloze C_5 , kdy vznikají alkoholy, ketony, fenoly aj., které se následně konjugují s kyselinou glukuronidovou. Jiný proces metabolismu může vést k otevření cyklického kruhu a následné oxidaci [4, 5, 16].



Obrázek 6-Jedna z možných metabolických cest fenobarbitalu

Barbituráty lze identifikovat několika testy. Prvním z více možných testů je Dille–Koppányi, který je založený na reakci barbiturátu se dvěma indikátory. První se skládá z 0,1 % (w/v) octanu kobaltnatého rozpuštěného v methanolu a druhého reaktantu, 5 % (v/v) isopropylaminu rovněž rozpuštěného v methanolu [5, 13].

Reakce je započata přidáním roztoku isopropylaminu k barbiturátu, kdy dochází k deprotonizaci amidického dusíku. Následně reaguje kobalt se dvěma molekulami barbiturátu a dvěma molekulami isopropylaminu, sloužícího jako stabilizátor vzniklého komplex (Obr. 7), jehož výsledek se projevuje fialovou barvou [13, 17].

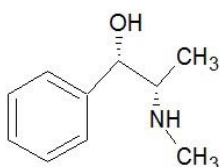


Obrázek 7-Dille-Koppányi reakce allobarbitalu

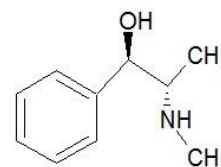
Dalším možným testem je tzv. Zwikkerův test, který je založen na smísení substance s 0,05 % (w/v) síranu měďnatého ve vodě a 5 % (v/v) pyridinu v chloroformu. Po smísení substance s činidly dochází ke vzniku světle fialově zbarveného roztoku [18]. Od tohoto testu je v dnešní době již upouštěno a začíná být nahrazován chromatografií na tenké vrstvě [6].

1.3.3 Efedriny

Jedná se o přírodní alkaloidy z keřů *Ephedra*, které se vyskytují zejména v oblasti východní Číny a střední Evropy. Efedrin je látka zneužívaná již dříve ve sportu a zejména jako prostředek ke ztrátě tukové tkáně, hubnutí a nárůstu svaloviny. V důsledku tohoto je na seznamu zakázaných dopingových látek pro vykonávání profesionálního sportu. V současné době se využívá jako lék proti astmatu, nízkému krevnímu tlaku, narkolepsii a při onemocnění dýchacích cest způsobuje roztáhnutí průdušnic (bronchodilatační efekt). Jeho návykovost se objevila až v posledních letech a to jak fyzická tak psychická. Bývá nejčastěji zneužíván pro výrobu deoxyderivátu, tedy derivátu methamfetaminu. Možné předávkování efedrinem vede ke zvýšení srdečního rytmu, což může způsobit infarkt myokardu nebo mozkovou mrtvici. Jeho enantiomer, pseudoefedrin, se využívá zejména v medicíně jako inhibitor histaminových receptorů v alergologii, kožním lékařství, kde potlačuje pocit svědění nebo neurootologii k potlačování stavů závratí [5, 19].



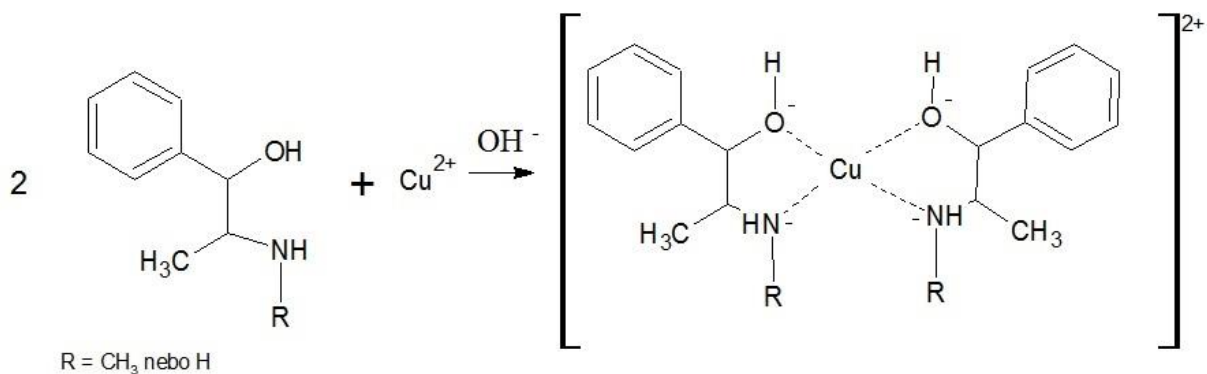
Obrázek 8-Pseudoefedrin



Obrázek 9-Efedrin

Efedriny lze identifikovat pomocí tzv. Chen-Kao testu. Jedná se o relativně selektivní test, který je charakteristický pro fenylalkylaminy se sousedící amino- a hydroxylovou skupinou. Bývá nejčastěji využíván ve farmaceutických analýzách pro jednoduchou a rychlou identifikaci efedrinu a jeho izomerů [20]. Chen-Kaovo činidlo vzniká smícháním 3 různých substancí, 1 % (v/v) roztoku kyseliny octové, 1 % (w/v) roztoku pentahydrátu síranu měďnatého a 8 % (w/v) roztoku hydroxidu sodného, který slouží v dané reakci k přípravě bazického pH [13]. Reakce probíhá tak, že se 2 molekuly (pseudo)efedrinu navazují na měď pomocí volných elektronových párů, které jsou přítomny na dusíku a kyslíku, kde podle

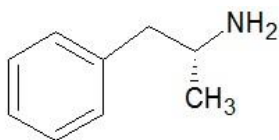
Lewisovy teorie kyselin a bází figurují jako Lewisovy báze a tudíž poskytují volné elektronové páry, čímž vzniká koordinačně - kovalentní vazba. Vzniká symetrický chelátový komplex, který je modře zbarven[13].



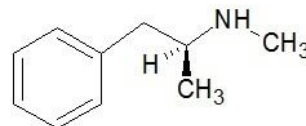
Obrázek 10-Reakce efedrinu a jeho derivátů s Chen - Kao činidlem

1.3.4 Amfetaminy

Amfetaminy jsou synteticky vyrobená chemická sloučeniny využívané a často zneužívané zejména jako stimulanty. Řadíme mezi ně amfetamin, methamfetamin, 3,4-methylenedioxyamfetamin (MDMA), a celá řada dalších. Tyto látky stimulují CNS a kardiovaskulární systém, díky čemuž dochází k zvýšení koncentrací noradrenalinu a dopaminu, které navozují zvýšení pozornosti. Klinické využití mají nejčastěji při léčbě narkolepsie, a jako adjuvantní terapii u hypoaktivní varianty ADHD u dětí. Amfetaminy se nejčastěji připravují jednoduchou reakcí, kdy dochází k odstranění hydroxylové skupiny z alifatického řetězce efedrinu nebo jeho derivátů [5, 21].



Obrázek 11-Amfetamin

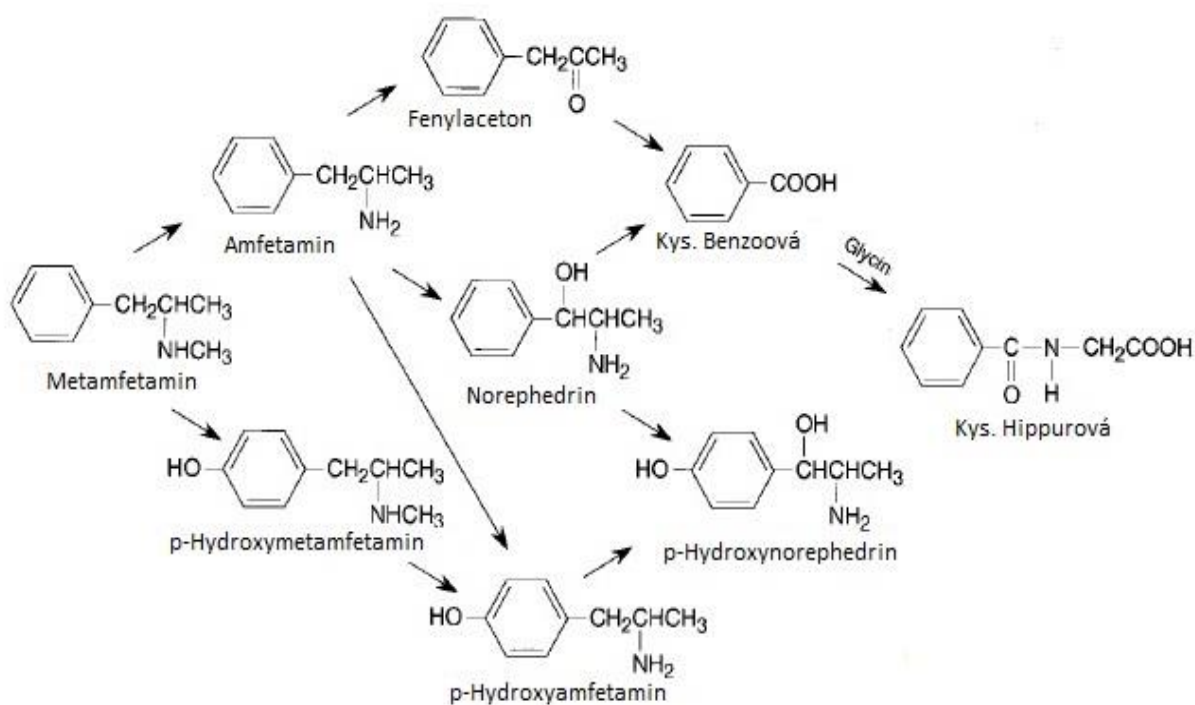


Obrázek 12-Methamfetamin



Obrázek 13-Jeden z možných způsobů výroby methamfetaminu přímo z efedrinu

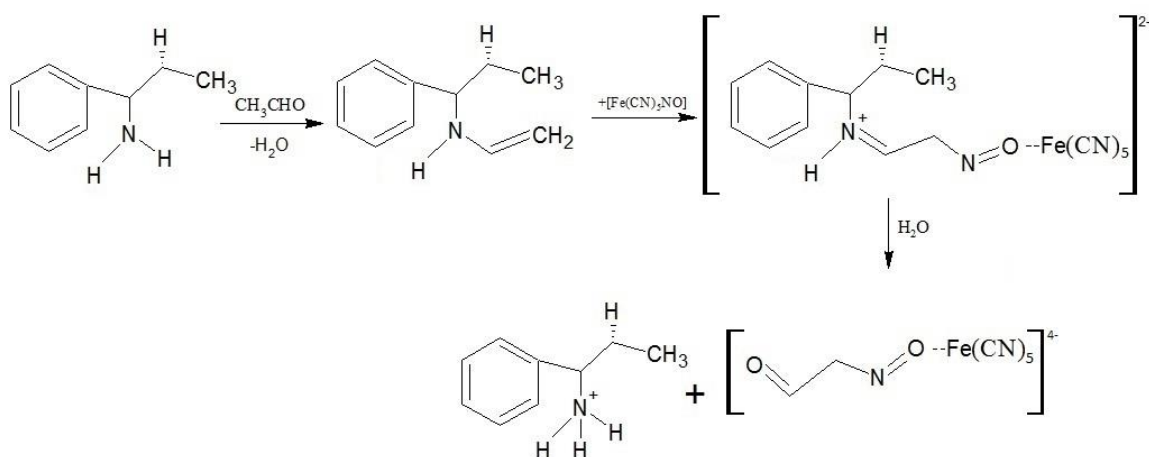
Amfetaminy se nejčastěji podávají perorálně, intravenózně nebo ve formě kouření (inhalace) – v tomto případě hovoříme o krystalickém methamfetaminu, který je často smíchán s bazickými látkami, aby snáze po inhalaci přecházel jako lipofilnější molekula plicemi do centrálního oběhu. V poslední době výrazně narůstá zneužívání zejména methamfetaminu. Slangově se methamfetamin označuje: „speed, piko, či perník“. Amfetaminy jsou nejčastěji metabolizovány oxidací, hydroxylací nebo deaminací, jak je znázorněno na Obr. č. 14 [5].



Obrázek 14-Metabolismus amfetaminů [5]

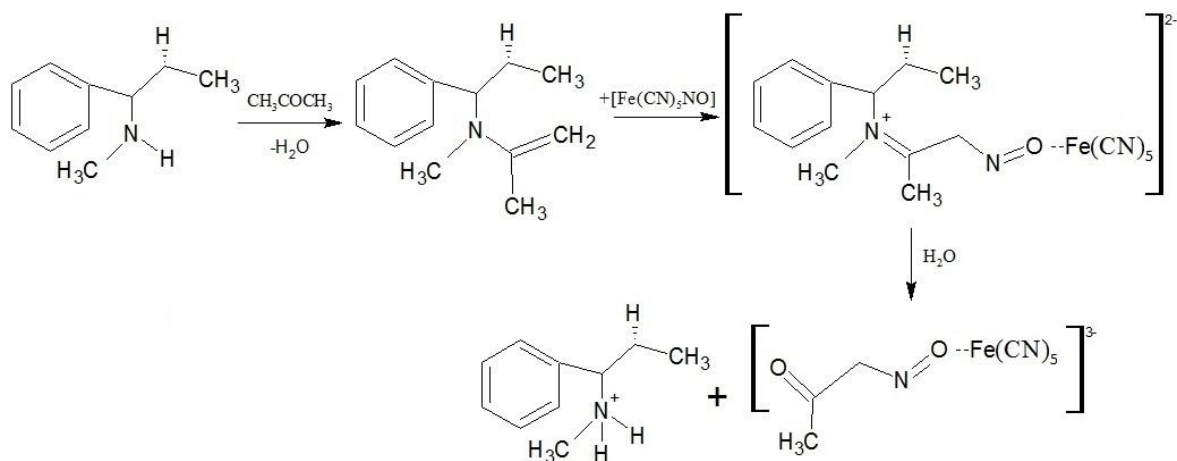
Test na prokázání přítomnosti amfetaminu a methamfetaminu se nazývá Simonsův test. Tímto testem lze rozlišit a detekovat primární a sekundární aminy (tedy například rozlišit amfetamin od methamfetaminu). Základní chemické látky činidla jsou pro oba testy stejné. Jedná se o směs 2 % (w/v) roztoku nitroprussidu sodného a 2 % (w/v) roztoku uhličitanu sodného rozpuštěného ve vodě. V případě že chceme určit, zdali vzorek obsahuje primární aminy – např. amfetamin, je jako součást činidla na bázi nitroprussidu použit aceton. Pro identifikace sekundárních aminů je nutné použít acetaldehyd [17, 20, 22].

Reakce probíhá tak, že acetaldehyd reaguje s methamfetaminem za vzniku enamínu, kde volný elektronový pár na kyslíku atakuje vodík na aminoskupině. Vzniklý enamín reaguje s nitroprussidem sodným za vzniku imoniové soli, která je následně hydrolyzována na Simon - Awe komplex [20].



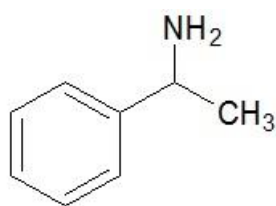
Obrázek 15-Simonsova reakce na průkaz sekundárních aminů

Obdobně reaguje i Simonsovo činidlo s acetonem za přítomnosti primárních aminů, vzniká tmavě fialově zbarvený komplex. Takto lze odlišit například amfetamin od methamfetamin, eventuálně efedrinu, který díky přítomnosti hydroxylové skupiny se Simonsovým činidlem reaguje.

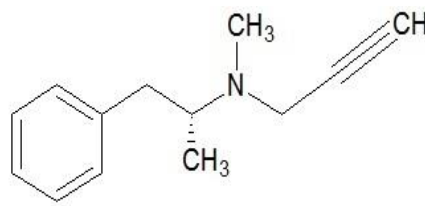


Obrázek 16-Simonsova reakce na průkaz primárních aminů

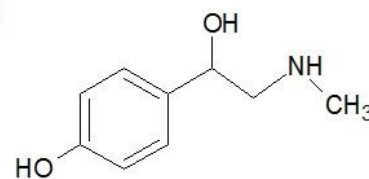
Mezi další testy použitelné k identifikaci a rozlišení jednotlivých amfetaminů lze použít Liebermannův test. Je založen na reakci pouze jednoho činidla, které se skládá z 1 g dusitanu sodného, (popřípadě drasel) a 10 ml koncentrované kyseliny sírové. Je nutno podotknout, že je zapotřebí chladit vzniklou směs, např. ve vodní lázni [14]. Dle reakce s primárním, sekundárním či terciárním aminem poskytuje různá zbarvení. Na jednotlivé testy byly použity α -methylbenzylamin (primární amin), synephrine (sekundární amin) a selegilin (terciární amin).



Obrázek 17- α -Methylbenzylamin



Obrázek 18- Selegilin

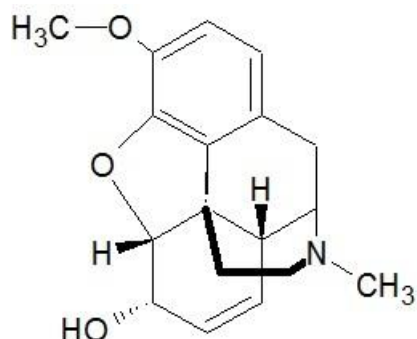


Obrázek 19 – Synephrin

1.3.5 Kodein

Přírodní opiat vyskytující se v nedozrálých makovicích máku setého (*Papaver somniferum*). Kodein jedním z minoritních alkaloidů nacházejících se v opiu. Jedná se z hlediska medicijního použití o prostředek proti kašli či analgetikum. Mezi další účinky, které se po požití kodeinu mohou vyskytovat, patří nauzea, pocit únavy či euforie. Kodein

se váže na κ -opioidové receptor a δ -opioidové receptory v CNS. Kodein sám nevyvolává adikci, za její vznik jsou zodpovědné jeho metabolity např. morfin [5, 19].

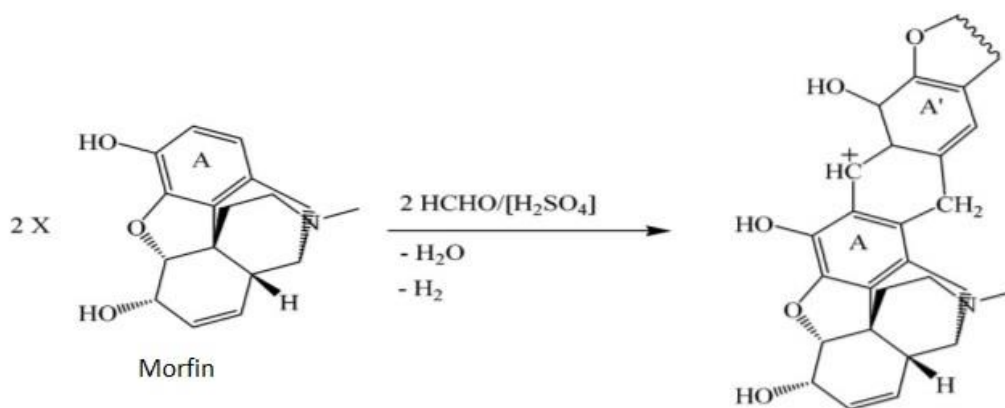


Obrázek 20- Kodein

Kodein bývá metabolizován izoenzymem CYP 450 třídy 2D6 zpět na morfin. Udává se, že 10 – 15% zakavkazské populace má značný deficit při tomto enzymu a proto nedokáže metabolizovat kodein na morfin. Majoritní část dávky je metabolizovaná glukuronidací, glukuronid je pak dále neaktivní [14].

Kodein lze prokázat alespoň dvěma reakcemi. První je reakce s Ehrlichovým činidlem, činidlo je nejlepší připravit čerstvé, obvykle vydrží pouze dva týdny. Skládá se z 0,5 g *p*-dimethylaminobenzaldehyd, který je rozpuštěn v 50 ml 95 % (*v/v*) ethanolu, namísto ethanolu je rovněž možné použít propan-1-ol. Výsledek je žlutá sraženina v čirém roztoku [17, 23].

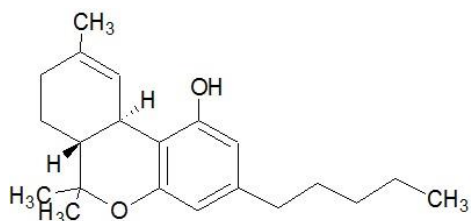
Poměrně specifickou reakcí pro detekci opiátů (vč. kodeinu) je Marquis test. Jedná se o směs 100 ml koncentrované kyseliny sírové a 5 ml 40 % (*w/v*) formaldehydu. Princip reakce je takový, že dvě molekuly kodeinu (či jiného analogu opiátového typu) reagují s dvěma molekulami formaldehydu. Dochází ke kondenzaci molekul přes formaldehyd v prostředí kyseliny sírové (viz Obr. č. 21). Vzniklý kondenzát je charakterizován obecně fialovým zbarvením [24].



Obrázek 21- Marquizův test, zde konkrétně na morfin [24]

1.3.6 Kanabinoidy

Kanabinoidy obsažené v sušině rostlin konopí (marihuana) bývají nejčastěji přijímány do těla kouřením, popřípadě podávány ve formě extraktů perorálně. Mezi aktivní látky při kouření marihuany se nejčastěji uvádějí Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabinol, cannabidiol. Jednotlivé lístky obsahující vyšší koncentraci kanabinoidů se mísí s tabákem, aby docházelo k pomalejšímu hoření. Dalším možným způsobem příjmu je kouření hašiše, což je extrahované a zakonzentrované pryskyřice. Hašiš obvykle obsahuje až 30 % THC.

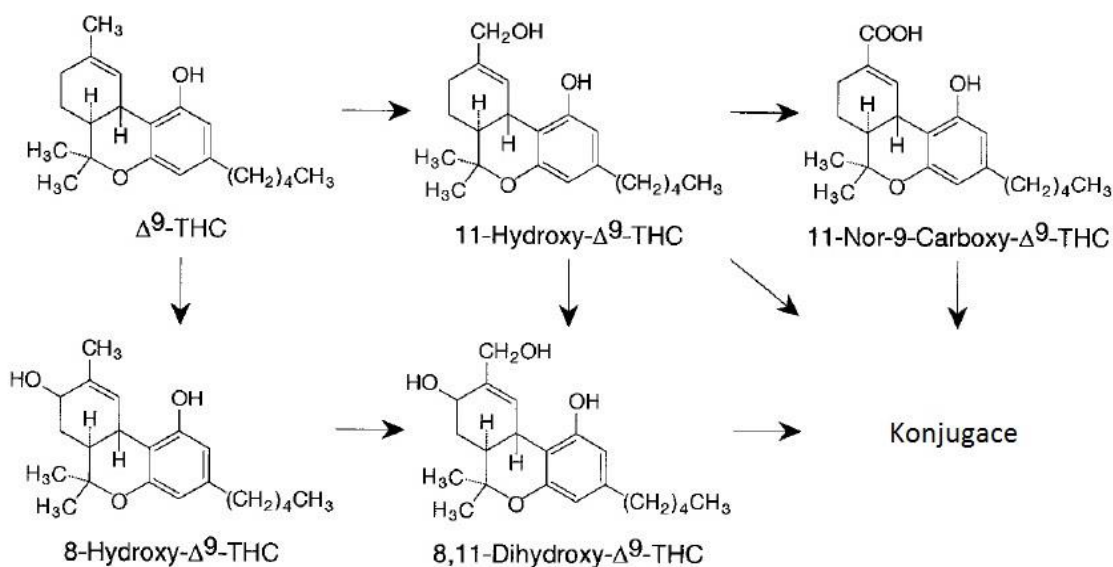


Obrázek 22- Struktura Δ^9 -THC

THC je odpovědné za evokaci halucinací, má sedativní a relaxační účinky, vyvolává pocit euforie, navíc snižuje nitrooční tlak, což se projevuje abnormálně červenýma očima. Dalšími projevy bývá nejčastěji pocit hladu, pocit vyschlosti v ústech (tzv. xerostomie). THC není zpravidla fyzicky návykový, avšak psychická návykovost je na poměrně vysoké úrovni, kdy člověk, který je psychicky závislý potřebuje pravidelnou denní dávku, aby se zbavil nechtěných abstinčních projevů spojených s nervozitou a předrážděností. Díky svým

sedativním účinkům a antiemetickým bývá podáván pacientům s vážnými nemocemi jako rakovinou či roztroušenou sklerózou.

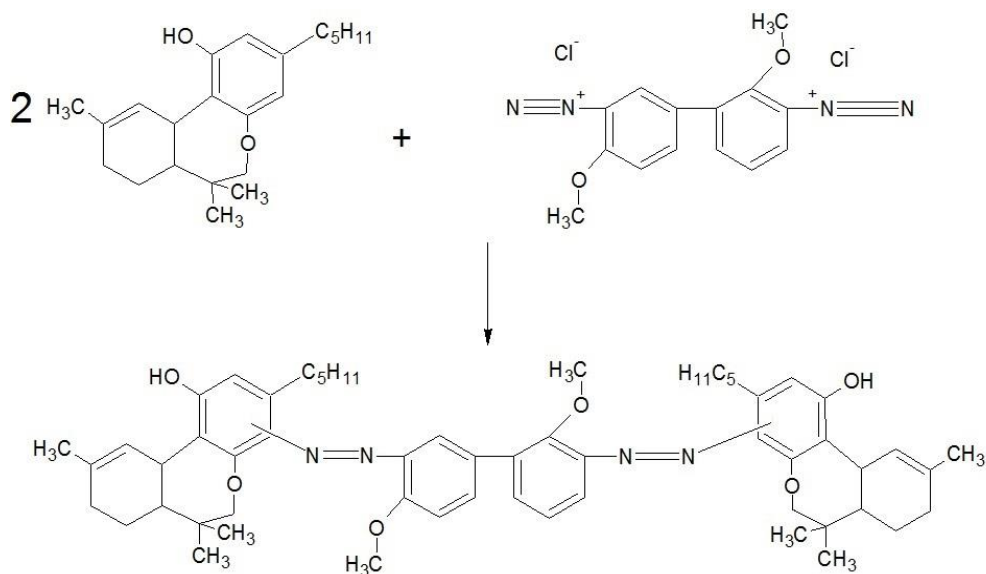
Po absorpci THC do lidského organismu je díky své lipofilitě rychle a snadno distribuována nejčastěji přes krevní plasmu do mozku, kde interaguje s kanabinoidovými receptory CB₁ a CB₂. Udává se, že maximální koncentrace THC v mozku nastává přibližně do 30 minut po vstupu do organismu. Nejčastější metabolickou dráhou pro THC je navázání hydroxylových skupin do poloh C₈ a C₁₁ a následná konjugace s kyselinou glukuronovou [5, 16].



Obrázek 23- Metabolismus THC [5]

Předávkování THC vyžaduje přijetí velmi vysokých dávek, v řádech gramů. Při intoxikaci nastává stav, kterému se v běžném hovorů říká „holotrop“, s vertiginózními stavy v důsledku zvýšeného srdečního tepu s následnou nauzeou.

Test na přítomnost izomerů THC je založený na reakci s diazotovanými barvivy řady Fast Blue (např. Fast Blue B, BB, Nebo Fast Garnet GBC aj.). THC reaguje s Fast Blue smíchaného se síranem sodným v poměru 1:100 (w/w) za vzniku oranžově zbarveného roztoku. Přidáním uhličitanu sodného, který je v reakci využit jako medium pro mírně bazické prostředí, indikuje Fast Blue B změnou ze světle zeleného roztoku na oranžově zbarvený roztok. Reagují dvě molekuly THC s jednou molekulou příslušného činidla (Obr. č. 24) [22, 25].

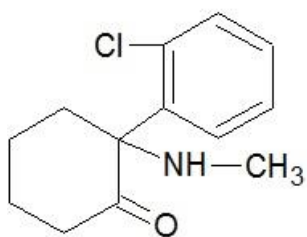


Obrázek 24-reakce THC s Fast Blue B

1.3.7 Ketamin

Ketamin je látka, která je hojně využívána hlavně jako anestetikum, i když se v humánní praxi z důvodu nežádoucích účinků od jeho použití ustupuje. Velmi často se používá jako anestetikum při veterinárním ošetření zvířat, díky tomu je na ilegální drogové scéně relativně dostupný. Ketamin je možno díky své efektivnosti podávat všemi způsoby. Nejčastěji bývá podáván intravenózně a intramuskulárně. Jedná se o antagonistu NMDA receptorů. V poslední době je zneužíván jako droga na ulicích pro své halucinogenní účinky a obvykle bývá podávána jako příměs do jiných drog k prodloužení jejich trvání, zejména do tablet extáze (MDMA) [4, 19, 26].

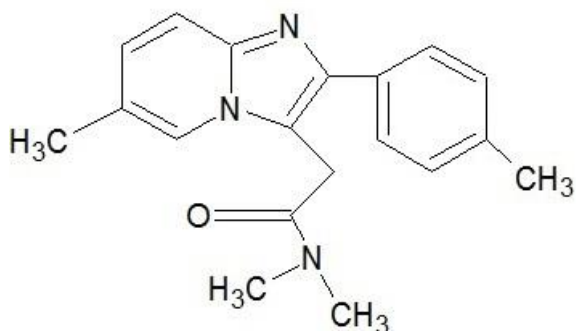
Ketamin lze detekovat a prokázat modifikací tzv. Scottova testu. Jedná se o činidlo složené ze směsi 2 % (w/v) thiokyanatanu kobaltnatého rozpuštěného ve vodě, 0,4 % (w/v) hydroxidu sodného. Test je použitelný i pro zolpidem a jeho prekurzory. Vzniklý výsledný roztok je zbarven pro ketamin do levandulové barvy [13, 27].



Obrázek 25-Chemická struktura ketamin

1.3.8 Zolpidem

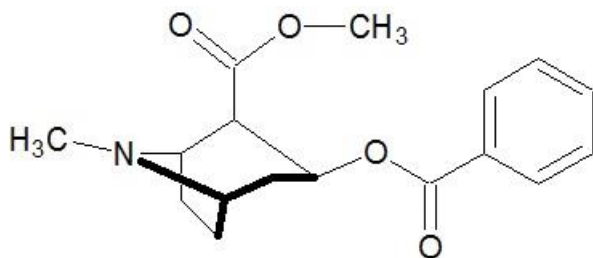
Léčivo používané pro léčbu insomnie a některých mozkových poruch, které se váže na GABA receptory stejně jako benzodiazepiny a vyvolává sedativní až hypnotické účinky. Při předávkování bylo zjištěno, že uvolňuje křeče a podporuje relaxaci příčně pruhovaných svalů. Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, lze zolpidem prokázat modifikací Scottova testu, kdy nám udává modré charakteristické zbarvení [13, 27].



Obrázek 26-Chemická struktura zolpidemu

1.3.9 Kokain

Kokain je přírodní alkaloid získávaný z rostliny *Erythroxylon coca*. Tato rostlina roste převážně v horských oblastech Jižní Ameriky (např. Peru, Bolívie).

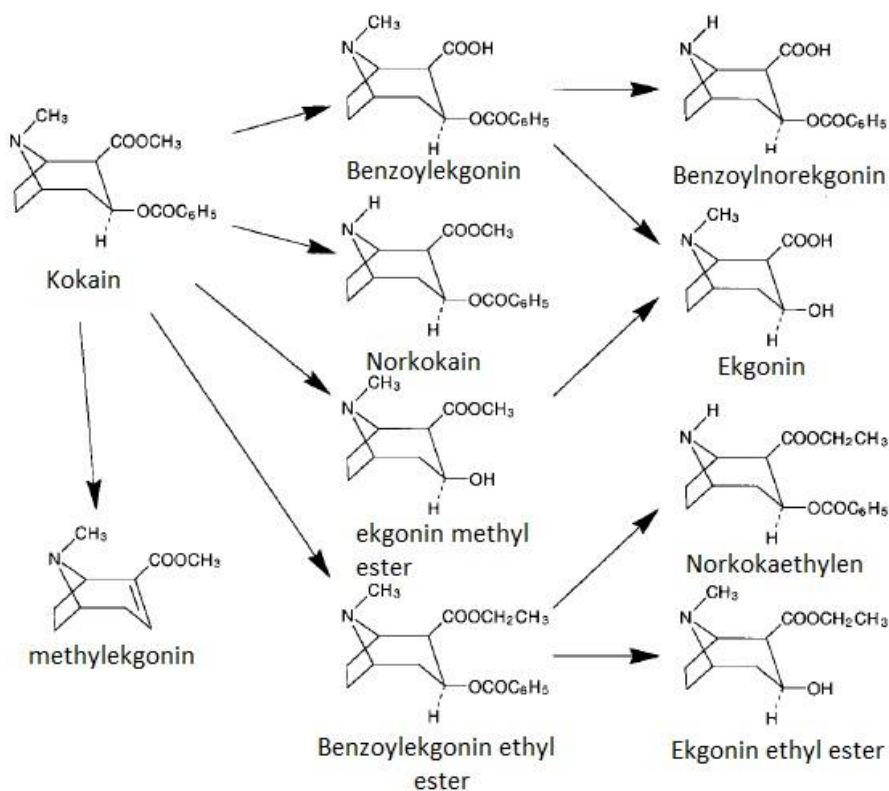


Obrázek 27- Chemická struktura kokainu

Kokain inhibuje presynaptické vychytávání zpětných neurotransmiterů, jmenovitě noradrenalinu, serotoninu a dopaminu na synaptickém spojení. Tento děj vede k navýšení koncentrace neurotransmiterů v synaptické štěrbině, která u člověka navozuje změny chování, ztrátu pocitu únavy, pocit euforie, je změněná chuť k jídlu, avšak potlačují se vjemy z potenciálně nebezpečných situací – zvyšuje sebevědomí. V důsledku těchto budivých vlastností byl kokain zneužíván i ve 2. světové válce jako stimulans. Medicínsky slouží kokain jako lokální anestetikum díky schopnosti blokovat sodíkové kanálky nociceptivních axonů a je proto využíván při ORL vyšetření nebo pro místní umrtvení, např. při plastických operacích. Prodloužení jeho efektu se dosahuje smísením s adrenalinem, který způsobuje místní vasokonstrikční účinky [4, 5, 19].

Kokain nejčastěji bývá podáván intranazálně, ale může být dále aplikován intravenózně a může se i kouřit, takovému kokainu se říká „crack“. Uvádí se, že maximální plasmatická koncentrace nastává od 35 do 90 minut v závislosti na cestě podání. Avšak po přijetí do těla intravenózně nastává maximální koncentrace již do 5 minut. Distribuce kokainu v lidském těle je zprostředkována navázáním se na plasmatický protein albumin. Největší koncentraci kokainu lze pozorovat v mozku, slezině, ledvinách a plicích. Metabolismus v lidském těle je prioritně veden přes hydrolýzu esterových vazeb (Obr. č. 27). Primárním metabolitem je neaktivní ekgonin methyl ester. Druhým majoritním metabolitem

kokainu je benzoylekgonin, který bývá tvořen samovolně při fyziologickém pH. Udává se, že až 90 % kokainu a jeho metabolitů je eliminováno močí z dávky během 24 hodin [5].



Obrázek 28- Metabolismus kokainu [19]

Kokain lze identifikovat Scottovým testem. Samotný mechanismus reakce spočívá v tom, že po přidání činidel, dochází k hydrolyze díky hydroxidu sodnému esteru a může být následná reakce cítit po zápachu methylbenzoátu. Vzniklé zbarvení nám poukazuje, zda se jedná o volnou bázi nebo o sůl hydrochlorid. Jestliže se jedná o hydrochlorid kokainu, reaguje se Scottovým činidlem za vzniku modré sraženiny v růžovém roztoku. Naopak jedná-li se o čistý kokain, dochází k vzniku růžové sraženiny v modře zbarveném roztoku [28].

2 Experimentální část

2.1 Materiály a chemikálie

2.1.1 Chemikálie

Hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková (37 %, w/v) a kyselina sírová (98 %, w/v) a ethanol (absolutní) byly zakoupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo), *m*-dinitrobenzen (97 %), síran měďnatý pentahydrát, pyridin (> 99 %), dichlormethan, kyselina octová (> 99 %), efedrin hydrochlorid (99.5 %), nitroprussid sodný (99 %), aceton (99 %), acetaldehyd (> 99,5 %), fenylethylamin (99 %), allobarbitál, hexobarbitál, aprobarbitál, ketamin, kokain hydrochlorid, methamfetamin hydrochlorid, amfetamin hydrochlorid, Δ 9-tetrahydrokanabinol (vše jako certifikované roztoky o koncentraci 1,0 mg/ml volné báze v methanolu), synefrin (99 %), selegilin hydrochlorid (99 %), dusitan sodný (> 99 %), α -methylbenzylamin (> 95 %), Fast Blue B Salt (95 %), Fast Garnet GBC (> 90 %), kyselina anthranilová (98 %), thiokyanatan kobaltnatý (98 %), *p*-dimethylaminobenzaldehyd (99 %), Methanol (LC-MS kvalita, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA, 99,8 % roztok), octan kobaltnatý (> 99,5 %) a isopropylamin (> 99 %) byly dodány firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Flubromazolam, Flubromazepam, Diclazepam, Pyrazolam, Nifoxipam, Meclonazepam, Nimetazepam, Etizolam a Bentazepam (certifikované referenční standardy o koncentraci 1,0 mg/ml v methanolu) byly zakoupeny u firmy Chiron AS (Trondheim, Norsko). Vzorky vyřazených léčivých přípravků (Lexaurin 3 mg, Neurol 0,5 mg, Oxazepam 10 mg, Diazepam Slovafarma 10 mg, Rivotril 0,5 mg, Ansilan 10 mg, Elenium 10 mg, Hypnogen 10 mg a Clarinase 120 mg) byly poskytnuty Ústavem soudního lékařství a medicínského práva Fakultní nemocnice Olomouc. Deionizovaná voda byla připravena v laboratoři pomocí purifikčního systému (18 M Ω , Millipore, Mohlsheim, Francie). Není-li uvedeno jinak, byly všechny chemikálie analytické čistoty nebo vyšší.

2.1.2 Materiál a přístroje

Mikropipety Eppendorf Research PLUS s nastavitelným objemem v rozsahu 20 - 1000 μ l (Eppendorf AG, Hamburg, Německo), Vialky skleněné objem 2 ml (Aqilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), Vialky zaklapovací; objem 10 ml (Merci, Praha, Česká

republika), analytické váhy MS (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko), centrifuga MR23i (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a UV-VIS Spektrofotometr W2450 Shimadzu (Kyoto, Japonsko).

2.2 Příprava Standardů

Jednotlivé tablety byly rozdrceny a rozetřeny na jemný prášek. Vzniklý prášek byl kvantitativně převeden do vialky a extrahován methanolem v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Extrakt byl poté centrifugován po dobu 10 minut při 3000 rpm. Následně byl odebrán 1 ml supernatantu, který byl použit pro studium popsaných reakcí. Standardy ostatních látek byly připraveny přesným navážením pevné substance či odměřením přesného objemu tak, aby vznikly zásobní roztoky o koncentraci 1,0 mg/ml v methanolu, popřípadě byly přímo k testování použity původní substance o přesné hmotnosti či objemu. V případě solí byl proveden přepočít tak, aby navážka odpovídala výsledné koncentraci volné báze či kyseliny.

2.3 Chen-Kao Test: Detekce efedrinu a pseudoefedrinu

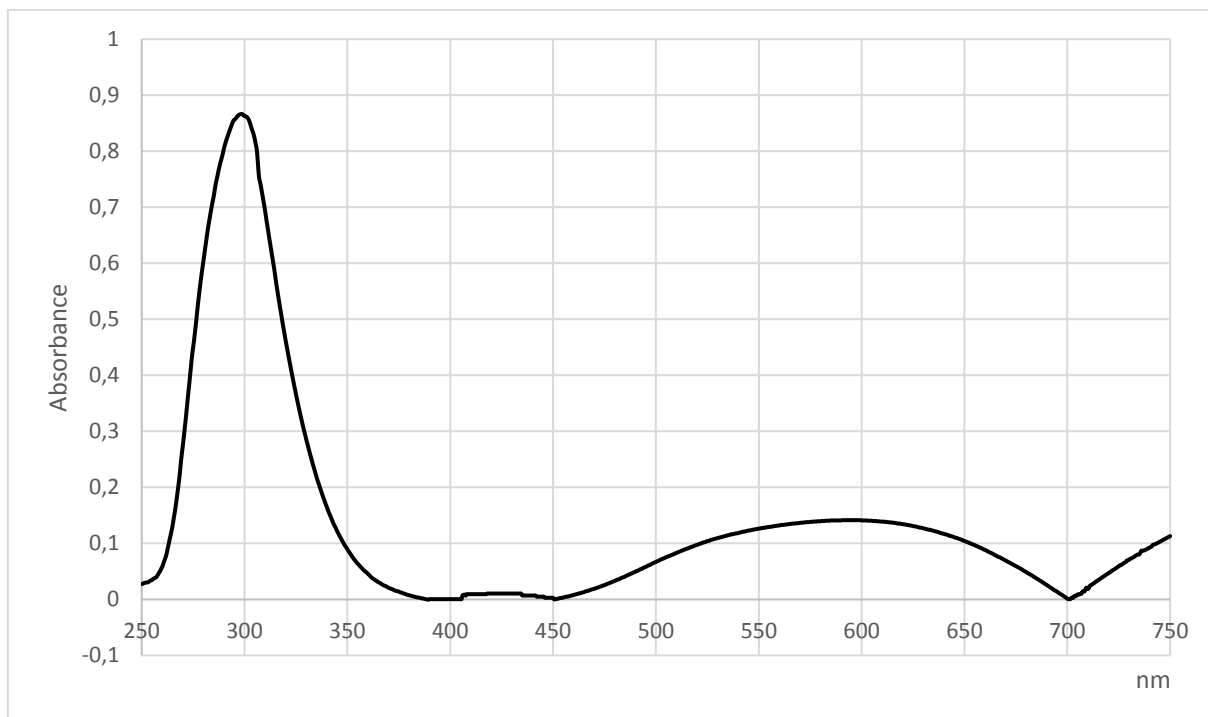
V experimentální části byl proveden test efedrinu. Smíšením 1 mg efedrinu se složkami po 300 μ l Chen-Kao činidla dochází k reakci, která vede k modře zbarvenému roztoku (Obr. 29). Chemická reakce je popsána v obrázku č. 8. Test je relativně citlivý až domnožství 0,10 mg substancí (Tabulka č. 2). Ponechali jsme reagovat 1 mg efedrinu s 50 μ l činidla. Současně byla prokázána výborná stabilita činidel, která byla vyhodnocována po dobu 5 měsíců, nejprve co 3 dny. Po 2 měsících byla činidla testována po týdnu. Obdobně byl připraven vzorek pro měření UV-VIS spektra výsledného produktu reakce, přičemž jako slepý vzorek byla použita směs všech tří částí Chen-Kaova činidla. UV-VIS spektrum je vyobrazeno na Obr. č. 30. Ze spektra je patrné, že absorpční maximum při vlnové délce 301 nm.



Obrázek 29- Chen-Kao reakce s efedrinem a jeho specifická barva

Tabulka č. 2: Citlivost efedrinu Chen-Kao testu

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ano
0,05 mg	Ne



Obrázek 30- UV-VIS spektrum efedrinu po reakci s Chen-Kao činidlem

2.4 Zimmermannův Test: Detekce benzodiazepinů

Po smísení 1 mg vybraných benzodiazepinu s 500 μ l prvního činidla a následném přidání 500 μ l druhého činidla dochází k reakci (viz blíže Obr. č. 3). Vzniklý komplex není stálý a po čase přechází do hnědého zbarvení. Po přidání 500 μ l koncentrované kyseliny chlorovodíkové přechází červeno-fialové zbarvení roztoku do žlutého (Obr. 31). Citlivost tohoto testu je relativně dobrá i pro velmi nízké koncentrace vzorku. Během experimentů bylo zjištěno, že je nutné, aby byl vzorek smíchán s činidly v poměru 2:1, aby byla reakce poskytovala dostatečné zbarvení. Jestliže byla smíchána pouze činidla, došlo ke vzniku bílé zakaleného roztoku, který zůstal stabilní po dobu 4 měsíců. Citlivost této metody je uvedena v tabulce č. 3.

Obdobně byl připraven vzorek pro měření UV-VIS spektra výsledného produktu reakce, přičemž jako slepý vzorek byla použita směs Zimmermanova činidla. UV-VIS spektrum je vyobrazeno na Obr. č. 32. Ze spektra je patrné absorpční maximum při vlnové délce 356 nm.

Stejnému postupu byly podrobeny všechny studované benzodiazepiny. Z výsledků jednotlivých testů bylo zjištěno, že oxazepam ačkoliv obsahuje na uhlíku C₂ karbonylovou funkční skupinu, nereagoval v důsledku přítomnosti hydroxylové skupiny na uhlíku C₃.

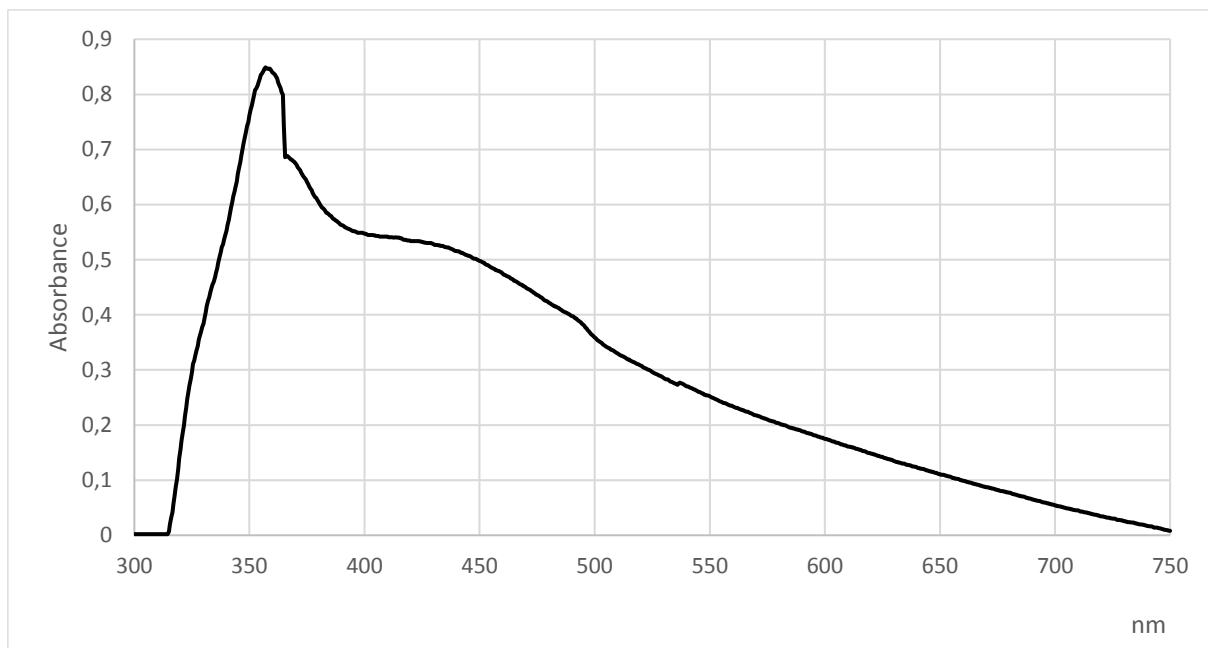
V důsledku toho nemůže vznikat karbaniont, který následně reaguje s *m*-dinitrobenzenem. Jako další zjištění je třeba zmínit, že alprazolam, který neobsahuje v poloze C₂ karbonylovou funkční skupinu, reagoval s testem pozitivně – za vzniku meruňkově zbarveného roztoku. Tento fakt může být s vysokou pravděpodobností způsoben, přítomností dvojně vazby v ortho poloze vůči C₃ uhlíku. Jednotlivé benzodiazepiny, které reagovaly se Zimmermannovým činidlem, poskytovaly ve výsledku různé barvy roztoků (Tabulka č. 4). Například bromazepam poskytl s činidly, naproti diazepinu, žluté zbarvení roztoku.



Obrázek 31 – Levý obrázek zobrazuje výsledné zbarvení při reakci diazepamu se Zimmermanovým činidlem, pravý obrázek popisuje barevný přechod z původně fialové barvy do tmavě hnědého zbarvení po 5 minutách od reakce

Tabulka č. 3. Citlivost diazepamu Zimmermanová testu

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ano
0,05 mg	Ano
0,025 mg	Ano
0,0125 mg	Ne

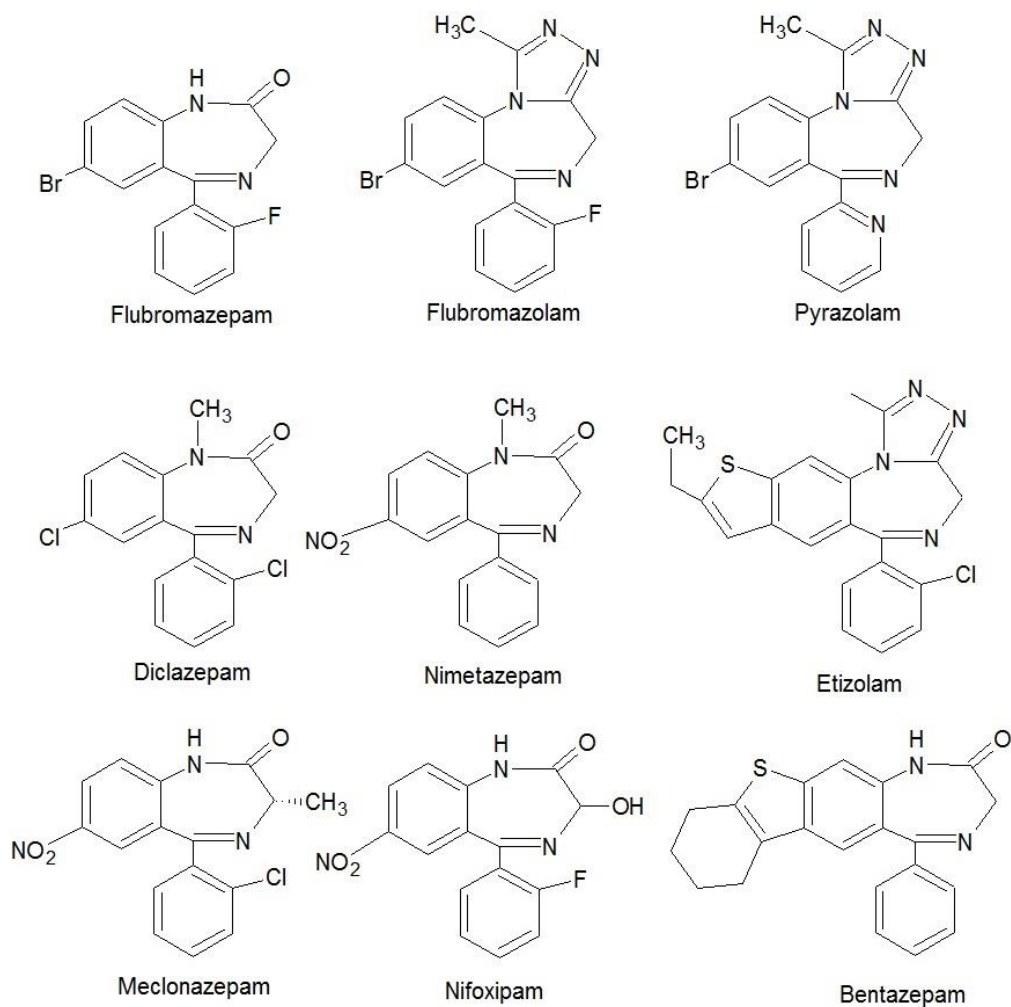


Obrázek 32-UV-VIS spektrum diazepamu po reakci se Zimmermanovým činidlem

Tabulka č. 4. Přehled zbarvení jednotlivých benzodiazepinů

Druh benzodiazepinu	Zbarvení
Diazepam	Fialová
Oxazepam	Bez zbarvení
Medazepam	Světle žlutá
Alprazolam	Meruňková
Bromazepam	Červená
Klonazepam	Žluto-oranžová

Jestliže je výsledný roztok benzodiazepinů s činidly zředěn s vodou, dochází k přechodu ze specifického zbarvení do bezbarvého roztoku. Vzniklý produkt je pravděpodobně nestabilní a v přítomnosti vodného prostředí může docházet k jeho rozpadu, např. k hydrolyze. Nové experimentální benzodiazepiny (tzv. designer benzodiazepiny, Obr. č. 33) vykazovaly ve většině případů pozitivní reakci se Zimmermanovým činidlem (viz Tabulka č. 5).



Obrázek 33- Nové syntetické benzodiazepiny

Tabulka č. 5. Přehled zbarvení jednotlivých experimentálních benzodiazepinů

Druh benzodiazepin	Zbarvení po reakci
Flubromazolam	Fialová
Flubromazepam	Světle fialová až do běla
Diclazepam	Hnědo červená
Pyrazolam	Bílá sraženina
Nifoxipam	Tmavě zlatá
Meclonazepam	Světle žlutá
Nimetazepam	Světle hnědá
Etizolam	Bílá sraženina
Bentazepam	Bez zbarvení

Některé nové syntetické benzodiazepiny vykazovaly stejné zbarvení jako pouhé smíšení základních činidel, především díky tomu, že produkty nevykazovaly dostatečnou stabilitu. Po určité době reakce došlo ke specifickému zbarvení. Obecně lze i takto určit zpětně o, který benzodiazepin se jednalo, jelikož drtivá většina přechází opět do specifických barev (Tabulka 6). Jednotlivé designer benzodiazepiny byly zkoumány po dobu 2 dnů.

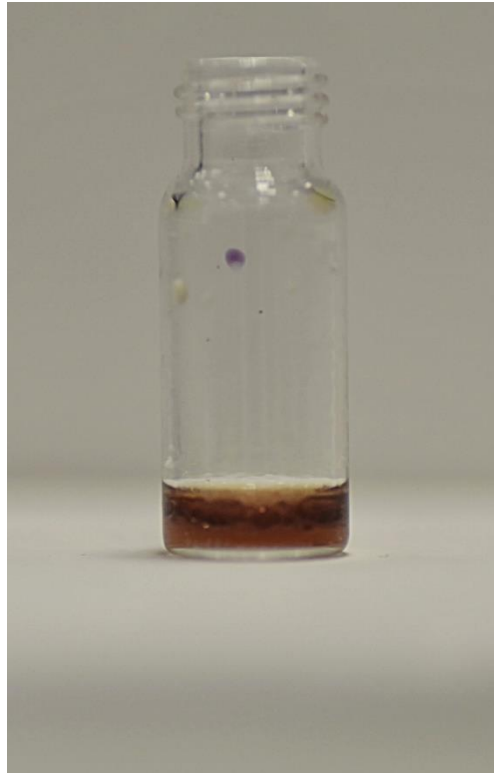
Tabulka č. 6. Přehled barvených přechodu, z původně jejich barev, které jsou popsány v tabulce č. 5, a doprovázených vlastností experimentálních benzodiazepinů

Druh experimentálního benzodiazepinu	Flubromazolam	Flubromazepam	Diclazepam	Pyrazolam	Nifoxipam
Barevných přechod po určité době	Bíle	Hnědá barva	Tmavě černé	Čirý roztok s bílou sraženinou	Tmavě zlatá
Doprovázené vlastností reakce	3 minuty stabilní	3 minuty stabilní	Stabilní po dobu 2 hodin	Bílá sraženina	Stabilní po celou dobu experimentu
Druh experimentálního benzodiazepinu	Meclonazepam	Nimetazepam	Etizolam	Bentazepam	
Barevných přechod po určité době	Bez přechodu	Bez přechodu	Světle hnědé Až hnědo-zlaté		
Doprovázené vlastností reakce	Stabilní po celou dobu experimentu	Stabilní po celou dobu experimentu, světle hnědá sraženina		nereagoval	

2.5 Simonsův test: Detekce amfetaminu a methamfetaminu

Navážkou 1 mg methamfetaminu a přidáním 150 μ l obou činidel lze pozorovat vznik zbarvení roztoku do kobaltové modři. Reakce je detailněji popsána v kap. 1.3.4. Vzniklý produkt není stabilní a asi po deseti minutách, přechází modrá barva v roztoku v hnědou sraženinu (Obr. 34). Jestliže reagoval 1 mg amfetaminu se 150 μ l obou činidel, postupně přecházel původně bezbarvý roztok do tmavě fialového zbarvení, avšak na rozdíl od reakce sekundárního aminu (methamfetamin) docházelo ke vzniku sraženiny s typicky tmavě červenou barvou (Obr. 35). Tato reakce je podstatně více nestabilní a přechází po 3 minutách do černo-hnědé barvy.

Následovně byly připraveny vzorky pro měření UV-VIS spekter výsledných produktu, kde jako slepý vzorek, byly použity příslušné Simonsova činidla. UV-VIS spektrum je zobrazeno na Obr. č. 36. Ze spekter je možné odečíst absorpční maxima obou látek (methamfetamin, absorpční maximum při vlnové délce 584 nm a amfetamin při 399 nm). Citlivost testů na amfetamin a methamfetamin je shrnutá v tabulkách 7 a 8.



Obrázek 34- levý obrázek ukazuje výsledné zbarvení reakce methamfetaminu se Simonsovým činidlem obsahující aceton, pravý obrázek poukazuje na barevný přechod reakce methamfetaminu se Simonsovým činidlem po 30 minutách.



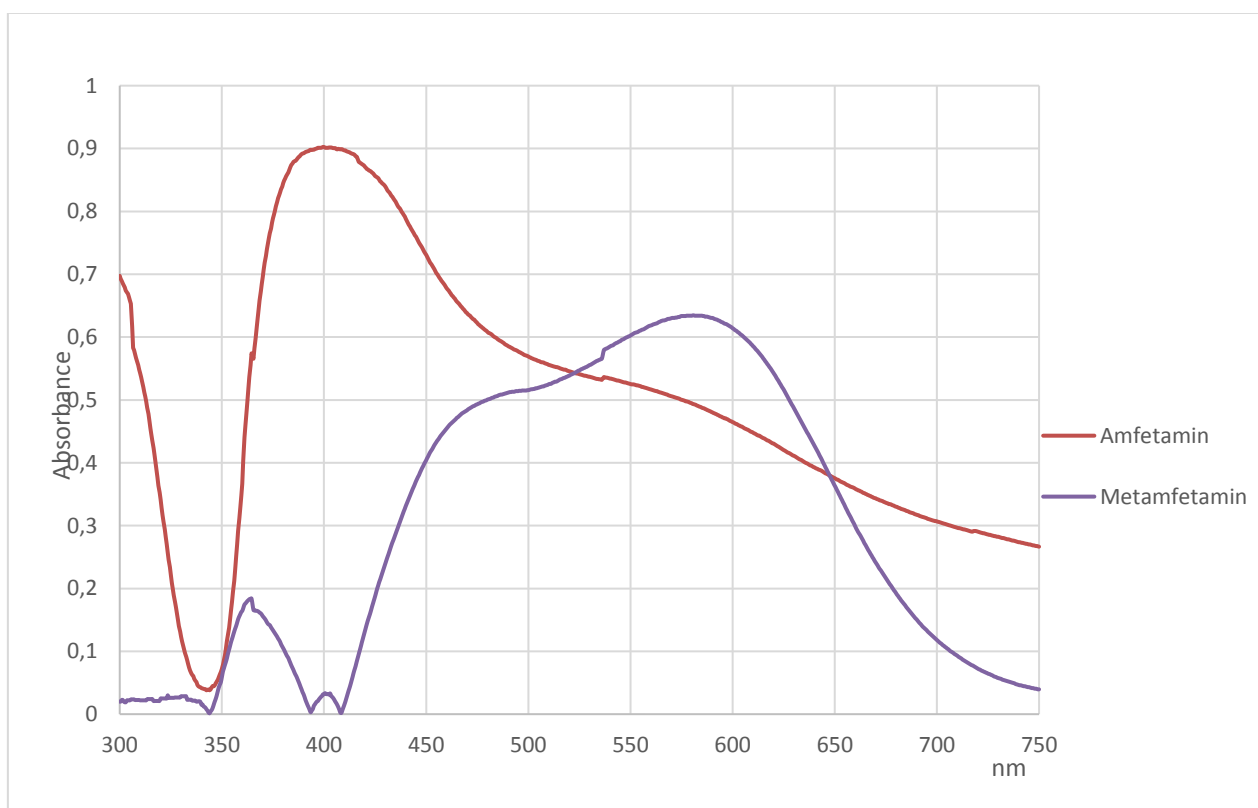
Obrázek 35- Na levém obrázku je poukázáno charakteristické zbarvení reakce amfetaminu se Simonsovým činidlem obsahující acetaldehyd, na pravém obrázku je barevný přechod po 5 minutách od reakce.

Tabulka č. 7. Citlivost Simonsova testu na sekundární aminy (zde pro methamfetamin)

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ne
0,05 mg	Ne

Tabulka č. 8. Citlivost Simonsova testu na primární aminy (zde pro amfetamin)

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ano
0,05 mg	Ano
0,025 mg	Ne
0,0125 mg	Ne



Obrázek 36- UV-VIS spektrum amfetaminu a methamfetaminu po reakci se Simonsovým činidlem a jejich srovnání mezi sebou

V experimentální části byla vyzkoušena a otestována nová příprava činidla pro sekundární aminy. První činidlo bylo připraveno z 2 % (v/v) roztoku acetaldehydu, vody a 5 % (w/v) hydrogenuhličitanu sodného, a druhý komponent obsahoval pouze 2 % (w/v) roztok nitroprussidu sodného. Tato kombinace nám zajistila delší stabilitu

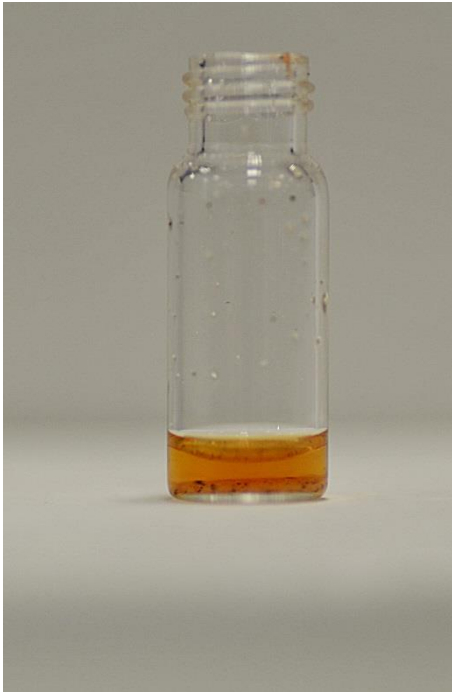
vzniklého produktu, který na rozdíl od standartního použití jednotlivých činidel, vydržel nezměněn 3 dny, a následně přecházel pouze do tmavě fialové barvy. Po dalších 5 dnech nastala změna ve hnědě zbarvený roztok, podobně jako při běžném použití činidla, jak je uvedeno výše. Tento způsob lze aplikovat i pro kapkovou detekci sekundárních aminů. Na hodinovém sklíčku byla vyzkoušena reakce methamfetaminu s činidly a výsledný produkt uschován v lednici. Po 3 dnech byla na hodinovém sklíčku pozorována barvená změna do hněda.

Stejný postup přípravy činidel byl proveden i pro primární aminy, avšak stabilita produktu reakce nebyla tak vysoká, jako tomu bylo v případě sekundárních aminů. Pozvolné přecházení barev bylo pozorováno po 30 minutách.

2.6 Test na přítomnost kanabinoidů

Fast Blue B byl v poměru 1:100 (*w/w*) smíchán s bezvodým síranem sodným, který fungoval jako nosič barviva. V bazickém prostředí reagovalo činidlo za vzniku roztoku oranžové barvy. Obdobně reagovalo THC i s Fast Garnet GBC do světle červeného zbarvení (viz Obr. č. 37). Jestliže byly smíchány pouze činidla, výsledný roztok byl čirý.

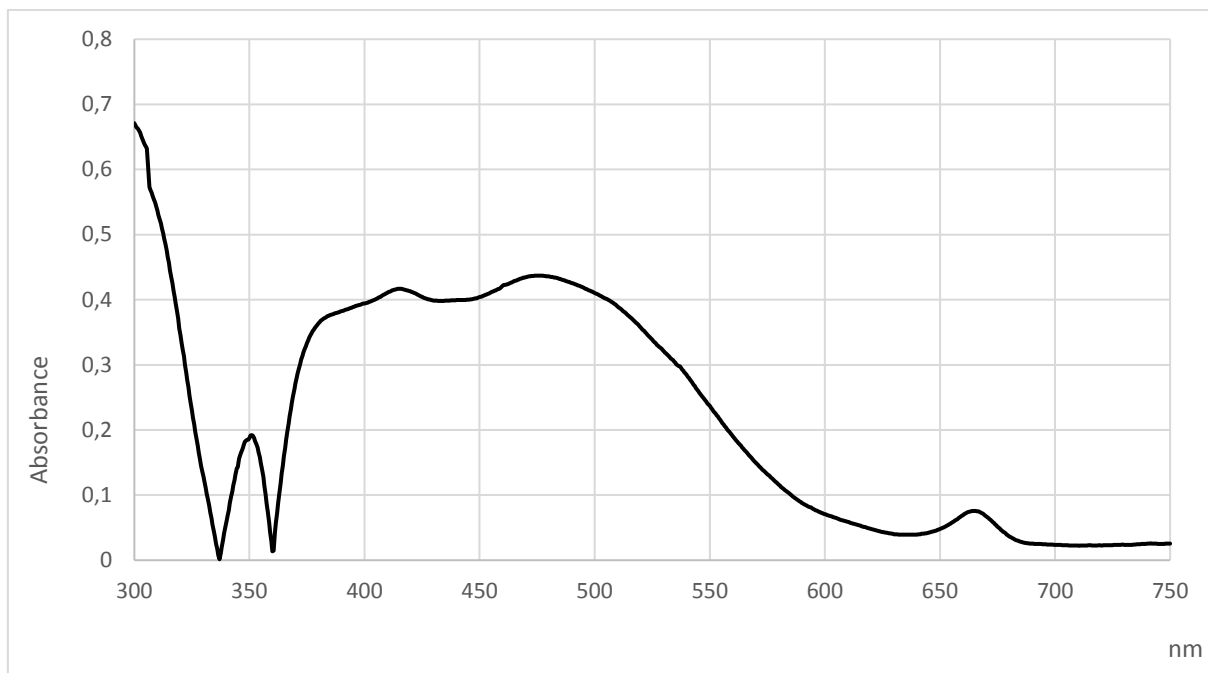
Jednotlivá série pro stanovení citlivosti byla připravena odpařením standardu THC v methanolu pod slabým proudem dusíku bez zahřívání, aby nedocházelo k rozkladu THC. Jednotlivé vzorky podrobeny reakcí s Fast Blue B a Fast Garnet GBC. Činidla byla testována po dobu 5 měsíců a vykazovala stabilní výsledky. Citlivost testu na přítomnost kanabinoidů resp. THC je shrnuta v tabulce č. 9. Z ní je patrné, že tento test vykazuje značnou citlivost, neboť i při množství 0,0125 mg THC docházelo k barvené změně, tedy pozitivnímu výsledku testu. Pro účely měření UV-VIS spektra výsledného produktu byl použit standard vzorku THC, kde pro slepý pokus byla použit pouze směs Fast Blue B činidlem. UV-VIS spektrum je vyobrazeno na Obr. č. 38. Ze spektra je možné odečíst, že absorpční maximum výsledného produktu má maximum při vlnové délce 479 nm.



Obrázek 37- Srovnání barev reakcí na detekci THC, na levém obrázku je reakce THC s Fast Blue B Salt činidlem, na pravém obrázku charakteristická barva reakce THC s Fast Garnet GBC.

Tabulka č. 9. Citlivost testu na THC

Množství substance	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ano
0,075 mg	Ano
0,05 mg	Ano
0,025 mg	Ano
0,0125 mg	Ano
0,0050 mg	Ne



Obrázek 38- UV-VIS spektrum vzniklého produktu po reakci THC s Fast Blue B činidlem

2.7 Liebermannův test

Na tento test jsme použili α -methylbenzylamin, synefrin a selegilin. Jednotlivé vzorky poskytly různé zbarvení roztoků. Methylbenzylamin reagoval s činidlem za vzniku krvavě zbarveného roztoku, ve kterém se vysrážely zlaté sraženiny, synefrin se po reakci zbarvil do hněda, a selegilin reagoval do červené barvy. Test se používá hlavně k rozdělení aminů na primární sekundární a terciální a může posloužit jako pomoc při následné analýze vzorku. Hlavní nevýhodou tohoto testu je fakt, že činidlo nesmí být starší než 2 měsíce. Citlivost Liebermannova testu je shrnuta v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10. Citlivost Liebermannova testu pro sekundární aminy (zde konkrétně pro synefrin)

Množství substance	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ne

2.8 Dille – Koppányi test: Detekce barbiturátů

Při tomto testu bylo smícháno 1 mg standardu allobarbitalu s jednotlivými činidly vždy po 150 μ l. Výsledkem reakce byla prokázána změna barvy roztoku, který změnil zbarvení ze světle modré na fialovou (Obr. 39). Totéž bylo provedeno pro 1 mg standardů

aprobarbitalu

a hexobarbitalu. Samotná reakce a její mechanismus je popsána v kapitole 1.3.2. Test se dá použít pouze do množství vzorku 0,5 mg, a v důsledku této relativně vysoké hodnoty se jedná o nepříliš necitlivý test.

Navíc jednotlivé barbituráty nelze pomocí tohoto testu rozlišit. Všechny standardy barbiturátů indikovaly stejné zbarvení po reakci s činidlem. Test lze použít pouze pro přítomnost barbiturátu, nelze však určit, o jaký konkrétně jde. Jednotlivá činidla jsou stabilní po dobu 8 měsíců.

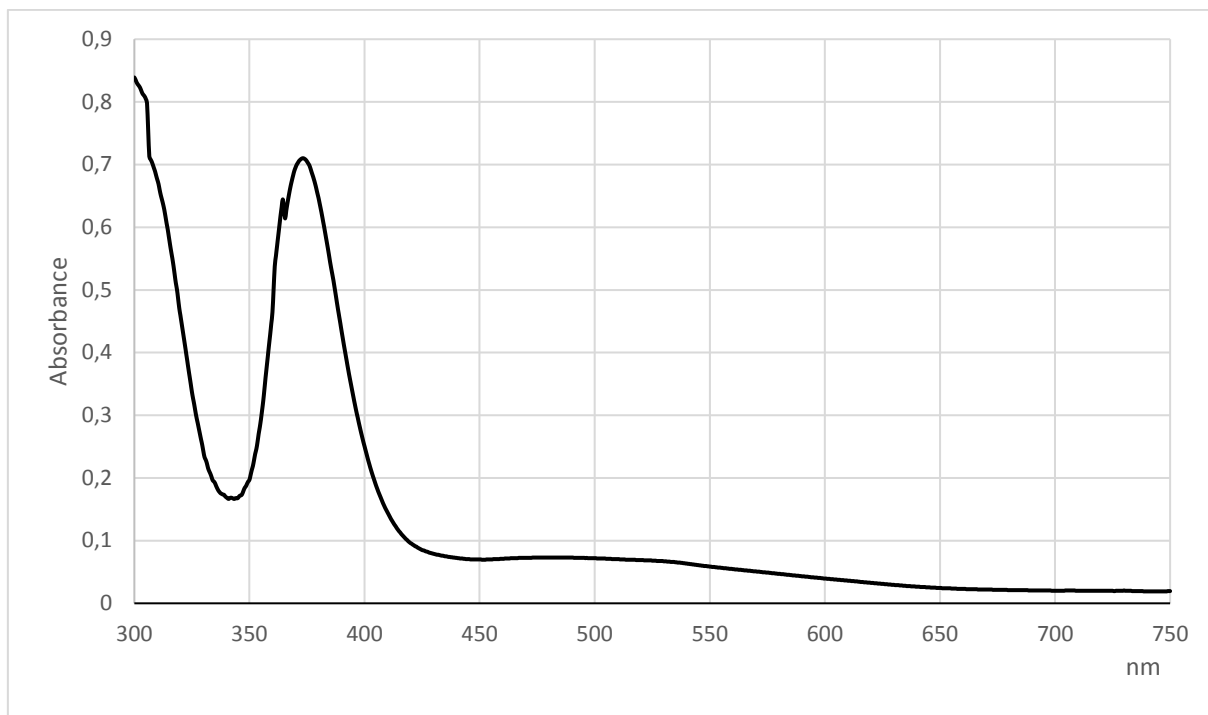
Pro účely změření UV-VIS spektra výsledného produktu byl použit standard vzorku allobarbitalu, kde pro slepý pokus byla použita směs Dille-Koppanyiových činidel. UV-VIS spektrum je vyobrazeno na Obr. č. 40. Ze spektra je možné vyčíst, že absorpční maximum výsledného produktu má maximum při vlnové délce 376 nm. Citlivost testu je shrnuta v tabulce č. 11.



Obrázek 39- Reakce Dille – Koppanyi činidla s allobarbitalem

Tabulka č. 11. Citlivost Dille-Koppanyi testu zde testováno pro allobarbital

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ne
0,10 mg	Ne



Obrázek 40-UV-VIS spektrum po reakci allobarbitalu s Dille-Koppanyiovým činidlem

2.9 Zwikkerův test: Detekce barbiturátů

Ačkoliv je v dnešní době stále méně používán, v experimentální části byly testovány jednotlivé standardy s činidly. Množství 0,5 mg allobarbitalu reagovalo s činidly za vzniku gelu světle fialové až růžové barvy (obr. 41). Tento gel je stabilní a nerozkládá se ani po 3 dnech. Stejně jako v případě Dille-Koppanyi testu, nelze barbituráty od sebe odlišit. Metoda je opět poměrně málo citlivá pro identifikaci barbiturátů pod 0,5 mg (viz Tabulka č. 12).

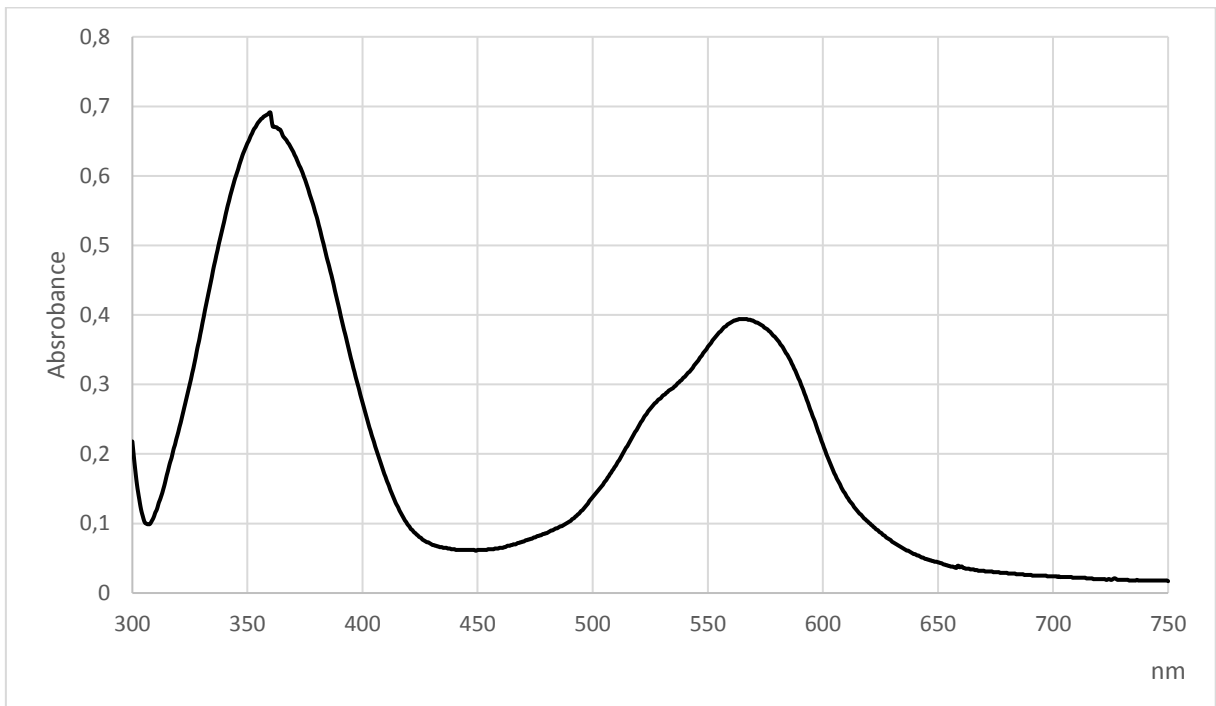
Pro účely změření UV-VIS spektra výsledného produktu byl použit allobarbitál, kde pro slepý pokus bylo použito pouze Dille-Koppanyiovo činidlo. UV-VIS spektrum je zobrazeno na Obr. č. 42. Ze spektra je možné vyčíst, že absorpční maximum výsledného produktu má maximum při vlnové délce 351 nm.



Obrázek 41- Reakce Zwikkerova činidla s hexobarbitalem

Tabulka č. 12. Citlivost Zwikkerova testu (zde testováno pro hexobarbital)

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ne
0,10 mg	Ne

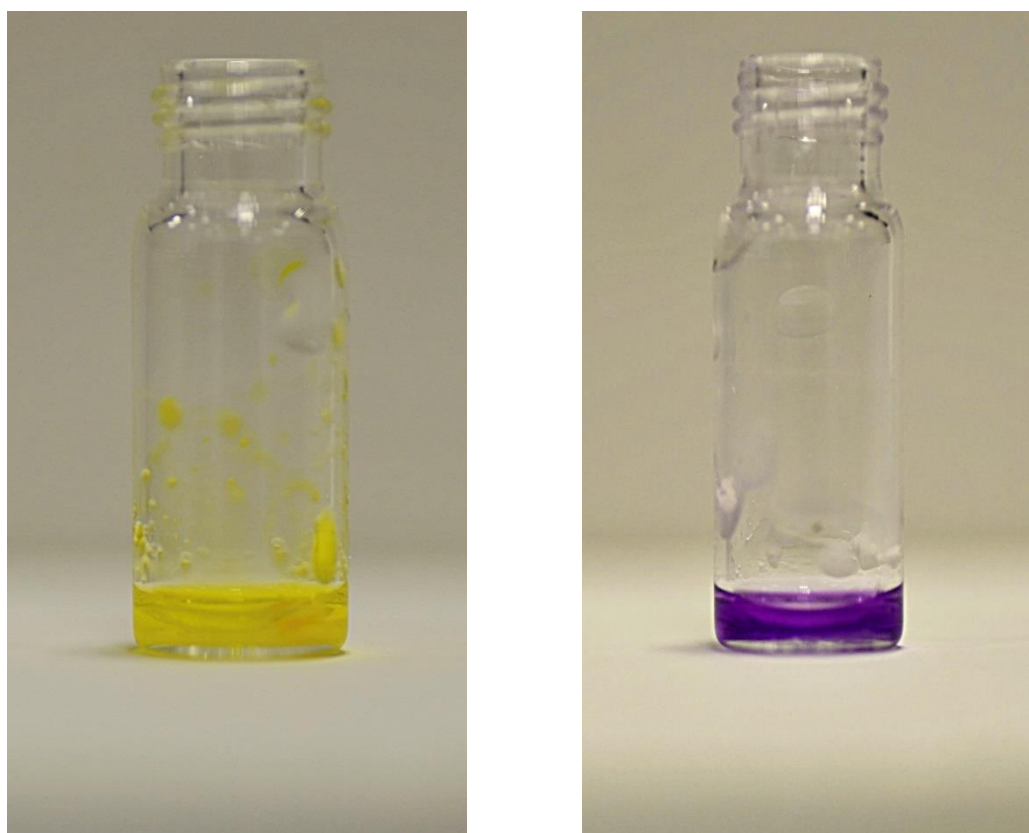


Obrázek 42-UV-VIS spektrum allobarbitalu po reakce s Zwikkerovým činidlem

2.10 Ehrlichův test: Detekce LSD, Kodeinu

Tento test je především využíván pro identifikaci indolových alkaloidů a návykových látek jako např. DMT, LSD nebo látky odvozené od struktury ergotaminu. Rovněž je možné jej využít jako relativně selektivní test na přítomnost kodeinu. Dále je test využíván pro detekci kyseliny anthranilové, která je legislativně kontrolovaným prekurzorem, který slouží k výrobě methamfetaminu. Anthranilová kyselina reaguje s Ehrlichovým činidlem, které obsahuje koncentrovanou 37 % kyselinou chlorovodíkovou a *p*-dimethylaminobenzaldehyd. Výsledným produktem je žlutá sraženina. Dojde-li k záměně koncentrované kyseliny za zředěnou kyselinu, vzniká oranžově zbarvený roztok. Při použití látek obsahující ve své molekule indolový skelet vzniká fialové zbarvení (Obr. 43).

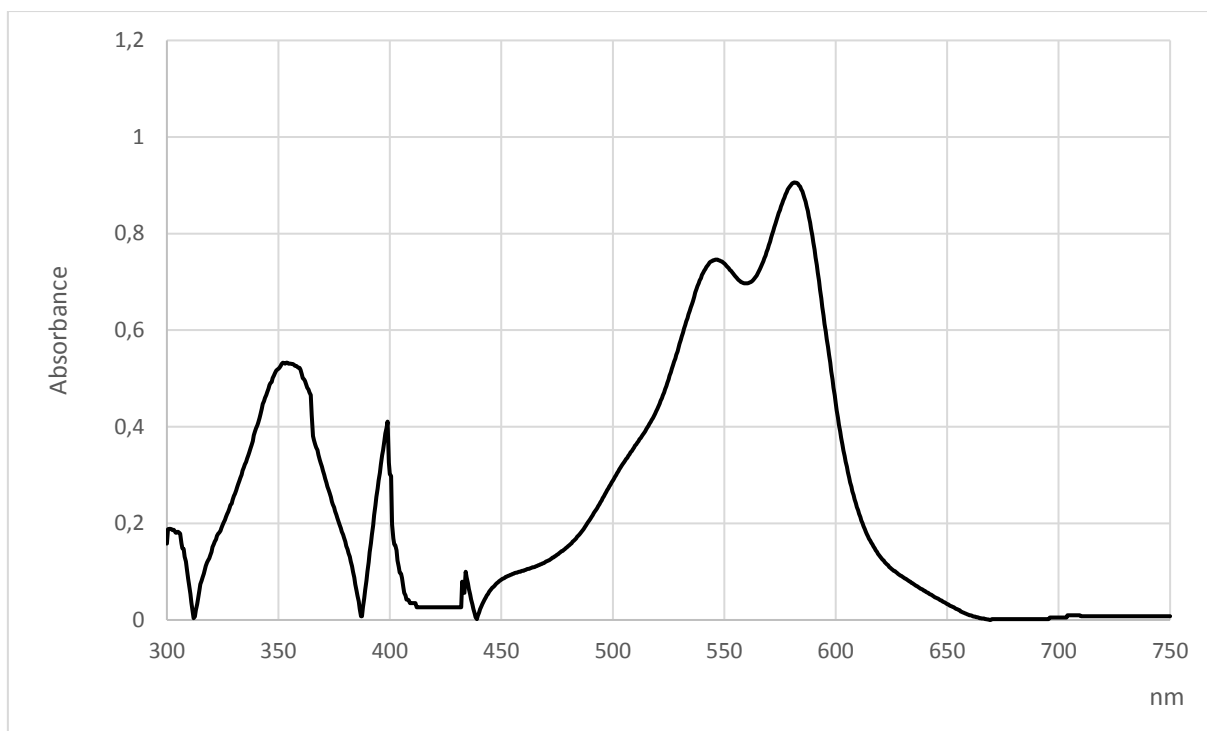
Pro účely změření UV-VIS spektra konečného produktu reakce byl použit ergotamin. Pro slepý pokus bylo použito Ehrlichovo činidlo. Z UV-VIS spektra, které je zobrazeno na Obr. č. 44 je možné odečíst, že absorpční maximum konečných produktů má maximum při vlnové délce 585 nm. Citlivost testu na přítomnost LSD a kodeinu je shrnuta v tabulce č. 13.



Obrázek 43- Porovnání barev, zleva: Anthranilová kyselina, Ergotamin po reakci s Ehrlichovým činidlem

Tabulka č. 13. Citlivost Ehrlichova testu

Množství kyseliny anthranilové v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ne
0,10 mg	Ne



Obrázek 44-UV-VIS spektrum ergothamínu po reakci s Ehrlichovým činidlem

2.11 Modifikovaný Scottův test: Detekce kokainu a ketaminu

Výhodou tohoto testu je fakt, že lze použít i vodné roztoky vzorku. Při reakci činidla s ketaminem, dochází ke vzniku levandulového zbarvení roztoku. Jestliže indikátor reagoval se zolpidemem přechází bezbarvý roztok do světle modrého zbarvení (Obr. 45).

Test lze použít i pro detekci kokainu, kdy výsledné zbarvení poukazuje, o jakou formu kokainu se jedná. Jestliže vzniklý produkt obsahuje modrou sraženinu v růžovém roztoku, jedná se o hydrochlorid kokainu.

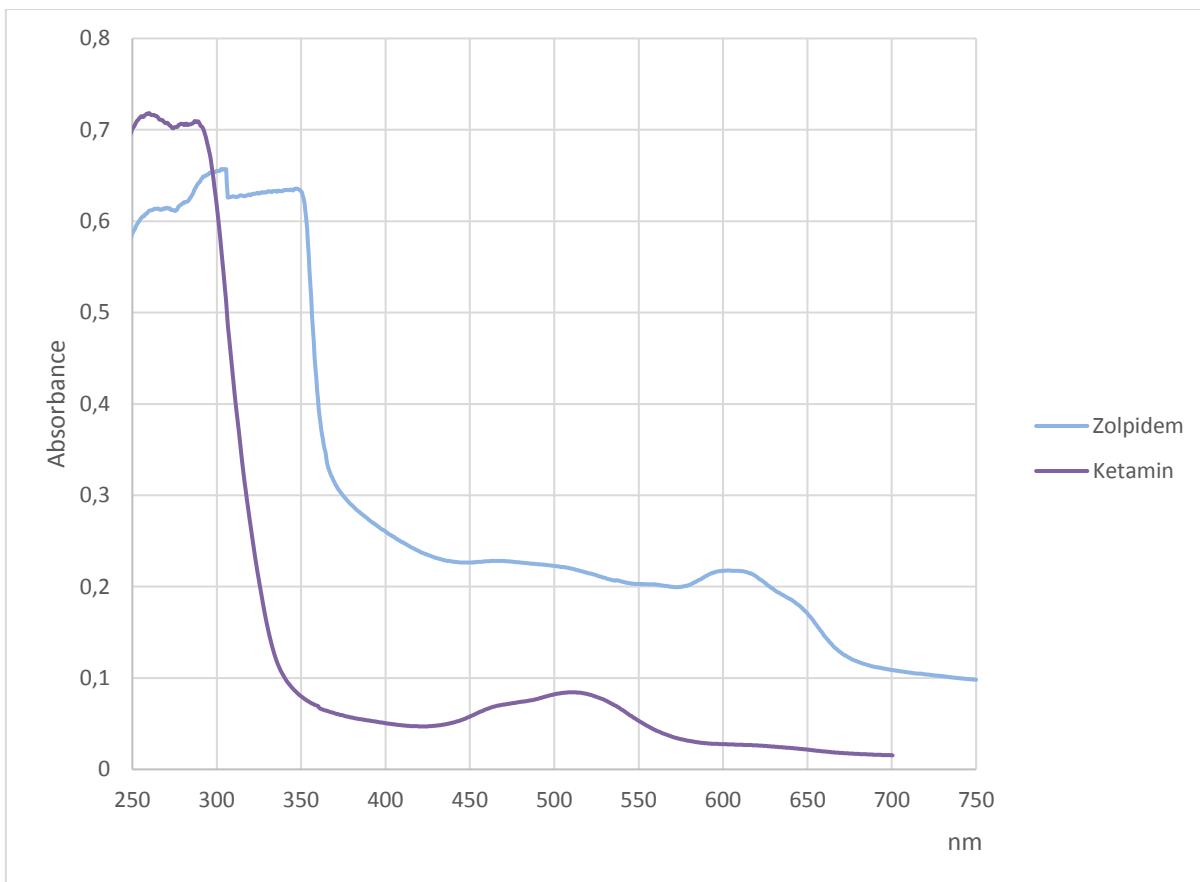
Následovně byly připraveny vzorky pro měření UV-VIS spekter výsledných produktů. Jako slepý vzorek, bylo použito Scottovo činidlo. UV-VIS spektrum je zobrazeno na obr. č. 46. Ze spekter je možné zpozorovat, že jejich absorpční maxima obou zmíněných látek, konkrétně zolpidem má při vlnové délce 305 nm, ketamin při 264 nm. Citlivost modifikovaného Scottova testu je shrnuta v tabulce č. 14.



Obrázek 45-Porovnání zbarvení po reakci se Scottovým modifikovaným činidlem, zleva: zolpidem a ketamin po reakci s činidlem

Tabulka č. 14. Citlivost modifikovaného Scottova testu na ketamin

Množství v roztoku	Pozitivní reakce
0,5 mg	Ano
0,25 mg	Ano
0,10 mg	Ano
0,05 mg	Ne



Obrázek 46-UV-VIS spektrum zolpidemu a ketaminu po reakci se Scottovým modifikovaným činidlem a jejich srovnání mezi sebou

3 Výsledky a diskuze

Efedriny a pseudoefedriny byly identifikovány reakcí s Chen-Kao činidlem. Nevýhodou testu je nemožnost vzájemného odlišení efedrinu od pseudoefedrinu. V případech, kdy není toto rozlišení potřebné, považujeme tento test za relativně citlivý. Citlivost testu se pohybuje okolo 0,1 mg (viz Tabulka č. 2).

Benzodiazepiny byly identifikovány Zimmermannovým testem. Relativní nevýhodou této metody je detekce benzodiazepinů s danou skupinou v poloze C₃, avšak neprokázaly zbarvení. S vědomím si této změny zbarvení jsme schopni zpětně určit druh původního BZD. Některé produkty nových syntetických benzodiazepinů (viz Tabulka č. 6) vykazovaly vysokou stabilitu.

Primární a sekundární aminy (studovány byly amfetamin resp. metamfetamin) byly testovány Simsonovým testem a Liebermannovým testem. V případě primárních aminů (amfetamin) byla prokázána citlivost do množství 0,05 mg, pro sekundární aminy (metamfetamin) se citlivost pohybovala okolo 0,25 mg. Produkty reakce amfetaminu s uvedenými činidly nebyly příliš stabilní. Příslušný produkt reakce se Simonsovým činidlem přecházel do tmavě červené sraženiny a po následujících 3 minutách změnil zbarvení na černo – hnědé. Liebermannův test pro detekce primárních, sekundárních a terciárních aminů se užívá k rozlišení jednotlivých aminů; v práci byla hodnocena jeho detekční citlivost pro synefrin a byla prokázána pozitivita až do množství 0,25 mg.

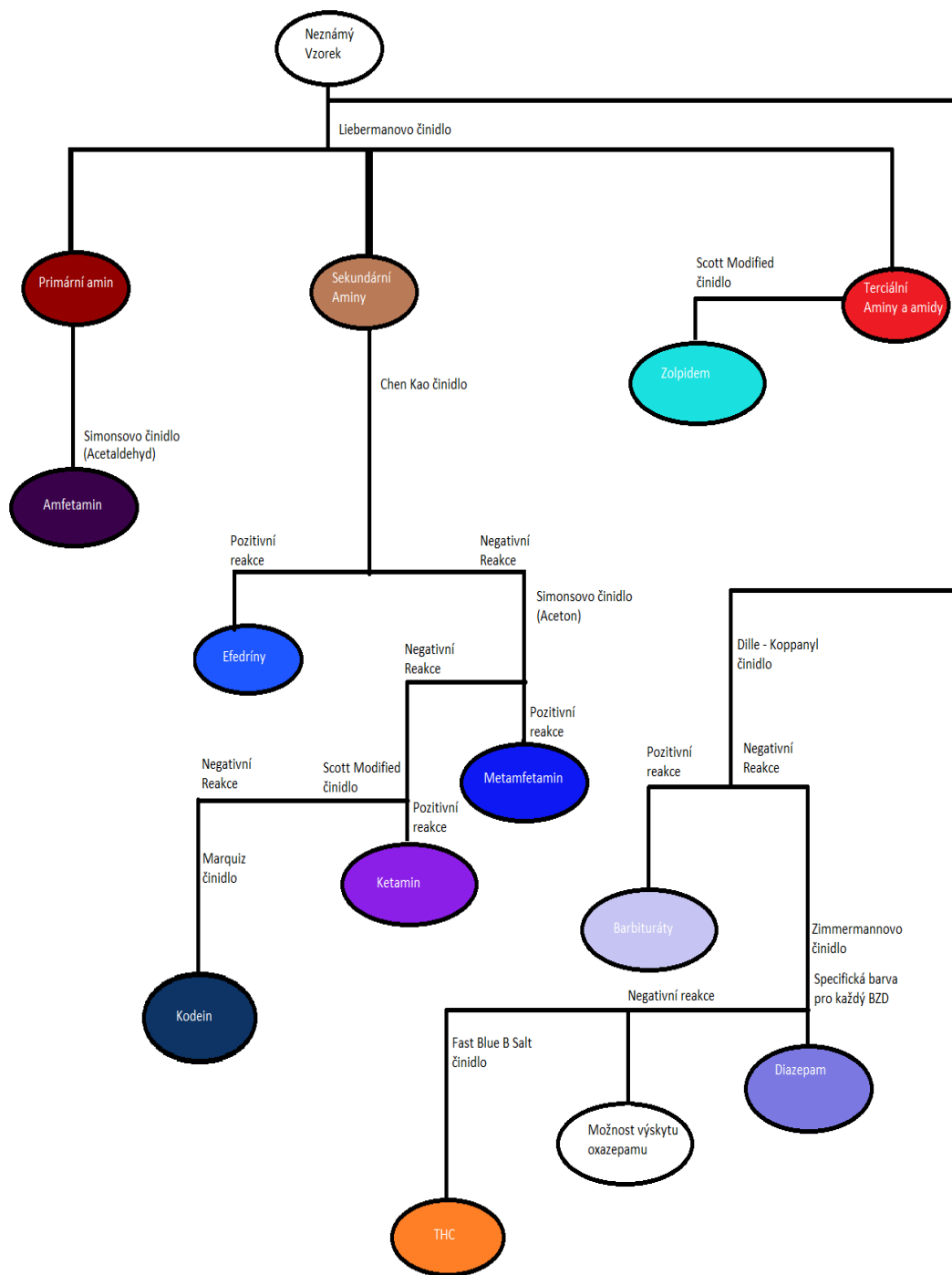
Kanabinoidy byly testovány smísením s činidly Fast Blue B a Fast Garnet GBC. Test na identifikaci kanabinoidů vykazoval vysokou citlivost až do množství 0,0125 mg (viz Tabulka č. 9). Výrazně pozitivní informaci zjištěnou v průběhu testování byla relativně vysoká stálost činidla – až 5 měsíců, kdy činidlo při reakci s kanabinoidy poskytovalo stejné výsledky.

Detekce barbiturátů byla prováděná s pomocí Dille – Koppányiho a Zwickerova činidla. Dille – Koppányiho test neumožní rozlišit konkrétní typ barbiturátu. Ve všech testovaných vzorcích poskytovaly barbituráty stejná zbarvení a jednotlivé testy prokázaly podstatně nízkou míru detekce. Při Zwickerově testu vzniká těžko odstranitelný gel, který je nerozpustný ve vodě a činidlo je tak nevhodné pro důkladnější analýzu.

Průkaz LSD, kokainu, DMT, LSD a látek na bázi ergotaminu byl prováděn Ehrlichovým testem. Pro účely UV-VIS spektra byla použita anthranilová kyselina, pro slepý vzorek Ehrlichovo činidlo. Citlivost testu byla relativně nízká, pouze do množství 0,5 mg.

Ketamin a zolpidem byly testovány pomocí modifikovaného Scottova testu. Při detekci ketaminu je výhodou, že test je možné uskutečnit ve vodném prostředí, a dá se tedy využít, aniž by se voda musela odstranit. Při použití nemodifikovaného Scottova činidla pro detekci kokainu lze prokázat, zda se jedná o kokain ve formě volné báze nebo o hydrochlorid, na základě výsledného zbarvení roztoku: modrá sraženina v růžovém roztoku je průkazem kokainu, modrá sraženina v roztoku modré barvy jsou charakteristické pro hydrochlorid kokainu. Světle modré zbarvení produktu je průkazem zolpidemu. Nejcitlivější bylo modifikované Scottovo činidlo především pro ketamin, kdy je možný průkaz ketaminu a to až ke koncentraci 0,10 mg.

Byl vypracován obecný postup analýzy neznámého vzorku v praxi s využitím popsaných činidel spolu s jejich specifickými zbarveními vzniklých produktů (Obr. č. 47).



Obrázek 47-Obecný postup při analýze neznámého vzorku při použití vybraných činidel uvedeny v bakalářské práci

4 Závěr

Práce se zabývá vyhodnocením semikvalitativních metod pro vybrané návykové látky a jejich prekurzory. Současně byla studována stálost jednotlivých činidel a stálost produktu (zbarvení, změna skupenství apod.) produktu výsledné reakce. Vzhledem k dostupnosti a prevalenci užívání návykových látek je možno konstatovat, že takové jednoduché kvalitativní či semikvantitativní hodnocení může doplňovat základní výbavu represivních složek, např. policie v rámci dopravních kontrol či kontrol osob, ochranky letišť nebo Celní správy. Tyto orgány pak mohou v případě pozitivních výsledků s předstihem zahájit první úkony v předběžném řízení, a současně směřovat forenzní laboratoře k cílenému vyhodnocení vybraného spektra látek. Uvedené studované reakce je nutno považovat pouze za orientační testy. Průkaz přítomnosti konkrétních látek je nutné konfirmovat některou z instrumentálních metod (např. infračervenou spektrometrií, kapalinovou či plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií aj.), rovněž je možné těmito technikami provést i případnou kvantitativní analýzu.

5 Literatura

1. Welliver, M., *Receptor theory and its role in drug therapy*. Gastroenterol Nurs, 2013. **36**(4): p. 283-5.
2. Griffin, C.E., 3rd, et al., *Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects*. Ochsner J, 2013. **13**(2): p. 214-23.
3. Lieberman, J.A. and A. Tasman, *Handbook of psychiatric drugs*. 2006, Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xviii, 264 p.
4. Stolerman, I.P., *Encyclopedia of psychopharmacology*. 2010, Berlin ; London: Springer. 2 v.
5. Karch, S.B., *Drug abuse handbook*. 2nd ed. 2007, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis. 1267 p.
6. Brandenberger, H. and R.A.A. Maes, *Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists*. 1997: W. de Gruyter.
7. Catanese, C., *Color Atlas of Forensic Medicine and Pathology, Second Edition*. 2016: CRC Press.
8. Hynie, S., *Speciální Farmakologie Vol. 2*. 2000, Praha: Nakladatelství Karolinum.
9. Dostálek, M., *Farmakokinetika*. 2006, Praha: Grada.
10. Martínková, J., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2007, Praha: Grada.
11. Lüllmann, H., *Color atlas of pharmacology*. 4th ed. 2011, Stuttgart: Thieme. x, 393 p.
12. Ladd, M.A., P.N. Fitzsimmons, and J.W. Nichols, *Optimization of a UDP-glucuronosyltransferase assay for trout liver S9 fractions: activity enhancement by alamethicin, a pore-forming peptide*. Xenobiotica, 2016. **46**(12): p. 1066-1075.
13. Karl-Artur Kovar, M.L., *Chemistry and Reaction Mechanisms of Rapid Tests for Drugs of Abuse and Precursors Chemicals*. 1989: p. 1-16.
14. Suzuki, O. and K. Watanabe, *Drugs and Poisons in Humans: A Handbook of Practical Analysis*. 2006: Springer Berlin Heidelberg.
15. Aysem Üzer, E.E., Resat Apak, *Selective spectrophotometric determination of trinitrotoluene, trinitrophenol, dinitrophenol and mononitrophenol*. 2004(Volume 505, Issue 1): p. 11.
16. Cookson, J., J.L. Crammer, and B. Heine, *The use of drugs in psychiatry*. 4th ed. 1993, London
17. O'Neal, C.L., D.J. Crouch, and A.A. Fatah, *Validation of twelve chemical spot tests for the detection of drugs of abuse*. Forensic Science International, 2000. **109**(3): p. 189-201.
18. de Faubert Maunder, M.J., *An improved field test for barbiturates and hydantoins with a modified cobalt (II) thiocyanate reagent*. Analyst, 1975. **100**(1197): p. 878-83.
19. Maisto, S.A., M. Galizio, and G.J. Connors, *Drug use and abuse*. 6th ed. 2011, Belmont, CA: Wadsworth. xiii, 494 p.
20. Gábor Nagy, I.S.a.K.S., *Colour Test for Precursor Chemicals of Amphetamine-Type Substances*. 2005: p. 1-15.
21. World Health Organization., *Neuroscience of psychoactive substance use and dependence*. 2004, Geneva: World Health Organization. xx, 264 p.
22. Rohrich, J., et al., *Detection of Delta(9)-Tetrahydrocannabinol and Amphetamine-Type Stimulants in Oral Fluid Using the Rapid Stat (TM) Point-of-Collection Drug-Testing Device*. Journal of Analytical Toxicology, 2010. **34**(3): p. 155-161.

23. Faubertmaunder, M.J.D., *Field and Laboratory Tests for Raw and Prepared Opium*. Bulletin on Narcotics, 1975. **27**(1): p. 71-76.
24. Choodum, A. and N.N. Daeid, *Rapid and semi-quantitative presumptive tests for opiate drugs*. Talanta, 2011. **86**: p. 284-92.
25. Maunder, M.J.D., *2 Simple Colour Tests for Cannabis*. Bulletin on Narcotics, 1969. **21**(4): p. 37-42.
26. Kiraly, D.D., et al., *Altered peripheral immune profiles in treatment-resistant depression: response to ketamine and prediction of treatment outcome*. Transl Psychiatry, 2017. **7**(3): p. e1065.
27. Morris, J.A., *Modified cobalt thiocyanate presumptive color test for ketamine hydrochloride*. Journal of Forensic Sciences, 2007. **52**(1): p. 84-87.
28. Tsujikawa, K., et al., *Development of a new field-test procedure for cocaine*. Forensic Science International, 2017. **270**: p. 267-274

6 Seznam zkratek

Zkratka	Termín
ADHD	onemocnění s poruchou pozornostní funkcí „Attention Deficit Hyperactivity Disorder“
ATP	Adenosintrifosfát
Aj.	a jiné
BZD	Benzodiazepin
CB	Kanabinoidní receptory
CNS	Centrální nervová soustava
CYP	Cytochrom
Da	Dalton
DMT	<i>N,N</i> -Dimethyltryptamin
GABA	γ -aminomáselná kyselina
HCl	Kyselina chlorovodíková
HI	Kyselina jodovodíková
LSD	Diethylamid kyseliny lysergové
MDMA	3,4-methylen-dioxymetamfetamin
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -asparagová kyselina
ORL	Otorhinolaryngologie
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
REM	fáze spánku s rychlými očními pohyby „Rapid eyes movements“
RPM	Počet otáček za minutu
THC	Tetrahydrokanabinol
UDP	Uridindifosfát