

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



Využití elektroanalytických technik pro studium elektrochemického chování a stanovení vybraných opioidů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Nikola Mikulová
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Radek Jerga
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2022

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla 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 dne

Tímto chci poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost jak při sepisování této práce, tak během experimentální činnosti. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Radku Jergovi za veškerou pomoc při práci v laboratoři, a především za jeho trpělivost. V neposlední řadě chci poděkovat doc. RNDr. Jakubovi Stýskalovi, Ph.D. a doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D. za provedená měření na LC-MS (QDA) a dále Mgr. Monice Zajacové Cechové, Ph.D. za provedená měření na LC-MS (Cyclic IMS).

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).

Bibliografická identifikace

Autor	Bc. Nikola Mikulová
Název práce	Využití elektroanalytických technik pro studium elektrochemického chování a stanovení vybraných opioidů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Radek Jerga
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Diplomová práce se zabývá analýzou vybraných opioidů - morfinu, kodeinu a heroinu. Elektrolýza za konstantního potenciálu byla provedena v různých elektrolytech (octan amonný a mravenčan amonný o různém pH) a na různých pracovních elektrodách (platinové síťkové elektrodě a na elektrodě ze svazku uhlíkových vláken). Elektrolyzované roztoky byly následně analyzovány pomocí LC-MS s ESI ionizací v pozitivním módu. Z výsledků elektrolýzy v octanu amonném o pH = 3 bylo navrženo schéma elektrochemické oxidace morfinu s dihydroxymorfinem jako hlavním produktem. Při vývoji HPLC metody s UV a coulometrickou detekcí byla nalezena jako nejvhodnější silikagelová stacionární fáze modifikovaná kyanoskupinami, jako mobilní fáze směs ACN:NaH₂PO₄ v poměru 20:80 a detekční podmínky 210 nm pro UV a 900 mV pro elektrochemickou detekci. Kalibrační závislosti daných opioidů byly lineární v rozsahu 2,5–50 μmol/l na obou detektorech, s výjimkou morfinu na elektrochemickém detektoru, kde je lineární rozsah 2,5–40 μmol/l. Meze detekce v μmol/l jsou pro morfin 0,29 na UV a 0,66 na ECD, pro kodein 0,32 na UV a 1,00 na ECD a pro heroin 0,39 na UV a 0,90 na ECD. Metoda byla úspěšně použita pro analýzu vzorků krevního séra a moči.</p>
Klíčová slova	morfin, kodein, heroin, opioidy, mechanismus oxidace, HPLC, voltametrie
Počet stran	61
Jazyk	Český

Bibliographic identification

Author	Bc. Nikola Mikulová
Title	Application of electroanalytical techniques for the study of electrochemical behaviour and determination of selected opioids
Type of thesis	Master's
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Radek Jerga
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The master's thesis is focused on the analysis of three opioids - morphine, codeine, and heroin. Electrolysis at constant potential was performed in different electrolytes (ammonium acetate and ammonium formate at different pH) and on different working electrodes (platinum mesh electrode and carbon fibre brush electrode). Electrolysed solutions were analysed using the LC-MS with positive ESI ionization. Results from the electrolysis in ammonium acetate of pH = 3 were used to propose the mechanism of electrochemical oxidation of morphine with dihydroxymorphine as the main product. Most suitable conditions for the developed HPLC method with UV and coulometric detection were found to be cyano-silica stationary phase, mobile phase consisting of ACN:NaH₂PO₄ (20:80) and detection parameters were 210 nm for UV detection and 900 mV for electrochemical detection. Calibration dependencies of analysed opioids were linear in the range of 2.5-50 µmol/l on both detectors with the exception of morphine's linearity on electrochemical detector in the range of 2.5-40 µmol/l. Limits of detection in µmol/l are 0.29 on UV and 0.66 on EC detector, 0.32 on UV and 1.00 on EC detector, and 0.39 on UV and 0.90 on ECD for morphine, codeine, and heroine, respectively. The developed method was used for the analysis of real samples – blood serum and urine.</p>
Keywords	morphine, codeine, heroin, opioids, mechanism of oxidation, HPLC, voltammetry
Number of pages	61
Language	Czech

OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů	8
Seznam obrázků	9
Seznam příloh	9
Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Drogy.....	11
2.2 Opioidy.....	13
2.2.1 Historie opioidů.....	13
2.2.2 Dělení opioidů.....	14
2.2.3 Využití a intoxikace opioidy.....	15
2.3 Morfin	15
2.3.1 Základní informace	15
2.3.2 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti	17
2.3.3 Použití morfinu	17
2.4 Kodein	18
2.4.1 Základní informace	18
2.4.2 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti	18
2.4.3 Použití kodeinu	19
2.5 Heroin.....	19
2.5.1 Základní informace	19
2.5.2 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti	20
2.5.3 Použití heroinu	21
2.6 Metody stanovení opiátů	21
2.6.1 Geolokační analýza opiátů.....	22
2.6.2 Separační metody pro stanovení opiátů.....	22
2.6.3 Elektrochemické metody analýzy opiátů.....	24
3 Experimentální část	26
3.1 Přístrojové vybavení	26

3.2 Chemikálie.....	27
3.3 Použité pracovní postupy	27
3.3.1 Testování stability morfinu ve vodném roztoku	27
3.3.2 pH závislost.....	29
3.3.3 Extrakce kodeinu z tablet	30
3.3.4 Elektrolýza morfinu.....	30
3.3.5 HPLC analýza	32
4 Výsledky a diskuze.....	34
4.1 Testování stability morfinu ve vodném roztoku.....	34
4.2 DPV závislost na pH.....	36
4.3 Elektrolýzy	38
4.3.1 Volba vhodného prostředí pro elektrolýzu morfinu.....	39
4.3.2 Srovnání elektrolýzy v octanu amonném a mravenčanu amonném při různém pH.....	40
4.3.3 Pozorované produkty a navržené schéma elektrochemické oxidace morfinu v octanu amonném	40
4.4 HPLC analýza.....	43
4.4.1 Volba mobilní fáze.....	43
4.4.2 Hydrodynamické voltamogramy.....	44
4.4.3 Kalibrační závislosti	45
4.4.4 Analýza krevního séra	47
4.4.5 Analýza moči	49
5 Závěr.....	51
Seznam použité literatury	53

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BR pufr	Britton-Robinsonův pufr
CE	Kapilární elektroforéza
CEDIA	z angl. Cloned enzyme donor immunoassay
CFBE	Elektroda ze svazku uhlíkových vláken
CNS	Centrální nervový systém
DAD	Detektor diodového pole
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
ECD	Elektrochemický detektor
EIA	Enzymatický imunotest
ELISA	z angl. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
GC-MS/MS	Plynová chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KIMS	Kinetická interakce mikročástic v roztoku
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
LD50	Smrtelná dávka
LDR	Lineární dynamický rozsah
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
RIA	Radioimunoanalýza
SCE	Nasyčená kalomelová elektroda
SPE	Extrakce tuhou fází
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UV	Ultrafialová oblast

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Schéma absorpce, distribuce a eliminace drogy [1]	12
Obr. 2 - Struktura morfinu a morfinového skeletu s číslováním uhlíkových atomů, převzato z [23]	16
Obr. 3 - Zkrácené schéma biosyntézy morfinu v <i>Papaverum somniferum</i> . Převzato z [24]	16
Obr. 4 - Struktura kodeinu.....	18
Obr. 5 - Struktura heroínu, převzato z [42]	20
Obr. 6 - Voltamogramy získané metodou DPV při testování stability vodného roztoku morfinu...34	
Obr. 7 - Hmotnostní spektrum morfinu v kladném módu ESI+	35
Obr. 8 - Hmotnostní spektrum morfinu v negativním módu ESI-	35
Obr. 9 - UV-vis spektrum vodného roztoku morfinu.....	36
Obr. 10 - Závislost odezvy morfinu na pH elektrolytu	37
Obr. 11 - Voltamogram získaný metodou DPV pro vybrané hodnoty pH.....	37
Obr. 12 - Závislost odezvy heroínu na pH elektrolytu	38
Obr. 13 - Závislost odezvy kodeinu na pH elektrolytu	38
Obr. 14 - Navržené schéma elektrochemické oxidace morfinu ve vodném prostředí o pH = 3	42
Obr. 15 - Chromatogramy získané metodou HPLC pro MF ACN:NaH ₂ PO ₄ v poměru 20:80 pomocí UV detekce (A) a EC detekce (B).....	44
Obr. 16 - Hydrodynamické voltamogramy morfinu, kodeinu a heroínu získané EC detekcí na kanálu ECD1 (A) a kanálu ECD2 (B)	45
Obr. 17 - Graf kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroínu získaný pomocí UV detekce	46
Obr. 18 - Graf kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroínu získaný detekcí ECD1	46
Obr. 19 - Graf kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroínu získaný detekcí ECD2.....	46

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 - Typ závislosti při požívání konkrétní drogy a symptomy při jejím odnětí, převzato z [3]	57
Příloha 2 – Chromatogramy získané metodou HPLC pro MF ACN:NaH ₂ PO ₄ v poměru 10:90 pomocí UV detekce (A) a EC detekce (B)	58
Příloha 3 - Chromatogramy získané metodou HPLC pro MF ACN:NaH ₂ PO ₄ v poměru 15:85 pomocí UV detekce (A) a EC detekce (B).....	59
Příloha 4 – Chromatogramy získané metodou HPLC s UV detekcí (A) a detekcí ECD1 (B) při analýze krevního séra ve vzorku deproteinovaném acetonitrilem.....	60
Příloha 5 - Chromatogramy získané metodou HPLC s UV detekcí (A) a detekcí ECD1 (B) při stanovení opioidů v moči	61

ÚVOD

Opioidy jsou látky přírodního původu, které se získávají z nezralých makovic máku setého (*Papaver somniferum*). Jejich schopnost tlumit bolest byla objevena již před tisíci lety a již tehdy se staly důležitými přípravky v medicíně jako tzv. opium. Až v 19. století došlo k izolaci hlavního alkaloidu morfinu a postupně byly identifikovány další složky opia. Kromě přírodních opioidů z opia (např. morfin a kodein) se lze setkat i s polosyntetickými opioidy, které se připravují z přírodních. Jedná se například o známý heroin neboli diacetylmorfin. Opioidy však mohou být i zcela syntetické, ty jsou nejčastěji odvozeny od fenylpiperidinu, kdy nejznámější jsou fentanyl a jeho deriváty [1–3].

Jak již bylo zmíněno, opioidy našly uplatnění v medicíně, kde jsou využívány pro své analgetické účinky. Zásadním problémem těchto látek je skutečnost, že se v principu jedná o drogy, které mohou vyvolávat závislost. To je také jeden z důvodů, proč se historicky začalo upouštět od používání přírodního opia a z něj izolovaných a syntetizovaných látek a začaly se hledat alternativy v podobě syntetických opioidů, které mají mnohdy vyšší analgetický účinek, ale menší návykovost [4]. Přesto se i dnes můžeme setkat s morfinem, který je používán v lécích pro tlumení bolesti, nebo pro výrobu dalších opioidů, například kodeinu. S kodeinem se lze nejčastěji setkat v podobě tablet proti kašli. Samozřejmě však dochází i k zneužití těchto drog, ať již přímo, nebo v případě morfinu k přípravě heroinu, který je celosvětově nejrozšířenější ilegální drogou ze skupiny opioidů [2,5,6].

Použití opioidů v medicíně, ale i jejich nelegální zneužívání, vede k nutnosti umět tyto látky stanovit, a to především v biologických vzorcích, které představují komplexní matrice. Z tohoto důvodu jsou nejrozšířenějšími metodami jejich analýzy separační techniky, především HPLC s různými možnostmi detekce. Kromě běžně používaných hmotnostních spektrometrů a UV detektorů se jako vhodná alternativa jeví elektrochemické detektory. Jejich použití je možné díky tomu, že opioidy jsou obvykle elektrochemicky aktivní sloučeniny, což je také výhodou u komplexních matic, protože lze eliminovat velké množství elektrochemicky neaktivních nečistot ze vzorku, které tak nebudou rušit stanovení [7,8].

Cílem této práce bylo pomocí elektrolýzy za konstantního potenciálu a LC-MS analýzy reakčních produktů navrhnout průběh elektrochemické oxidace morfinu. Dalším cílem bylo vyvinout HPLC metodu pro stanovení morfinu, kodeinu a heroinu v biologických vzorcích s použitím UV a elektrochemické detekce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Drogy

Pojem droga může být definován různými způsoby. Obecně lze ale říct, že jde o přírodní nebo uměle vyrobenou látku, ovlivňující různé přirozené funkce organismu specifickým způsobem [1]. Takovéto látky jsou užívány za cílem například změny nálady, tedy duševního stavu (způsobují tzv. euforii), chování nebo také jak pro útlum, tak pro povzbuzení. Především pro uvedené vlastnosti jsou tyto látky nelegálně zneužívány [2,9]. Účinek drogy, který je u každého typu drogy odlišný, je vyvolán její vazbou nebo působením na konkrétní cílová místa v organismu, jako jsou např. receptory, iontové kanály, enzymy nebo neurotransmitery [1,10].

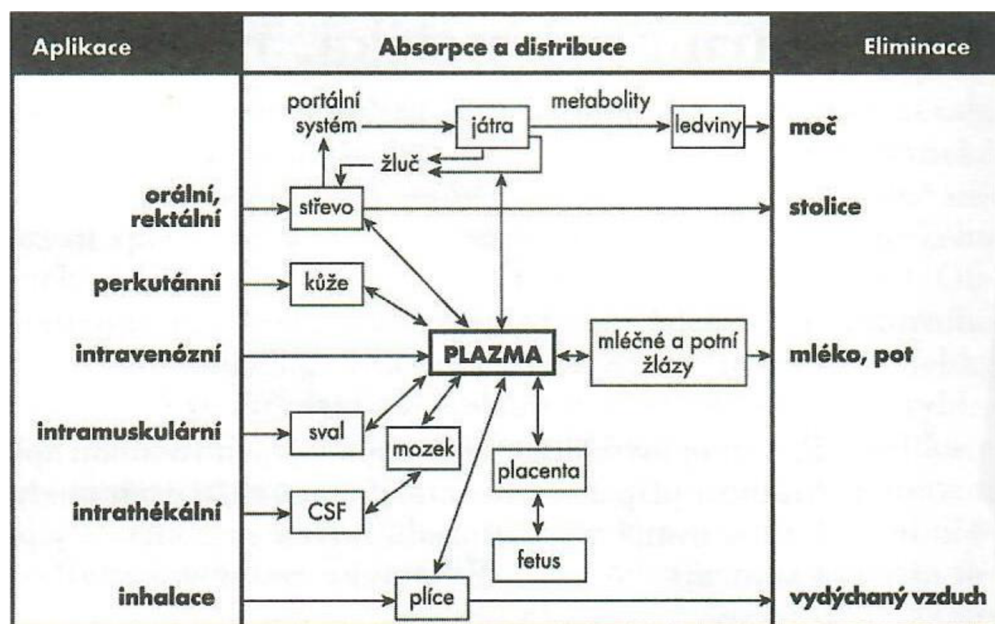
Klasifikovat drogy do skupin lze z několika různých hledisek, např. dle jejich původu na přírodní, syntetické a semisyntetické, dle jejich použití, dopadu na společnost, rizika pro uživatele atd. [11]. Ovšem nejčastěji se klasifikují na základě typu účinku. Z tohoto hlediska lze drogy rozdělit na analgetika (zmírňující bolest), halucinogeny (ovlivňující změny vnímání skutečnosti), opiáty (látky odvozené od opia působící tlumivě na CNS), stimulanty (navozující bdělost stimulací funkce CNS) a tlumivé látky [9,12].

Drogy se mohou vyskytovat v několika různých formách. Nejčastěji se s nimi můžeme setkat ve formě prášků, rostlinné hmoty, tablet, prekurzorů atd. [9]. S tím zároveň souvisí i způsob užívání drogy. Nejrizikovějším způsobem je injekční aplikace, při které je do krve dávkována nejen droga samotná, ale také všechny nežádoucí příměsi a velké množství bakterií, což může vést k infekčním onemocněním. Dalšími způsoby užívání jsou šňupání, kdy látka vstupuje do organismu přes nosní sliznici, případně inhalace a perorální aplikace [2,10].

Při opakovaném požití drogy vzniká drogová závislost. Tu lze definovat jako postupující a chronickou poruchu, tedy stav, při kterém má jedinec neustálou potřebu látku užívat opakovaně nebo ve větším množství [2]. Drogovou závislost lze dělit na psychickou a fyzickou. Psychická závislost se projevuje jako touha jedince drogu užívat opakovaně a znovu a znovu za cílem vyvolání příjemného pocitu uspokojení nebo pocitu štěstí. Fyzická závislost vzniká v případě, kdy si organismus vyvine toleranci k dané droze. V případě její náhlé nepřítomnosti poté organismus reaguje vážnými negativními projevy, jako jsou např. křeče, deprese, tachykardie, hypertenze, halucinace, kóma atd. [1]. Pro ukázkou

je v příloze 1 uveden přehled typů závislostí, včetně abstinčních příznaků, které vznikají po odnětí drogy. Závislost na drogách je velice závažný sociální problém a uživatelé drog jsou ohroženi jak možnou intoxikací, vznikem psychických poruch, infekčními onemocněními, tak různými úrazy, včetně těch způsobených u dopravních nehod [2].

Procesy, kterými je droga transportována a distribuována v organismu, lze rozdělit do tří fází, a to na absorpci, distribuci a metabolismus neboli eliminaci [1,13]. První, klíčová fáze, je absorpce. Aby droga mohla na organismus účinkovat, musí se nejdříve dostat do krevního oběhu a následně k cílovým orgánům. Rychlost a míra absorpce je velmi závislá na způsobu podání drogy. Velmi rychlá je například absorpce plicemi, zatímco absorpce orálně je poněkud pomalejší. Druhou fází je distribuce drogy v organismu, kdy po absorpci do krve je dále rozváděna do nejrůznějších orgánů a míst těla, což závisí na více faktorech, např. na polaritě a velikosti molekuly látky, na prokrvení jednotlivých tkání, na schopnosti jejího vázání na proteiny atd. Distribuce drogy v organismu se nejčastěji vyjadřuje distribučním objemem, který je vyjádřen jako podíl množství drogy v těle ku plazmatické koncentraci po dosažení distribuční rovnováhy. Třetí a poslední fází je eliminace. Ta může probíhat např. játry, kdy jsou látky vylučovány buď jako metabolity žlučí, nebo jaterními žilami, případně mohou být vylučovány v původní formě. Další možností je vylučování ledvinami, kdy jsou drogy vylučovány pomocí moči [1,2]. Schéma všech tří fází lze vidět na obr. 1.



Obr. 1 - Schéma absorpce, distribuce a eliminace drogy [1]

V současné době není podstatné stanovení a detekce drog pouze v organismu, ale neméně důležitá je taktéž detekce drog např. v odpadních vodách, detekce z pevných materiálů apod. V případě detekce přítomnosti drogy v biologických vzorcích při požití patří mezi velice důležité metody screeningové imunochemické, které jsou nejjednodušší a nejrychlejší cestou, jak prokázat přítomnost drogy v organismu. Takovéto testy mohou být realizovány pomocí jednoduchých pásků či destiček. Mezi imunochemické metody patří např. EIA, ELISA, RIA, KIMS, CEDIA a další [1]. Tyto metody však většinou musí být doplněny dalšími potvrzujícími metodami. Pro analýzu drog lze obecně využít např. také metodu GC-MS [14], případně GC-MS/MS [15], TLC [1], CE s UV excitovanou fluorescenční detekcí [16], HPLC s fluorescenční detekcí [17], využívají se také metody mikroskopické [18] a velmi zajímavé je také kolorimetrické stanovení drog [19,20].

2.2 Opioidy

2.2.1 Historie opioidů

Již od nepaměti se lidé snažili překonávat bolest. Už v dávných dobách naši předchůdci sledovali poraněná zvířata, která se snažila ulevit si od bolestivých stavů pomocí rostlin a jiných přírodních materiálů. Sledovali je, jak konzumují například nahrabanou hlínu nebo jíl. Naučili se tak využívat materiály s analgetickými účinky, zejména rostliny a důležité minerály, a to jak perorálně, tak lokálně v místě poranění. Velmi významné místo mezi těmito přírodními materiály mělo opium získané z nezralých makovic máku setého [1,3].

Nejstarší zmínky o využívání přírodních látek ke zmírnění bolestivých stavů pochází již z období přibližně 3 tisíc let př. n. l. Z této doby existují písemné důkazy, kdy již staří Sumerové využívali rostlinu nazvanou *gil hul*, v překladu směřící se rostlinu [2,3]. Přibližně ve stejné době taktéž ve starověké Číně lidé využívali přípravek *ma-fej-san*, jenž obsahoval konopí. První zmínky o využití opia pak pocházejí ze starověkého Egypta (přibližně 2 tisíce let př. n. l.), odkud se rozšířilo do dalších částí světa. V Egyptě bylo také vyráběno tzv. *opium thebaicum*, které bylo mnoho staletí ceněno pro velmi vysoký obsah morfinu. Další zmínka o využití opia je např. z minojské Kréty v podobě sošky bohyně máku, jenž má na hlavě usazenou korunu z makovic [3].

Během let se užívání opia postupně rozšířilo do celého světa a opium se tak stalo velmi ceněným léčivem. Samozřejmě vedle mnoha příznivců se našlo i velké množství jeho

odpůrců. Velkým problémem opia se stala až kriticky vzrůstající závislost pacientů na této látce. Na přelomu 18. a 19. století pak začalo být zneužíváno především jako rekreační droga. Během této doby docházelo také k mnoha farmakologickým a chemickým pokusům s cílem zjistit přesné složení opia a jeho přesný princip působení. Velmi významné bylo v roce 1805 úspěšné izolování jeho hlavního alkaloidu morfinu německým lékárníkem Friedrichem W. A. Sertürnerem [3].

V průběhu 19. století se však využívání opia pro léčbu, zejména díky novým objevům, začalo velmi redukovat. Během 20. století začalo být využívání preparátů s opiem jen sporadické a od 21. století se opium stalo jen surovinou pro další zpracovávání. Jeho používání a pěstování podléhá legislativě [3].

2.2.2 Dělení opioidů

Z chemického hlediska lze opioidy rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou opioidy exogenní. Jde většinou o analogy morfinu a lze je dále dělit na přirozené (morfin, kodein, thebain) a polosyntetické (heroin, oxykodon, hydromorfon). Druhou skupinou jsou opioidy endogenní, mezi které patří např. endorfíny, endomorfíny, dynorfín atd. Jedná se o přirozené ligandy opioidních receptorů. Poslední skupinou z hlediska chemického rozdělení jsou opioidy syntetické, které jsou nejčastěji odvozené od fenylypiperidinu. Do této skupiny patří např. fentanyl, sufentanil nebo pethidin [2,3].

Druhou možností rozdělení opioidů je dělení dle praktického hlediska. V tomto případě je možné je rozdělit na slabé, které lze pacientovi předepsat na běžný recept, a silné, předepisované pouze na tzv. opiátový recept. Skupina slabých opioidů zahrnuje např. tramadol, kodein, dihydrokodein. Do skupiny silných opioidních látek se řadí morfin, hydromorfon, oxykodon, dále pak buprenorfín, tapentadol, pethidin, metadon [3,21]. Mezi tyto látky patří také neméně významný fentanyl, tedy derivát fenylypiperidinu dostupný v několika různých lékových formách, a látky jako sufentanil, alfentanil, remifentanil atd., používané především v klinické anestezii [3,4]. Fentanyl poprvé syntetizoval Paul Janssen v roce 1960. Společně se svými deriváty je fentanyl ve srovnání s morfinem až desettisíckrát účinnějším analgetikem [4].

2.2.3 Využití a intoxikace opioidy

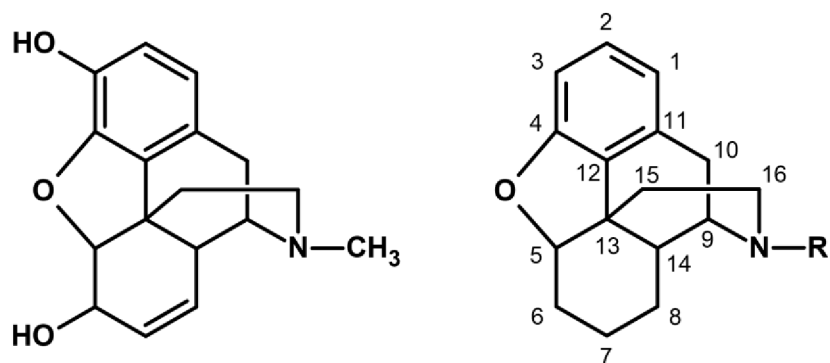
Opioidní látky lze v medicíně využít při různém druhu léčby. Hlavním mechanismem jejich účinku je interakce se čtyřmi typy opioidních receptorů μ , δ , κ a ORL_1 (*opioid receptor-like receptor*) [2,3]. Ty jsou lokalizovány jak v periferním a centrálním nervovém systému, tak v tkáních imunitních a endokrinních. Jejich využití je tedy široké. Opioidy se využívají jak u chronické nenádorové bolesti, při léčbě zad, v revmatologii, v anesteziologii, při intenzivní péči, při léčbě pooperační bolesti, tak při léčbě nádorové bolesti, a to jak u dospělých, tak u dětí [3].

Mezi nežádoucí účinky užívání patří zácpa, nevolnost, zvracení, útlum dýchacího centra, zmatenost, únava, otoky, pocení, alergie a mnoho dalších. Mezi velmi závažné negativní účinky patří také především psychická a fyzická závislost, které často končí vlivem předávkování až smrtí [2,3]. Při intoxikaci nejdříve nastává zklidnění a příjemná euforie. Mezi první příznaky intoxikace patří silná nevolnost, hučení v uších, pocit tepla na obličeji, zúžení zornic a velmi nepříjemné svědění celého těla [1,2]. První pomocí při předávkování je především udržení uživatele při vědomí. Pokud to není možné, je velmi důležité zajistit dýchání, popř. podání vhodného antidota. Závislost se následně léčí buď léčbou substituční s využitím např. metadonu, nebo léčbou vedoucí k abstinenci [2,3].

2.3 Morfin

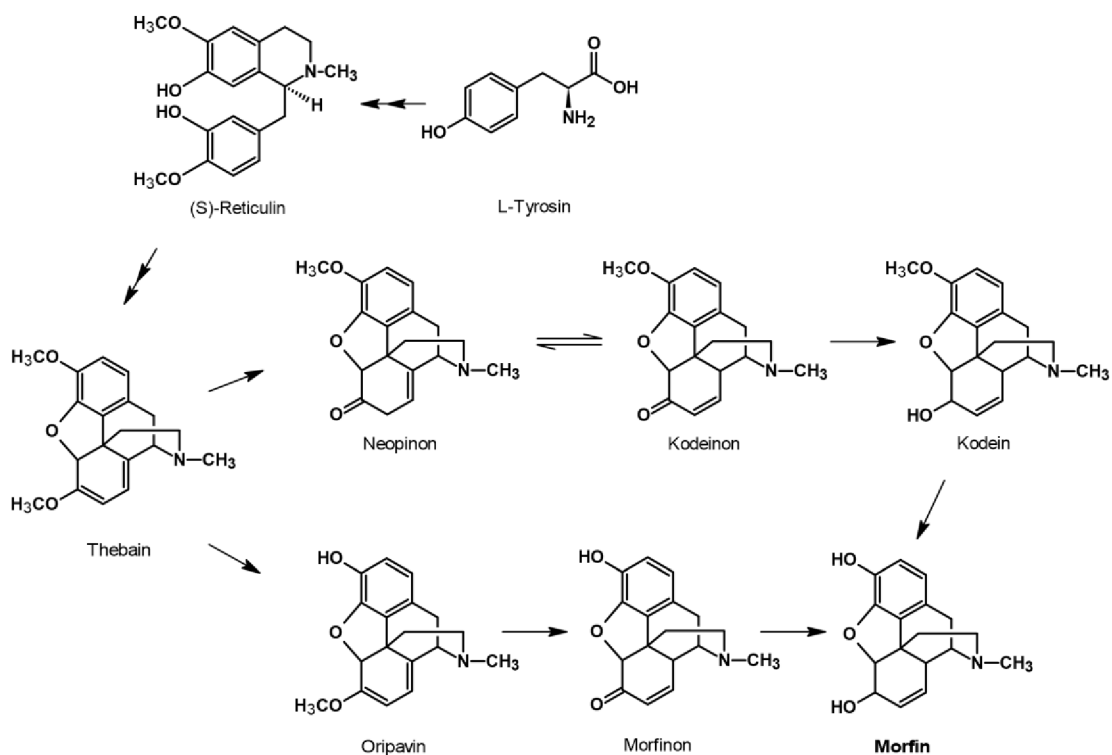
2.3.1 Základní informace

Jedná se o nejhojnější alkaloid obsažený v opiu. Poprvé byl izolován německým lékárníkem Friedrichem Sertürnerem v roce 1805, v roce 1827 pak Heinrich Emanuel Merck začal s jeho komerční výrobou. Izolace a výroba čistého morfinu byla přelomová vzhledem k používání opia v 19. století, ke kterému byly přidávány různé cizí látky (ať už se jednalo o lékořici nebo olovo), ve snaze prodejců zvýšit své výnosy. Lékaři tak nízkou účinností opia kompenzovali předepisováním větších dávek. Tento problém tedy odpadl s dostupností čistého morfia, které navíc svou rozpustností ve vodě umožňovalo injekční aplikaci [22].



Obr. 2 - Struktura morfinu a morfinového skeletu s číslováním uhlíkových atomů, převzato z [23]

Morfin je alkaloid strukturně složený z pěti cyklů s pěti asymetrickými uhlíky (5, 6, 9, 13 a 14). Jeho struktura a struktura morfinového skeletu jsou uvedeny na obr. 2. Jediným známým zdrojem morfia v rostlinné říši je mák setý (*Papaverum somniferum*), v jehož nezralých makovicích dochází k biosyntéze. Výchozí látkou je zde L-tyrosin, ze kterého je v osmi krocích syntetizován (S)-reticulin. Následuje šest kroků, při nichž je syntetizován alkaloid thebain. Poté může konečná syntéza morfinu probíhat jednou ze dvou cest, přičemž se jedná o *O*-demethylaci z uhlíku 3 nebo 6. V případě *O*-demethylace z uhlíku 3 dochází ke vzniku oripavinu, poté morfinonu a konečně morfinu. V druhém případě vzniká neopinon následován kodeinonem a kodeinem, jehož demethylací vzniká morfin. Schéma této biosyntézy je naznačeno na obr. 3 [24–26].



Obr. 3 - Zkrácené schéma biosyntézy morfinu v *Papaverum somniferum*. Převzato z [24]

2.3.2 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti

Sumární vzorec morfinu je $C_{17}H_{19}NO_3$. V čisté formě se jedná o bílou, krystalickou látku s teplotou tání $255\text{ }^{\circ}\text{C}$, ovšem při $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ začíná docházet k sublimaci (teplota varu). Morfin je bazická látka s disociační konstantou $pK_a = 8,21$ [27].

Toxicita morfinu je u mužů $LD_{50} = 0,78\text{ mg/kg}$, u žen $LD_{50} = 0,98\text{ mg/kg}$. Biodostupnost morfinu je 80–100 %, ovšem vzhledem k velkému efektu prvního průchodu musí být při orálním podání dávka asi šestkrát větší. 70–80 % dávky je z těla vyloučeno do 48 hodin, nejvíce v moči (2–10 % dávky je vyloučeno ve formě původní látky) [28,29].

Hlavním metabolickým produktem morfinu je analgeticky neaktivní morfin-3-glukuronid. V menší míře vzniká morfin-6-glukuronid, který je analgeticky aktivní a účinnější než morfin. V malé míře dochází také k *N*-dealkylaci za vzniku normorfinu [30,31].

2.3.3 Použití morfinu

Jedná se o nejúčinnější alkaloid v opiu, který má analgetické, euforické a sedativní účinky. Proto je využíván především jako analgetikum pro léčbu akutních i chronických bolestí. V tomto směru došlo k jeho rozšíření a nahrazení opia již krátce po objevení morfia, především v souvislosti s vynalezením injekční jehly. Toto analgetikum se pak začalo hojně využívat pro vojáky v americké občanské válce a jeho význam opět vzrostl v první světové a druhé světové válce [22,23,32,33].

Velkou nevýhodou morfinu je velká náchylnost k vytvoření závislosti. Pro své euforické účinky byl již od jeho objevení zneužíván jako rekreační droga, a to napříč všemi sociálními vrstvami. Stejně tak se mnoho vojáků po americké občanské válce stalo závislými, ovšem zde to bylo kvůli nutnosti potlačovat bolesti ze zranění. Zvyšující se tolerance vůči účinkům morfia a nutnost zvyšovat dávky k potlačení bolesti mohou způsobit některé z vedlejších účinků morfia – útlum respiračního systému, zvracení, závratě, zácpa atd., které mohou vést až k smrti [22,28,32,33].

V dnešní době je morfin používán především pro výrobu dalších alkaloidů a opioidů, např. kodeinu, hydromorfonu, heroinu, oxymorfonu a dalších. Například v roce 2019 bylo takto přeměněno téměř 90 % morfinu z 380 tun získaných z máku celosvětově [5].

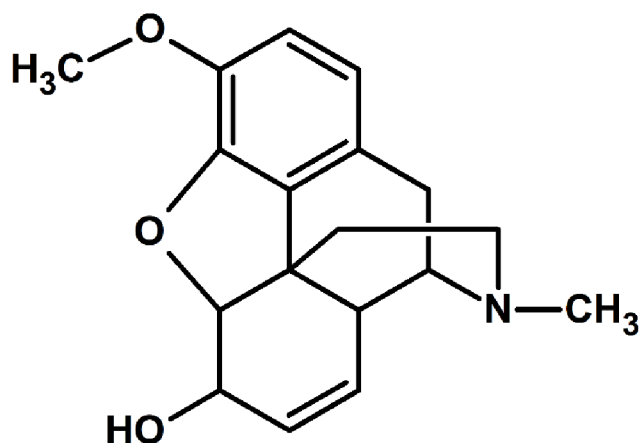
2.4 Kodein

2.4.1 Základní informace

Kodein neboli 3-methylmorfin, je minoritní přírodní opiat, který představuje průměrně 0,8 až 2 % složení opia [32,33]. Jeho existence byla poprvé zjištěna v roce 1832, kdy jej z máku izoloval francouzský chemik Pierre-Jean Robiquet. Jeho biosyntéza je součástí procesu vzniku morfinu a je schematicky zobrazena na obr. 3. Vzhledem k malému obsahu v máku se však většina komerčně používaného kodeinu syntetizuje uměle z morfinu [6].

2.4.2 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti

Kodein (obr. 4) má sumární vzorec $C_{18}H_{21}NO_3$. V čisté formě se vyskytuje jako bezbarvý až bílý prášek či krystalická látka. Teplota tání je $157,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota varu je $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Disociační konstanta kodeinu je $pK_a = 8,2$ [34].



Obr. 4 - Struktura kodeinu

Toxická dávka kodeinu byla u myši stanovena na 427 mg/kg při orálním podání. Většina kodeinu, asi 90 %, je z těla vyloučena močí, přičemž 10 % z tohoto množství je kodein v původní formě.

Metabolismus kodeinu vede ke konjugaci s kyselinou glukuronovou za vzniku kodein-6-glukuronidu (70–80 %), případně k *N*-demethylaci za vzniku norkodeinu. 5–10 % kodeinu je *O*-demethylací metabolizováno na morfin, který se dále přeměňuje na příslušné metabolity, viz kapitola 2.3.2 [30,35].

2.4.3 Použití kodeinu

Hlavní uplatnění je v medicíně, kde je používán pro své analgetické, antitusivní a protiprůjmové vlastnosti. Výhodou oproti morfinu je možnost aplikovat kodein ve formě tablet, protože biodostupnost při orálním podání je až 90 %. Předpokládá se, že analgetický účinek samotného kodeinu je nízký. Sám o sobě je považován za proléčivo, kdy se nejprve musí metabolizovat na morfin a až tehdy dochází k analgetickým účinkům. Tento metabolismus však neprobíhá asi u 10 % jedinců europoidní rasy, kteří tak nemají žádný analgetický účinek z kodeinu. Léčiva obsahující kodein se vyrábějí ve formě tabletek nebo sirupů (zejména při léčbě kašle) [20,32,36–39].

Analgetické účinky kodeinu mají široké využití pro úlevu od obvyklé bolesti, například při bolestí svalů, kostí, pooperačních bolestech, bolestech hlavy atd. Často se kodein kombinuje s dalšími látkami pro zvýšení efektivity, například s aspirinem nebo paracetamolem pro úlevu od bolesti po operacích zubů [6,20,32,38].

Časté je také použití kodeinu v přípravcích pro léčbu suchého kašle. Principem je zde potlačování kašlacího reflexu působením na centrum kašle v mozku [6].

Vzhledem k tomu, že je kodein přidáván k různým dalším lékům, ale sám je relativně snadno dostupný, je samozřejmě zneužíván pro výrobu narkotik. Narkomané využívají jednak jeho metabolickou přeměnu na morfin, jednak možnost připravit si morfin chemickou cestou [6,20,30].

2.5 Heroin

2.5.1 Základní informace

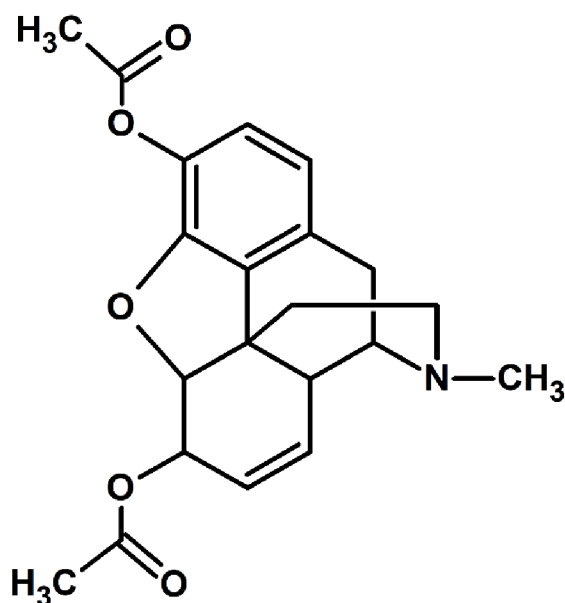
Heroin s chemickým názvem 3,6-diacetylmorfin je silné, synteticky připravené opiátové analgetikum, vyráběné z morfinu [40]. Poprvé byl syntetizován v roce 1874 britským chemikem Charlesem Romleyem Alderem Wrightem [2,41].

V minulosti byl heroin hojně využíván především jako lék tlumící kašel nebo také jako látka využívaná při odvykání závislosti na morfinu. Pro silné návykové vlastnosti se od jeho užívání v medicíně ale brzy upustilo [2,40]. V dnešní době je celosvětově nejrozšířenější ilegální drogou ze skupiny opioidů. Nejčastěji je aplikován nitrožilně, což je zároveň nejvíce nebezpečný způsob jeho zneužívání. Dále pak může být šňupán, kouřen nebo inhalován z aluminiové fólie [2,40].

2.5.2 Fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnosti

Heroin (obr. 5) se sumárním vzorcem $C_{21}H_{23}NO_5$ je v čistém stavu bílá krystalická látka [42]. Ovšem může se vyskytovat také v hnědé formě, která obsahuje příměsi strychninu. Takováto forma heroinu je zásaditá a špatně rozpustná, proto je před jeho nitrožilním užitím nutný přídavek kyseliny [2]. Čistá forma heroinu má teplotu tání $173\text{ }^{\circ}\text{C}$ a bod varu okolo $272\text{--}274\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jeho rozpustnost ve vodě je $0,6\text{ g/l}$ při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při stejné teplotě je disociační konstanta heroinu $pK_a = 7,95$ [43]. Při dlouhodobém vystavení vzduchu poté bílá krystalická forma postupně růžoví a uvolňuje se octový zápach [42].

Toxická dávka heroinu u myši byla stanovena při nitrožilním podání na $LD_{50} = 21,8\text{ mg/kg}$ a u krysa na $22,5\text{ mg/kg}$ [42]. Převážná většina drogy se vylučuje v podobě glukuronidů ledvinami, v menší míře poté jako morfin. Přibližně okolo 10 % z celkového množství se vylučuje žlučovým systémem do stolice. Poločas rozpadu heroinu u lidí je přibližně dvě až tři minuty [43].



Obr. 5 - Struktura heroinu, převzato z [42]

Heroin je v játrech poměrně rychle deacetylován za vzniku aktivního metabolitu 6-monoacetylmorfinu, který je dále hydrolyzován na morfin. Tyto dva metabolity jsou současně zdrojem účinků heroinu na organismus. Vznik 6-monoacetylmorfinu probíhá nejnadhěji bazicky katalyzovanou hydrolýzou, ovšem může k němu docházet také v přítomnosti protických rozpouštědel, např. etanolu, metanolu nebo vodných roztoků. Následný metabolismus po vzniku morfinu je již popsán v kapitole 2.3.2 [30,37].

2.5.3 Použití heroinu

Po zavedení komerční výroby heroinu (1898) byl nabízen jako antitusivo pro pacienty s astmatem a tuberkulózou. Po 12 letech se začalo používání heroinu omezovat, protože byl odhalen jeho velký návykový potenciál. Například v USA je používání heroinu absolutně zakázáno od roku 1924 a do dnes je to jediný zakázaný opiát v zemi. V některých státech se lze setkat s medicínálním použitím heroinu, ale pouze v extrémních případech a za velmi přísných podmínek [32,33].

Nejčastějším použitím heroinu je v dnešní době jeho nelegální zneužívání. Oblíbený je ve Spojených státech amerických, kde žije 5 % světové populace, ale zároveň se zde konzumuje 60 % všech nelegálních drog [44]. Jeho zdejší oblíbenosti nasvědčují také statistiky, které uvádějí nárůst úmrtí způsobených předávkováním heroinem na téměř čtyřnásobek mezi lety 2002–2013 (z 0,7 na 2,7 úmrtí na 100 000 obyvatel). Problém heroinové závislosti spočívá v tom, že dlouhodobé užívání může narušit strukturu a funkci mozku. Například dochází ke zhoršení kognitivních funkcí a narušení normálního fungování CNS [32]. Nebezpečí spočívá také v nejčastější aplikaci heroinu pomocí injekce, kdy hrozí infekce, krevní sraženiny a v případě sdílení jehel k přenosu hepatitidy typu B a C [44].

Legální použití heroinu spočívá v dnešní době především k léčbě dlouhodobě závislých jedinců, kdy nelze vysadit drogu najednou, ale je důležité postupné snižování dávky. Legální výroba heroinu není nijak velká, průměrně se pohybuje kolem 700 kg ročně, kdy například v roce 2019 byla vyrobena celkem tona heroinu, z 55,3 % ve Švýcarsku, ze 44,7 % ve Spojeném království [5].

2.6 Metody stanovení opiátů

Vzhledem ke své podstatě a využití ve farmacii, ale i zneužívání jako nelegálních drog, existuje mnoho metod pro analýzu těchto látek. Nejčastěji se pracuje s biologickými vzorky (tělní tekutiny, vlasy), u kterých se ve velké míře uplatňují separační metody. V případě zabavených vzorků, které jsou ve své podstatě čisté, lze využít i rychlejší a jednodušší metody pro identifikaci nebo důkaz drogy, k čemuž mohou posloužit například jednoduché elektrochemické metody. Zajímavé jsou také tzv. geolokační metody pro určení lokace původu dané drogy.

2.6.1 Geolokační analýza opiátů

Tyto metody jsou založeny na skutečnosti, že opiáty jsou drogy přírodního původu, které se získávají z *Papaver somniferum*. Jednotlivé rostliny a opiáty z nich získané se pak liší v izotopových poměrech podle oblasti, ve které byla daná rostlina pěstována. Zjištění místa původu dané drogy napomáhá kriminalistům odhalovat trasy používané pro pašování těchto drog [45,46].

Pro geolokační analýzu lze využít například poměr stabilních izotopů uhlíku a dusíku v heroinu s použitím GC-MS. U heroinu lze sledovat jak samotný heroin, tak po deacetylaci také morfin, u kterého jsou získané izotopové profily přesnější (eliminuje se vliv uhlíků z přidaného acetanhydridu při výrobě heroinu). Tato metoda byla použita pro odlišení vzorků heroinu vyrobených v Mexiku, Jižní Americe a Asii [46].

Další možnost odhalení původu nelegálního heroinu popisuje Odell [47]. Zaměřil se na *Papaver somniferum* N. z Tasmánie, která vyrábí 25 % světového legálního opia. Tasmánské makovice obsahují unikátní alkaloid oripavin, který slouží jako marker nečistot ve vyrobeném heroinu. Autoři pomocí GC-MS identifikovali 5 markerů vznikajících z oripavinu, které se vyskytovaly pouze ve vzorcích heroinu vyrobeného z tasmánských makovic, přičemž při analýze heroinu z jiných zemí nebyly tyto markery nalezeny.

2.6.2 Separační metody pro stanovení opiátů

Jak již bylo zmíněno, stanovení opiátů se provádí především v biologických vzorcích. Mohou to být vzorky pacientů v nemocnicích, kde se například morfin používá jako anestetikum a sledování jeho hladiny v těle pacienta je důležité pro zajištění co nejlepšího anestetického účinku bez vzniku závislosti či jiných negativních vlivů. Stejně tak je důležité získat informace v případě předávkování narkomanů, kdy je zejména důležité identifikovat použitou drogu.

Nejvíce používané jsou HPLC metody s různými způsoby detekce, například v kombinaci s hmotnostní spektrometrií pro stanovení různých legálních a ilegálních drog (včetně opiátů) v mateřském mléce na C18 koloně v gradientové eluci (mobilní fáze 2 mmol/l octan amonný pH = 6,6 a metanol) [48] nebo stanovení opiátů v moči (C18stacionární fáze a mobilní fáze s gradientovou elucí ve složení A: voda s 0,1 % HCOOH a B: metanol s 0,1 % HCOOH) [49] či krvi (gradientová eluce s acetonitrem a roztokem mravenčanu amonného o c = 1 mmol/l a pH = 3, na C18 stacionární fázi) [50]. Častými

detektory jsou v kombinaci s HPLC také optické detekční systémy, zejména detektory diodového pole (DAD) [51] nebo UV detekce [7,52].

Alternativou k detekci optickými detektory a hmotnostními spektrometry jsou elektrochemické detektory. Ty mohou nabídnout lepší selektivitu analýzy, protože nebude docházet k detekci interferentů, které jsou elektrochemicky neaktivní. Elektrochemické detektory nabízejí možnost použít různé elektrodové materiály a metody analýzy, například amperometrii s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku a referenční argentchloridovou elektrodou (potenciál 600 V) pro stanovení 6-monoacetylmorfinu a morfinu v lidské plazmě, krvi a moči na fenylové koloně s použitím 0,025 mol/l octanu amonného pH = 6,5 s acetonitrilem (72:28 v/v) jako mobilní fází v izokratické eluci [8]. Další možnou metodou je coulometrická detekce, kterou lze zkombinovat s imunoextrakcí tuhou fází a HPLC na kyano koloně v izokratickém elučním módu s 13 % acetonitrilu ve fosfátovém pufru (65 mmol/l, pH = 2,5) a přidavkem 15 mmol/l laurethsulfátu sodného při analýze morfinu v moči [53], ale i rozlišení morfinu, kodeinu a 6-monoacetylmorfinu v moči (v systému s fenylovou stacionární fází, izokratickou mobilní fází ve složení acetonitril:dihydrogenfosforečnan sodný 10 mmol/l, pH = 6,6 v poměru 10:90 a detekci při 200 mV v elektrochemické cele 1, 550 mV v elektrochemické cele 2 a UV detekci při 210 nm) [7].

Vzhledem k nízkým koncentracím opiátů a složitým matricím se vzorky nejprve předupravují a zakoncentrovávají pomocí vhodných extrakčních technik. Ty však prodlužují dobu analýzy, představují spotřebu organických rozpouštědel a zvětšují chybu měření. Proto se výzkum zaměřuje na zrychlení a zjednodušení těchto metod, například použitím specificky adsorbujících částic. Takto lze připravit například magnetické částice molekulárně tištěného polymeru. Na povrchu nanočástic se nechá v přítomnosti cílové molekuly (morfinu) zpolymerovat vrstvička kopolymeru metakrylové kyseliny a etylenglykol dimetakrylátu, která je po vymytí morfinu metanolem schopna do uvolněných míst morfin adsorbovat. Tyto nanočástice pak lze použít ke specifické extrakci dané látky z roztoku a následné analýze pomocí HPLC s DAD [54].

Obdobně byla popsána metoda extrakce tuhou fází, kde jsou použity magnetické nanočástice jako sorbent pro HPLC analýzu morfinu ve vzorcích lidských vlasů, které jsou vhodné jako vzorek pro získání informací o dlouhodobém užívání drog. Připravené magnetické nanočástice se silanizovaným povrchem mají oproti klasickým SPE sorbentům větší povrch, lepší selektivitu, vyšší výtěžnost a větší adsorpční kapacitu, což je výhodné

při časově kratších extrakcích. Tato výhoda se projeví menší spotřebou sorbentu a rychlou extrakcí s následnou HPLC-DAD analýzou, např. s použitím C18 kolony a izokratické eluce acetonitrilem a fosfátovým pufrem pH = 3 (60:40) a měřením při 292 nm [55].

Mimo biologické vzorky se lze setkat také s HPLC analýzou odpadních vod, kdy jsou prováděny dlouhodobé studie sledující užívání různých drog a změny ve frekvenci používání drog, která se často zvyšuje o víkendech. Takovéto studie pak ukazují, že používání klasických opioidních drog má konstantní tendence [56,57].

Důležitou oblastí kontroly obsahu opiátů je také potravinářství, kde je mák oblíbenou náplní v pečivu. Tady lze například aplikovat metodu, kdy se opiáty extrahují směsí acetonitrilu, vody a kyseliny mravenčí a po přidavku interního standardu izotopicky značeného morfinu se provede analýza pomocí LC-MS [58].

2.6.3 Elektrochemické metody analýzy opiátů

Vzhledem k elektrochemicky aktivním centřům v molekulách opiátů jsou elektrochemické metody jednou z možných alternativ jejich analýzy. Vzhledem k podobnosti struktur jednotlivých opiátů lze ovšem očekávat, že jejich oxidační potenciály budou velmi podobné. Neselektivita těchto metod je tak hlavní nevýhodou oproti separačním metodám, proto jsou elektrochemické techniky vhodné pro stanovení jednotlivých opiátů, nikoliv jejich směsí, a to např. v lékových formách nebo pouličních drogách, spíše než v komplexních vzorcích tělních tekutin. Vzhledem k jednoduchosti a možné miniaturizaci senzorů jsou tyto metody vhodné pro použití v terénu.

Nejčastěji jsou senzory konstruovány s různými modifikacemi klasických elektrodových materiálů, zejména uhlíku. Tím se zvyšuje jak jejich selektivita, tak citlivost. Pro stanovení stopového množství morfinu lze takto připravit elektrodu z pentilkového grafitu modifikovanou vícestěnnými uhlíkovými nanotrubičkami a molekulárně vtištěným polymerem se zlatými nanočásticemi [59].

Jednou z rozšířených variant uhlíkových elektrod jsou uhlíkové pastové elektrody, které jsou výhodné pro svou jednoduchou obnovu povrchu, kdy stačí odstranit již použitou část elektrodové pasty a povrch vyleštit. Taková elektroda může být například z grafitového prášku smíchaného s parafínovým olejem a modifikována hydrogelem. Touto elektrodou lze stanovit obsah morfinu v kapce moči, která se dávkuje přímo na povrch elektrody [60]. Jinou možností stanovení morfinu je modifikace uhlíkové pastové elektrody oxidem zinečnatým

a vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami [61] nebo Zn_2SnO_4 -grafenovým kompozitem. Druhá zmíněná modifikace umožňuje současné a selektivní stanovení morfinu a kodeinu v biologických a farmaceutických vzorcích [62]. Zajímavou modifikací uhlíkových pastových elektrod je použití elektricky předených magnetických nanovláken, které byly využity při stanovení morfinu v krevním séru [63].

Ačkoliv je elektrochemie obvykle neselektivní analytická metoda, existují možnosti, jak provést analýzu více opiátů nebo jednoho opiátu v přítomnosti interferentů. Jako příklad může sloužit stanovení heroinu obsahujícího příměsí a nečistoty pomocí nemodifikované grafitové elektrody s využitím měření při různých pH. Tato metoda je založena na měření square-wave voltametrií při $pH = 7$ a $pH = 12$, čímž jsou získány charakteristické profily jednotlivých složek. Následně je tak možné spolehlivě identifikovat heroin a jeho různé příměsí v jednom vzorku [64]. Další možnost popisují Gholivand a kol. [65], kteří se zaměřili na chemometrické zpracování dat zaznamenaných diferenční plzní voltametrií na elektrodě ze skelného uhlíku, čímž úspěšně stanovili 5 různých opiátů v krevním séru.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

Při elektrochemických analýzách byl použit potenciostat/galvanostat Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) se softwarem Nova 1.12 (Metrohm Autolab, Nizozemsko). Pracovní elektrodou byla GCE (MF-2012, průměr disku 3 mm, BASi, USA). Dále byla použita magnetická míchačka Hei-Mix S (Heidolph, Německo), ultrazvuková čistička Sonorex Digitec (Bandelin, Německo), váhy XSE205 Dual Range (Mettler Toledo, USA).

Spektrofotometrické analýzy byly realizovány pomocí spektrofotometru GENESYS 180 (Thermo Scientific, USA).

MS analýzy byly prováděny na hmotnostním spektrometru Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, USA) s ionizací elektrosprejem a softwarem DataAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik, Německo). Dávkování vzorku bylo prováděno pomocí stříkačkové pumpy NE-1002X (New Era Pump Systems, USA).

Roztoky morfinu elektrolyzované za konstantního potenciálu byly analyzovány na UPLC Acquity (Waters, Velká Británie) s detektorem diodového pole a hmotnostně spektrometrickým detektorem (QDA) vybaveným vyhřívanou elektrosprejovou ionizační sondou (HESI) a kvadrupólovým analyzátozem. K separaci byla použita kolona XSelect HSS T3 (3 mm × 50 mm; 2,5 μm; Waters).

System UPLC Acquity (Waters, Velká Británie) s tandemovým hmotnostním spektrometrem Select Series Cyclic IMS Q-TOF (Waters, Velká Británie) byl použit pro analýzu vzorků morfinu po elektrolyze ve vodných a nevodných prostředích a identifikaci reakčních produktů na základě měření přesné hmoty. Kolona Raptor ARC-18 (100 × 2,1mm; 2,7μm; Restek) sloužila pro separaci analytů. Všechna LC-MS data byla zpracována v softwaru MassLynx 4.1 (Waters, Velká Británie).

V případě HPLC analýz vzorků moče a séra byl využíván HPLC přístroj série UltiMate 3000 (Thermo Scientific Dionex, USA) s UV a dvoukanálovým coulometrickým detektorem s analytickou celou 6011RS (Thermo Scientific Dionex, USA), ovládaný pomocí softwaru Chromeleon 7. Použitá kolona byla Hypersil ZORBAX 300SB-CN (150 mm × 4,6 mm; 5 μm; Agilent).

Pro zpracování vzorků byla využita třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Německo), centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo) a mini centrifuga MINI-10K (Miulab, Čína).

Pro statistické výpočty byl používán software QCExpert 3.2 (TriloByte, Česká republika).

3.2 Chemikálie

Analyzovanými opioidními látkami byly morfin (Lipomed, Švýcarsko), kodein (Codein Slovakofarma, 30 mg, Zentiva) a heroin (Lipomed, Švýcarsko).

Dále byly použity chemikálie: acetonitril HPLC grade (Honeywell, USA), metanol HPLC grade (Honeywell, USA), chloristan sodný monohydrát $\geq 99\%$ (Honeywell, USA), etanol HPLC grade (VWR International, Francie), kyselina orthofosforečná 85% p.a. (Penta, Česká republika), chlorid draselný p.a. (Penta, Česká republika), kyselina sírová 96% p.a. (Penta, Česká republika), kyselina mravenčí 98% p.a. (Penta, Česká republika), toluen p.a. (Penta, Česká republika), chloroform p.a. stabilizovaný 1 % etanolu (Penta, Česká republika), octan amonný p.a. (Lachema, Česká republika), kyselina boritá p.a. (Lachema, Česká republika), hydroxid sodný p.a. (Lach-Ner, Česká republika), kyselina octová 99% p.a. (Sigma-Aldrich, Německo), 4-ethoxyfenol 99% (Sigma-Aldrich, Německo), celit 545 p.a. (Serva, Německo). Všechny vodné roztoky byly připraveny v deionizované vodě (Millipore, 18,2 M Ω).

3.3 Použité pracovní postupy

3.3.1 Testování stability morfinu ve vodném roztoku

Sledování stability připraveného vodného roztoku morfinu bylo prováděno pomocí metod DPV, HPLC, MS a UV spektrometrie. Roztok byl proměřen ihned po přípravě a dále poté po 1, 4, 7, 14, 28 a 61 dnech.

Nejprve byl připraven zásobní roztok morfinu v deionizované vodě o koncentraci $1,88 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Ten byl okyselen 1 μ l 2M-HCl pro převedení morfinu na rozpustný hydrochlorid. Takto připravený roztok byl následně upravován pro analýzu jednotlivými metodami.

Diferenční pulzní voltametrie

K testování stability morfinu ve vodném prostředí pomocí diferenční pulzní voltametrie bylo použito 0,5 ml roztoku připraveného zředěním zásobního roztoku morfinu pomocí BR pufru o $\text{pH} = 3$ v poměru 1:1. Takto připravený roztok byl umístěn do nízkoobjemové voltametrické cely s fritou. V této cele s měřeným roztokem byly umístěny pracovní GCE a pomocná platinová elektroda. Jako referenční elektroda byla použita nasycená kalomelová elektroda (SCE), umístěná v odděleném prostoru s roztokem KCl (1 mol/l). Před každou analýzou byla potřeba vyčistit povrch pracovní GCE elektrody vyleštěním na aluminové suspenzi a následným opláchnutím destilovanou vodou.

Pro měření pomocí diferenční pulzní voltametrie byly nastaveny tyto parametry:

- Počáteční potenciál: 0,2 V
- Konečný potenciál: 1,2 V
- Rychlost polarizace: 10 mV/s
- Modulační amplituda: 50 mV
- Modulační čas: 50 ms

HPLC

Metoda HPLC pro testování stability morfinu byla využita v kombinaci s UV detekcí při 241 nm. Pro stanovení bylo použito 400 μl roztoku připraveného zředěním zásobního roztoku morfinu v redestilované vodě pomocí mobilní fáze v poměru 1:3. Použitou mobilní fází byla směs metanol/acetonitril/vodný roztok 0,1M- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (40:25:35). Pro analýzu byla využita kolona C-18. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,8 ml/min a objem nástřiku byl 50 μl .

Hmotnostní spektrometrie

Pro ESI-MS analýzu byl využit přímý nástřik roztoku připraveného opět ze zásobního roztoku morfinu, redestilované vody a ACN (2,5 %). Koncentrace morfinu v takto připraveném roztoku byla $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Pro metodu ESI-MS byly nastaveny tyto podmínky:

- Teplota sušícího plynu: 250 °C
- Rychlost průtoku sušícího plynu: 5 l/min
- Tlak ve zmlžovači: 15 psi
- Napětí na vstupní kapiláře: +/- 3,5 kV
- Rychlost dávkování vzorku: 8 µl/min
- Doba snímání spektra: 5 minut

UV spektrometrie

Pro sledování stability morfinu ve vodném prostředí pomocí UV spektrometrie byl použit 1 ml roztoku, který byl připraven naředěním zásobního roztoku morfinu redestilovanou vodou v poměru 2:8. Měření bylo prováděno v křemenných kyvetách při rozsahu vlnových délek 190–450 nm.

3.3.2 pH závislost

Závislost voltametrické odezvy na pH roztoku v případě morfinu bylo prováděno v BR pufru v rozmezí hodnot pH 2–12, v případě kodeinu a heroinu v rozmezí hodnot pH 2–10. Při analýze morfinu byl použit zásobní vodný roztok o koncentraci $1,88 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Roztoky kodeinu a heroinu pro testování pH řady (10^{-4} mol/l) byly připraveny u obou těchto látek ze zásobních roztoků jednotlivých opioidů v metanolu o koncentraci 1 mg/ml. Závislosti na pH byly měřeny metodou diferenční pulzní voltametrie, jejíž parametry jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 - Parametry DPV měření pH závislosti

	Morfin	Kodein, heroin
Počáteční potenciál (V)	0	0
Konečný potenciál (V)	1,2	1,4
Amplituda (V)	0,05	0,1
Doba trvání pulzu (s)	0,05	0,05
Rychlost skenu (V/s)	0,01	0,03

3.3.3 Extrakce kodeinu z tablet

Kodein byl izolován extrakcí z tablet proti kašli Codein Slovakofarma 30 mg (Zentiva, Praha). Pro izolaci byly použity tři kodeinové tablety, které byly rozdrceny v třecí misce. K prášku bylo přidáno 10 ml destilované vody a dvě lžičky Celitu. Suspenze byla sonifikována po dobu 15 minut a následně centrifugována po dobu 10 minut při 4400 rpm. Supernatant byl odebrán, pevný podíl byl propláchnut a znovu centrifugován. Supernatant byl opět odebrán a přidán k prvnímu podílu. K roztoku byl přidán 1 ml 1M-NaOH a 2 ml chloroformu. Směs byla protřepána na třepačce po dobu 5 minut při 1350 rpm a následně 5 minut centrifugována. Chloroformová fáze s analytem byla odebrána a rozpouštědlo bylo odpařeno proudem dusíku za laboratorní teploty. Výtěžek extrakce činil 43,4 mg kodeinu. Odparek byl následně rozpuštěn v metanolu. Koncentrace výsledného roztoku byla 1 mg/ml.

3.3.4 Elektrolýza morfinu

Všechny elektrolýzy za konstantního potenciálu byly realizovány v tříelektrodevém zapojení elektrochemického článku s pracovní platinovou síťkovou elektrodou nebo s elektrodou ze svazku uhlíkových vláken (štetičkovou uhlíkovou elektrodou, CFBE), referenční nasycenou kalomelovou elektrodou nebo $\text{Ag} \mid 0,01\text{M-AgNO}_3, 1\text{M-NaClO}_4$ pro prostředí bezvodého acetonitrilu, a pomocnou platinovou elektrodou v prostoru odděleném fritou a naplněném elektrolytem používaným při daném experimentu.

Volba prostředí pro elektrolýzy

Jako prostředí pro elektrolýzy na Pt síťce a CFBE byly testovány voda, směs metanolu a vody (50 %, v/v) a směs acetonitrilu a vody (50 %, v/v). Elektrolytem byl 0,2M- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ o $\text{pH} = 3$. CFBE byla navíc použita pro elektrolýzu v bezvodém acetonitrilu s 0,2M- NaClO_4 jako elektrolytem. Koncentrace morfinu byla vždy 0,5 mmol/l.

Na Pt elektrodě byl morfin elektrolyzován vždy 10 minut, při potenciálu 1,1 V ve vodě a 0,7 V ve směsích metanol/voda a acetonitril/voda. Na CFBE byl morfin elektrolyzován 10 minut při 1,1 V ve všech vodných prostředích a při 0,9 V v bezvodém acetonitrilu.

Volba vhodného elektrolytu, jeho pH a potenciálu elektrolýzy ve vodném prostředí

Byly testovány elektrolýzy v prostředí octanu amonného a mravenčanu amonného o pH = 3 a pH = 7 na Pt síťkové elektrodě. Elektrolýza probíhala vždy 30 minut při potenciálech 1,3 V pro pH 3 a 1,1 V pro pH = 7.

Pro octan amonný bylo navíc testováno pH = 10 pro 30minutovou elektrolýzu při potenciálech 0,3 V; 0,7 V a 1,3 V.

Při všech elektrolýzách byla výchozí koncentrace morfinu 0,05 mmol/l.

Parametry LC-MS analýzy

K separaci elektrolyzovaných vzorků v LC-MS systému s QDA byla použita mobilní fáze složená z 0,01 mol/l vodného roztoku octanu amonného (A) a směsi acetonitrilu s vodou (90/10 v/v; MF B). Gradientová eluce byla provedena podle programu v tabulce 2. Vzorek byl dávkován v objemu 10 μ l. Hmotnostně spektrometrické podmínky byly následující: kladný mód ESI, napětí na kapiláře 0,8 kV, napětí na kónu 25 V, teplota zdroje 120 °C, teplota vyhřívání sondy 600 °C.

Tabulka 2 - Průběh gradientové eluce v LC-MS systému s QDA

Čas (min)	Průtok (ml/min)	MF-A (%)	MF-B (%)
0	0,6	94,5	5,5
1	0,6	94,5	5,5
5	0,6	34	66
5,5	0,6	94,5	5,5
7	0,6	94,5	5,5
7,5	0,05	94,5	5,5

Systém LC-MS Cyclic IMS Q-TOF pracoval s mobilní fází voda s 0,1% HCOOH (A) / acetonitril s 0,1% HCOOH (B) v gradientovém programu, který je uveden v tabulce 3. Dávkovaný objem vzorku byl 5 μ l. MS podmínky byly nastaveny následovně: napětí na kapiláře 2 kV, napětí na kónu 60 V, teplota zdroje 100 °C.

Tabulka 3 – Průběh gradientové eluce v LC-MS systému Cyclic IMS Q-TOF

Čas (min)	Průtok (ml/min)	MF-A (%)	MF-B (%)
0	0,4	98	2
2	0,4	98	2
10	0,4	0	100
11,5	0,4	0	100
13	0,4	98	2

3.3.5 HPLC analýza

Pro HPLC analýzu bylo testováno několik mobilních fází (MF) o různém poměru ACN:NaH₂PO₄ (20 mmol/l, pH = 6). Poté byl zaznamenán hydrodynamický voltamogram v rozsahu potenciálů 700 až 1050 mV na směsném roztoku morfinu, kodeinu a heroinu o koncentraci 5 μmol/l.

Dále byly změřeny kalibrační roztoky směsi morfin, kodein, heroin v koncentračním rozsahu 5·10⁻⁵ až 5·10⁻⁶ mol/l.

Podmínky HPLC analýzy byly:

- Mobilní fáze: ACN:NaH₂PO₄ (20 mmol/l, pH = 6), 20:80
- Průtok: 0,5 ml/min
- Objem nástřiku: 50 μl
- Vlnová délka UV detekce: 210 nm
- Potenciál ECD: 900 mV na obou kanálech
- Všechny analyzované roztoky opioidů byly ředěny mobilní fází

Příprava reálných vzorků pro HPLC analýzu

Jako reálné vzorky byly analyzovány moč a krevní sérum.

Vzorky krevního séra byly připraveny z 500 μl čistého séra přidáním morfinu, heroinu a kodeinu o výsledné koncentraci 5 μmol/l. V případě vzorků stanovovaných metodou vnitřního standardu byl přidán jako standard vodný roztok 4-etoxyfenolu o koncentraci 5 μmol/l. V případě metody standardního přídávku byly připraveny další vzorky jako v předchozím případě, do kterých byly navíc přidány standardní přídávky analytů o koncentraci 5 μmol/l. Příprava vzorků pro obě metody kvantifikace byla testována dvěma způsoby:

a) do krevního séra byly přidány analyty, včetně vnitřního standardu, respektive standardních přídavek a vzorky se nechaly 15 minut stát pro případné navázání analytů na proteiny;

b) do krevního séra byly přidány analyty, vzorky se nechaly 15 minut stát pro případné navázání analytů na proteiny, poté byly přidány vnitřní standard/standardní přídávky a vzorky se nechaly stát 5 minut.

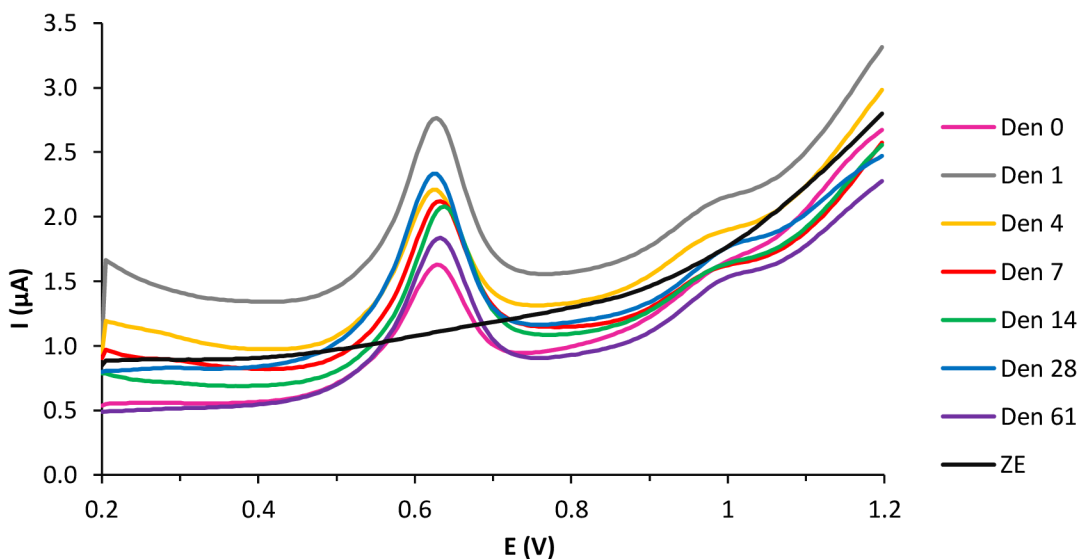
Poté byla provedena deproteinace přídavkem 1,5 ml acetonitrilu nebo metanolu. Vzorek byl protřepán po dobu 2 minut při 1350 rpm, poté byl zcentrifugován a odebrán supernatant (asi 1,5 ml). Následně byl roztok zfiltrován přes diskový mikrofiltr (nylon 0,22 μm), rozpouštědlo bylo odpařeno proudem dusíku a odparek byl rekonstituován ve 200 μl MF.

K 5 ml vzorku moči byly přidány analyty ve výsledné koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$. Následně byla moč upravena na $\text{pH} = 9$ přídavkem 1M-NaOH. Ke vzorkům se standardním přídavkem byly navíc přidány analyty opět o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$. Poté byly vzorky extrahovány 1,5 ml chloroformu na třepačce (1350 rpm) po dobu 10 minut, poté byly zcentrifugovány a následně bylo odebráno 1,5 ml chloroformové fáze. Chloroform byl odfoukán a odparek byl rekonstituován v 1 ml MF.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Testování stability morfinu ve vodném roztoku

Pro sledování stability morfinu ve vodném prostředí byly používány metody DPV, HPLC, MS a UV spektrometrie. Na výsledném grafu (obr. 6) pro metodu DPV lze vidět, že během celého období testování stability morfinu ve vodném prostředí, nedocházelo ke změnám ve složení roztoku. Byl pozorován vždy jeden hlavní pík s potenciálem okolo 0,63 V a další vlna při vyšším potenciálu kolem 1 V. Výsledný graf zahrnuje diferenční pulzní voltamogramy sestavené vždy z průměrů tří měření během konkrétního dne.

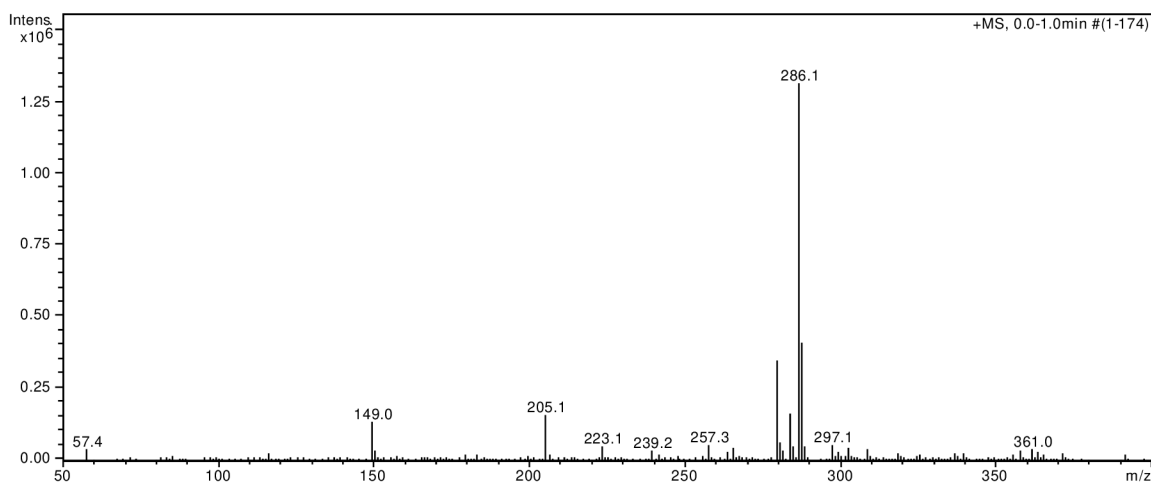


Obr. 6 - Voltamogramy získané metodou DPV při testování stability vodného roztoku morfinu

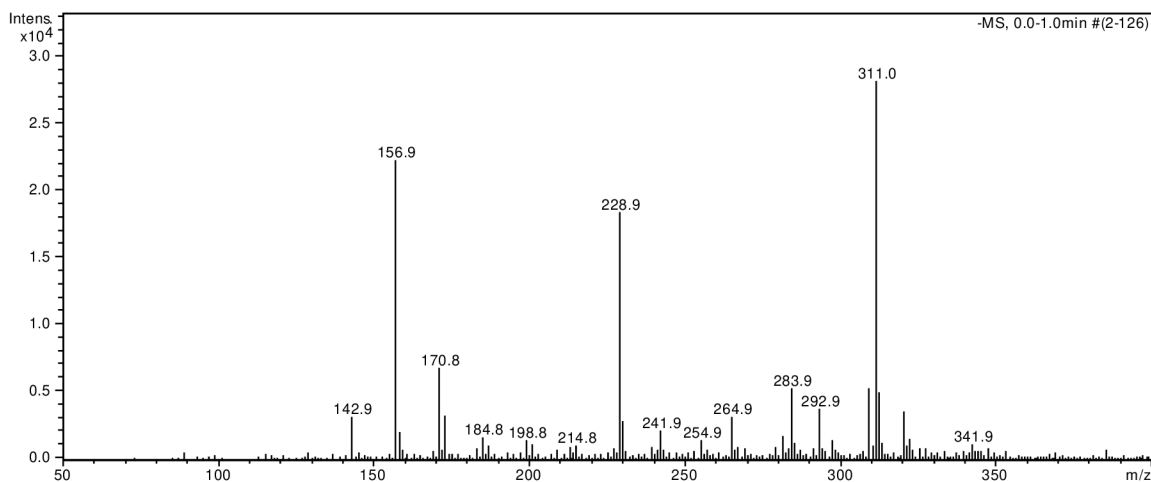
V případě HPLC analýzy způsobovala mobilní fáze s vysokým obsahem organických látek eluci morfinu v mrtvém čase. Z tohoto důvodu bylo prováděno testování nejvhodnější mobilní fáze, kdy alkalizace na pH = 10 situaci nijak nezlepšila. Úspěšnější bylo testování MF s 1 % ACN a 0,05M- Na_2HPO_4 . Takto upravená MF na pH = 6,5 způsobila eluci morfinu v osmnácté minutě. Následné zvýšení obsahu ACN na 5 % posunulo pík morfinu k šesté minutě. Takto připravená MF byla použita pro měření stability. Při HPLC analýze se v naměřených chromatogramech neobjevovaly žádné nové píky. Plocha píku morfinu zůstávala rovněž konstantní.

Obdobná situace byla i v případě MS analýzy, kdy se ve výsledných spektrech neobjevovaly žádné nové ionty, které by nasvědčovaly změnám ve složení roztoku.

V kladném módu ESI+ byl vždy viditelný ion s m/z 286 (obr. 7). V případě ESI- docházelo k mnohem horší ionizaci, ion s m/z 284 měl pokaždé velmi malou intenzitu (obr. 8). Ion dimeru morfinu s m/z 569 nebyl ve spektru zaznamenán ani při fokusaci na tento ion.

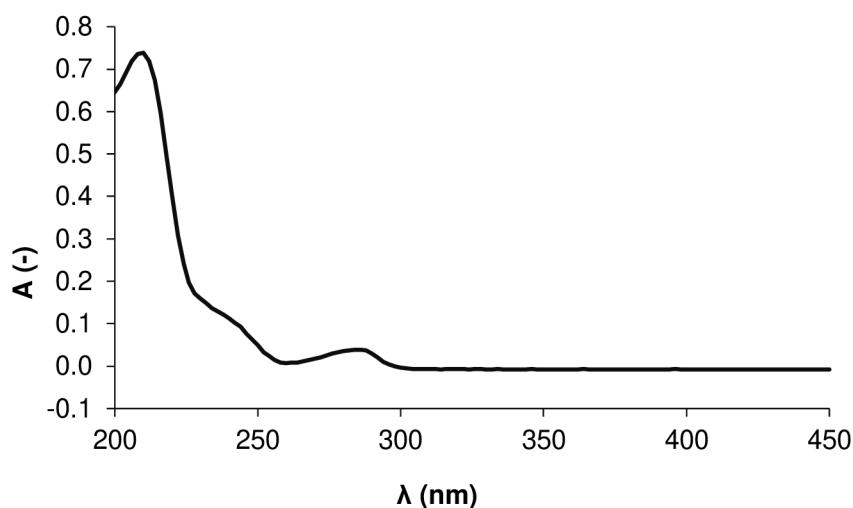


Obr. 7 - Hmotnostní spektrum morfinu v kladném módu ESI+



Obr. 8 - Hmotnostní spektrum morfinu v negativním módu ESI-

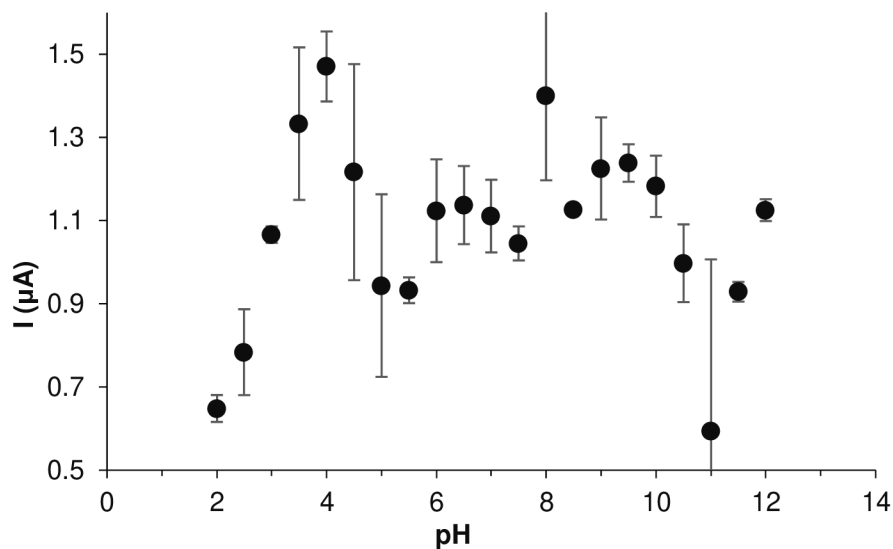
Metodou UV spektrometrie bylo taktéž prokázáno, že během více než dvou měsíců nedochází ve vodném roztoku morfinu ke změnám. Ve výsledném spektru, které se v průběhu dnů neměnilo, byla zaznamenána dvě absorpční maxima při vlnové délce 210 nm a 286 nm (obr. 9).



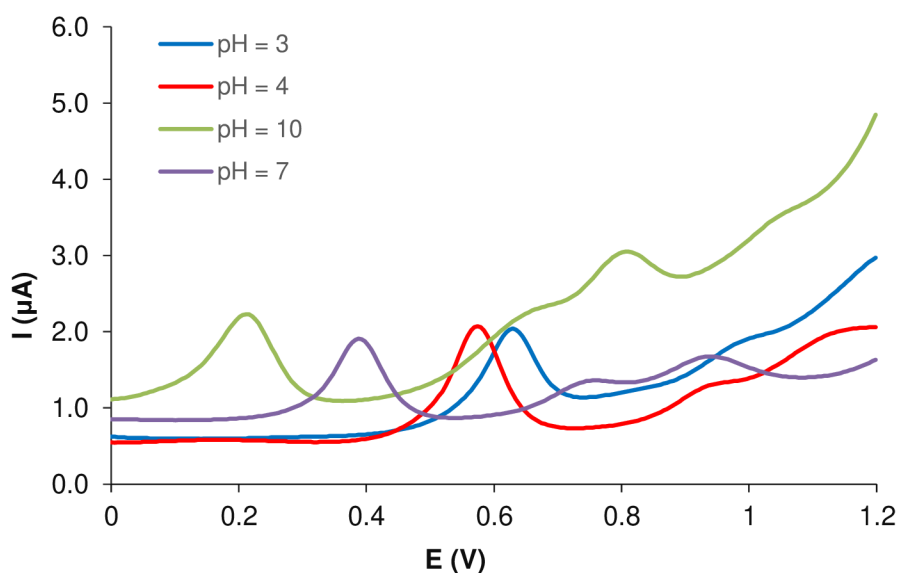
Obr. 9 - UV-vis spektrum vodného roztoku morfinu

4.2 DPV závislost na pH

Je známo, že acidita prostředí ovlivňuje elektrochemické chování organických látek. Proto byla u morfinu sledována metodou DPV závislost proudové odezvy na pH základního elektrolytu. Jak je patrné z obr. 10, byla nejvyšší odezva proudu zaznamenána v okolí hodnoty $\text{pH} = 4$ a při $\text{pH} = 8$. Při bližším prozkoumání jednotlivých voltamogramů bylo pro voltametrické analýzy zvoleno jako nejvhodnější $\text{pH} = 4$. Pík při tomto pH měl nejvyšší proudovou odezvu a jeho tvar byl lepší, než v případě $\text{pH} = 8$, při němž měl morfin druhou nejvyšší proudovou odezvu. Avšak potenciál píku při $\text{pH} = 8$ byl výrazně nižší a současně se v alkalických roztocích na voltamogramech objevují další dva píky při vyšších potenciálech (obr. 11), což nasvědčuje složitějším reakčním mechanismům.

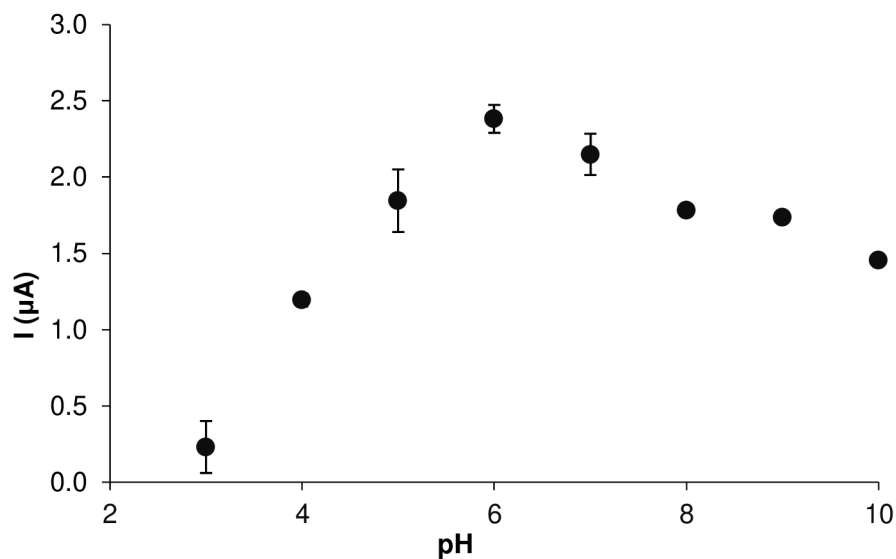


Obr. 10 - Závislost odezvy morfinu na pH elektrolytu

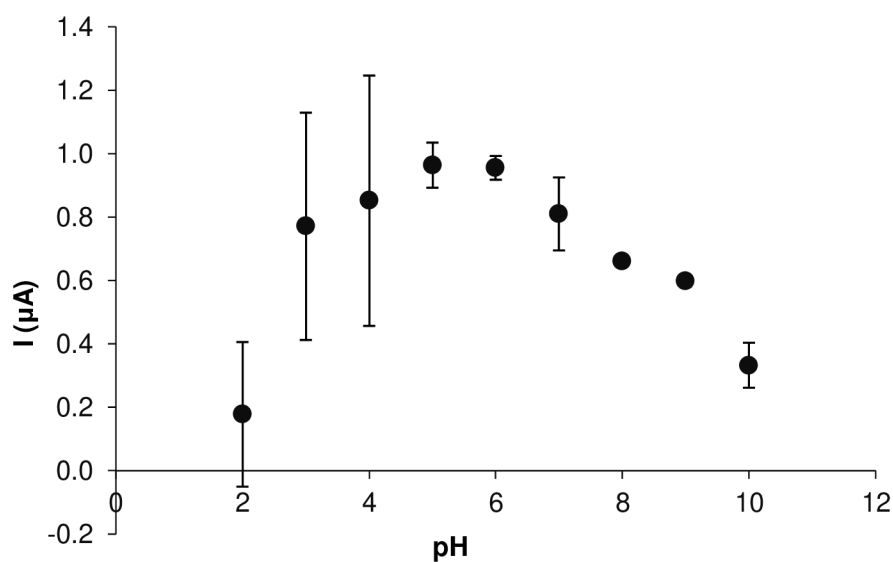


Obr. 11 - Voltamogram získaný metodou DPV pro vybrané hodnoty pH

V případě heroinu bylo jako nejvhodnější pH jednoznačně zvoleno pH = 6, při kterém byla zaznamenána nejvyšší proudová odezva (obr. 12). Pro analýzy kodeinu bylo zvoleno rovněž pH = 6, které má proudovou odezvu srovnatelnou s odezvou při pH = 5,5, ale pH = 6 je vhodnější vzhledem k menšímu rozptylu proudových hodnot při opakovaných měřeních (obr. 13).



Obr. 12 - Závislost odezvy heroinu na pH elektrolytu



Obr. 13 - Závislost odezvy kodeinu na pH elektrolytu

4.3 Elektrolýzy

Bylo provedeno několik sérií elektrolýz morfinu za různých podmínek. Vzniklé elektrolýzáty byly podrobeny LC-MS analýze pro získání informací o hlavních produktech, které vznikají elektrochemickou oxidací morfinu. Všechna měření byla prováděna v kladném módu ionizace elektrosprejem a získané ionty odpovídají protonovaným molekulám produktů $[M+H]^+$.

4.3.1 Volba vhodného prostředí pro elektrolýzu morfinu

Při testování elektrolýzy morfinu na Pt síťkové elektrodě a CFBE byl sledován vliv různých rozpouštědel (voda, metanol/voda, acetonitril/voda, acetonitril) na celkovou konverzi morfinu a vznikající produkty. Konverze morfinu na Pt elektrodě proběhla ve vodě z 99,5 %, ve směsi metanol/voda z 87,7 % a ve směsi acetonitril/voda z 96,2 %. Přehled iontů získaných LC-MS analýzou (ESI+), které souvisejí s morfinem, je v tabulce 4. Ve vodném prostředí vznikal nejvíce dvakrát hydroxylovaný morfin s m/z 318. Ve směsi metanol/voda byl nejvíce zastoupen ion s m/z 316, který odpovídá *o*-metoxymorfinu. Ve směsi acetonitril/voda vznikal nejvíce dimer s m/z 569, který v podobné míře vznikal také v metanolu, kdežto ve vodě prakticky nebyl přítomen.

Tabulka 4 - Přehled iontů získaných LC-MS analýzou (ESI+) elektrolyzátů morfinu v různých prostředích

Prostředí elektrolýzy	Látka	t_R (min)	m/z [M+H] ⁺	dtm mDa	Plocha píku extrahovaného iontu
Voda	Morfin	4,08	286,1484	4,1	6610
	<i>o</i> -chinon	2,06	300,1259	2,3	26580
	Hydroxymorfin	3,82	302,1433	4,1	1698
	Dihydroxychinonmethid	4,88	316,1235	5,0	2197
	Dihydroxymorfin	3,25	318,1390	4,9	77 196
	Dimer	4,28	569,2714	6,2	283
Metanol/voda	Morfin	4,08	286,1484	4,1	154 253
	<i>o</i> -metoxymorfin	4,25	316,1600	5,1	192 033
	Dihydroxymorfin	3,25	318,1390	4,9	6689
	Dimer	4,25	569,2714	6,2	13 687
Acetonitril/voda	Morfin	4,08	286,1484	4,1	47 190
	Hydroxymorfin	3,84	302,1433	4,1	1399
	Dihydroxychinonmethid	4,88	316,1235	5,0	1360
	Dihydroxymorfin	3,25	318,1390	4,9	5104
	Dimer	4,27	569,2750	9,8	14 043

V případě elektrolýzy na CFBE byla po 10 minutách konverze morfinu velmi nízká. Ve vodě se přeměnilo pouze 25,2 %, ve směsi metanol/voda 13,1 %, ve směsi acetonitril/voda 57,4 % a v bezvodém acetonitrilu 75,1 % morfinu. Z toho lze usuzovat, že CFBE je vhodnější právě pro bezvodé prostředí. Nevýhodou je zde také skutečnost, že ve vodném prostředí byly ve spektru nalezeny pouze ionty s m/z 286 (morfin), 360 (dvakrát hydroxylovaný morfin s navázaným acylem) a 569 (dimer). CFBE není vhodnou elektrodou pro vodné prostředí, protože vzniká především dimer, a navíc se vzniklé produkty mohou adsorbovat na hydrofobní povrch CFBE. Ve směsi metanol/voda je situace o něco

lepší, protože ve velké míře vznikl ion m/z 316 (cca 12,3 % původního morfinu), ale také se zde objevoval dimer. Ve směsi acetonitril/voda vznikaly jako hlavní produkty jednou hydroxylovaný morfin (m/z 302) a dimer. V obou směsných prostředích se hojně vyskytoval ion m/z 360. V bezvodém acetonitrilu se elektrolyzou na CFBE morfin oxidoval hlavně na hydroxymorfin (m/z 302) a dimer (m/z 569).

Ze získaných výsledků je patrné, že v různých prostředích se vznikající produkty liší jen nepatrně. CFBE je vhodná především pro nevodné prostředí, protože zde organické rozpouštědlo do jisté míry zabraňuje adsorpci vznikajících látek na povrchu elektrody. Z hlediska konverze morfinu je však lepší platinová elektroda, a to především ve vodě. Další výhodou platinové elektrody je skutečnost, že téměř nevzniká dimer morfinu.

4.3.2 Srovnání elektrolyzy v octanu amonném a mravenčanu amonném při různém pH

Při elektrolyzách v různých elektrolytech na Pt síťkové elektrodě bylo zjištěno, že po 30 minutách elektrolyzy dochází ke konverzi morfinu v octanu amonném z 99,8 % při $\text{pH} = 3$ a z 99,1 % při $\text{pH} = 7$. V mravenčanu amonném byla konverze nižší, přeměnilo se 92,1 % morfinu při $\text{pH} = 3$ a 92,3 % při $\text{pH} = 7$. Je tedy zřejmé, že elektrolyzy probíhají účinněji v prostředí octanu amonného.

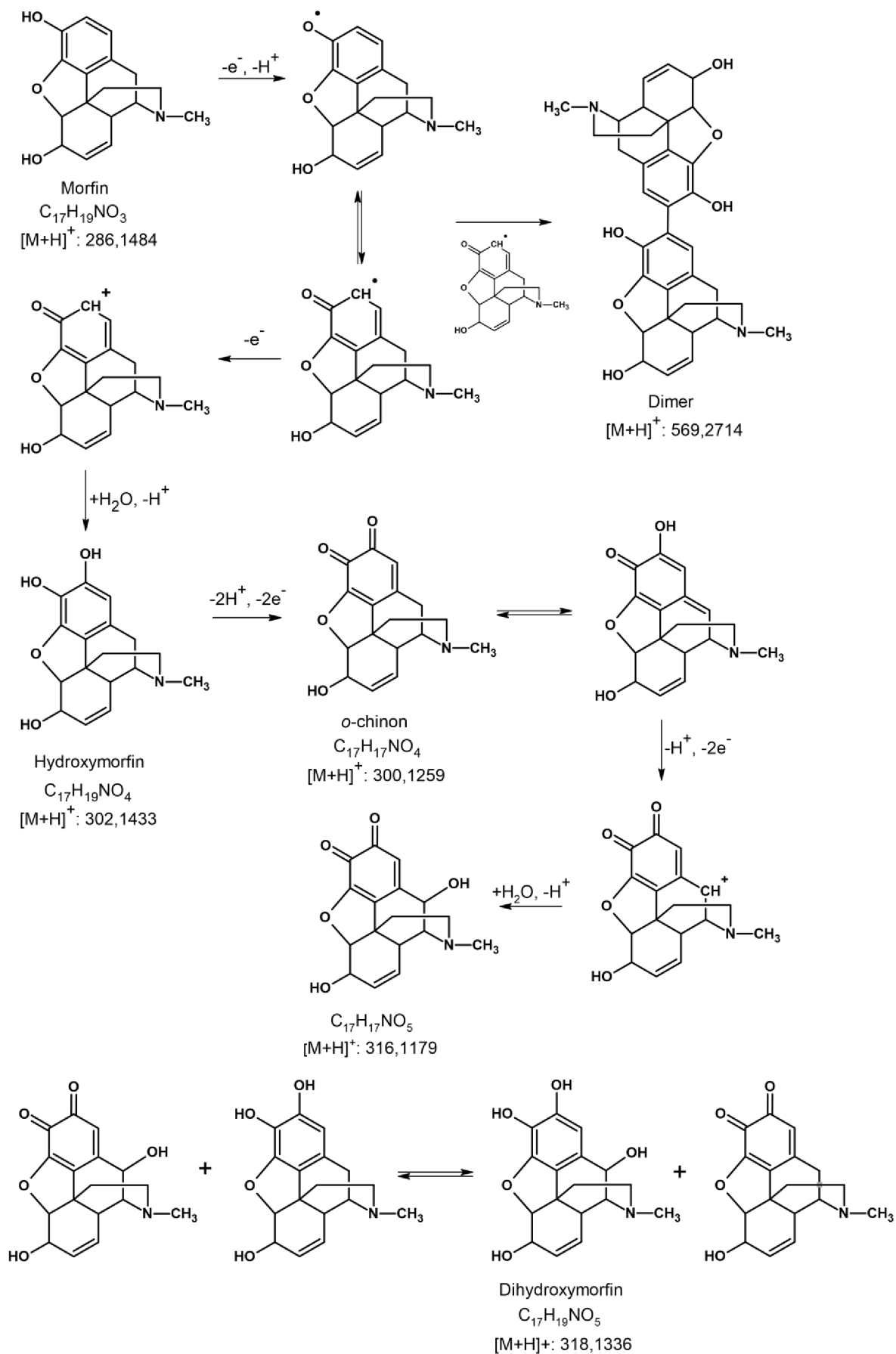
Z hlediska analyzovaných produktů je v octanu i mravenčanu nejvíce zastoupený ion s m/z 318, který odpovídá dvakrát hydroxylovanému morfinu. Jeho množství v mravenčanu amonném však bylo poloviční oproti octanu. Další důležité ionty, které se vyskytují v obou elektrolytech, jsou ionty s m/z 300 a 302. I v tomto případě je však množství těchto produktů v mravenčanu výrazně nižší než v octanu. Proto byl octan amonný vybrán jako vhodnější elektrolyt pro elektrolyzy morfinu.

4.3.3 Pozorované produkty a navržené schéma elektrochemické oxidace morfinu v octanu amonném

Jak již bylo zmíněno, konverze morfinu v octanu amonném byla o něco větší v kyselém prostředí než v neutrálním (99,8 % při $\text{pH} = 3$ oproti 99,1 % při $\text{pH} = 7$). Dále byla sledována elektrolyza morfinu v alkalickém prostředí $\text{pH} = 10$ při třech různých potenciálech 0,3 V; 0,7 V a 1,3 V, které odpovídají jednotlivým voltametričtým píkům oxidace morfinu při tomto pH . Při těchto experimentech však nebylo s jistotou určeno, kolik morfinu se elektrochemicky přeměnilo, protože na voltamogramu po 30minutové oxidaci při potenciálu

1,3 V nebyl pozorován pík morfinu, ovšem v LC-MS analýze byl sledován ion s m/z 286, který měl lehce vyšší retenci oproti standardu morfinu. Nevýhodou zde bylo měření na hmotnostním spektrometru s nízkým rozlišením, které neumožnilo určit, zda se opravdu jedná o morfin, nebo jinou protonovanou molekulu, která má shodné $m/z = 286$. Dále bylo zjištěno, že při potenciálu 0,3 V vznikají převážně dimer ($m/z = 569$) a *o*-chinon ($m/z = 300$), při 1,3 V je hlavním produktem již zmiňovaný ion s m/z 286. Monomerní produkty s m/z 300 a 318 pak vznikají při potenciálu 0,7 V.

Obdobně jako v alkalickém prostředí byl ion s m/z 318 sledován také v kyselém a neutrálním pH. Dále pak byly sledovány ionty s m/z 300 a 316, které však v kyselém prostředí vznikají ve větším množství. Nejlepším prostředím pro elektrochemickou oxidaci morfinu se tak jeví octan amonný o pH = 3. Při experimentech v tomto prostředí bylo sledováno několik iontů, které souvisejí s morfinem. Hlavním produktem byla vždy protonovaná molekula s $m/z = 318$. Dále se v porovnání s intenzitou iontu $m/z = 318$ ve spektrech ve větším množství objevuje ion s m/z 300 a v menší míře ionty s m/z 302, 316 a 569.



Obr. 14 - Navržené schéma elektrochemické oxidace morfinu ve vodném prostředí o $pH = 3$

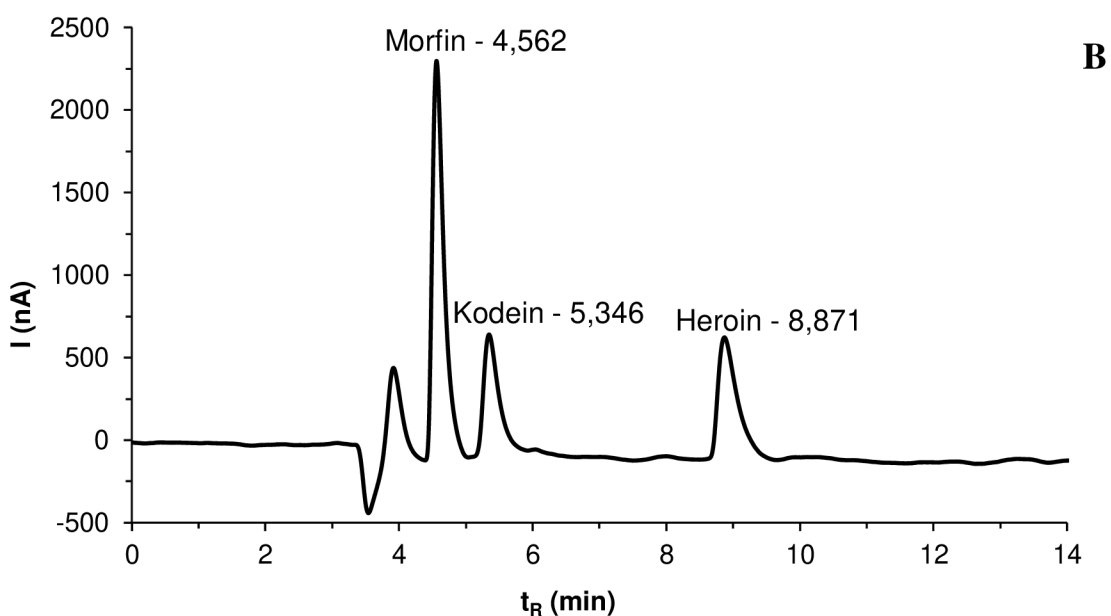
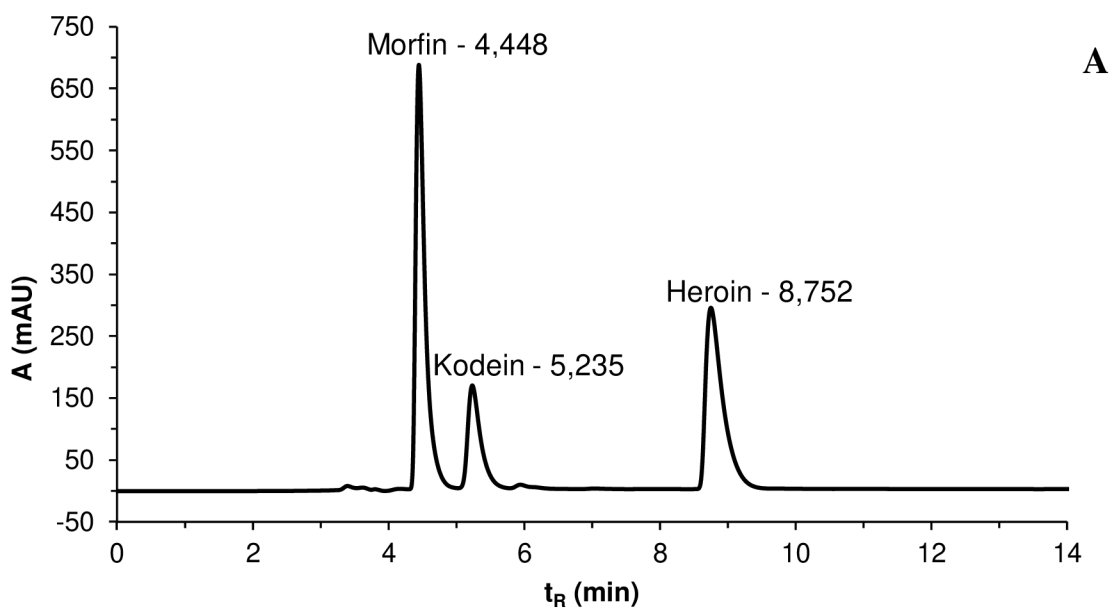
Na základě výsledků LC-MS analýz roztoků po elektrochemické oxidaci za konstantního potenciálu bylo navrženo schéma elektrochemické oxidace morfinu ve vodném roztoku o pH 3 (obr. 14). V prvním kroku dochází k jednoelektronové oxidaci fenolové skupiny v poloze C3 za vzniku radikálu, který může tvořit dimery ($[M+H]^+$ s m/z 569) nebo se dále oxiduje na reaktivní fenoxylový kation. Ten je nukleofilně atakován vodou za vzniku hydroxylovaného (mezi)produktu ($[M+H]^+$ s m/z 302). Morfin hydroxylovaný v poloze 2 se může dále dvouelektronově oxidovat na *o*-chinon ($[M+H]^+$ s m/z 300). Jeho tautomerní chinonmethidová forma může podléhat další dvouelektronové oxidaci a na vzniklý kation se aduje voda za vzniku hydroxy-*o*-chinonu s $[M+H]^+$ o m/z 316. Hydroxy-*o*-chinon v roztoku může být redukován hydroxymorfinem za vzniku hlavního reakčního produktu, dihydroxymorfinu, s $[M+H]^+$ o m/z 318.

4.4 HPLC analýza

4.4.1 Volba mobilní fáze

Při hledání nejvhodnější MF byla použita směs ACN:NaH₂PO₄ (20 mmol/l, pH = 6). Jako první byla testována směs ACN:NaH₂PO₄ v poměru 10:90. Při použití této MF lze na výsledných chromatogramech vidět dobře separované píky morfinu, kodeinu a heroinu. Nevýhodou zde je dlouhá doba analýzy, a to přibližně 20 minut (příloha 2). Obdobnou situaci lze vidět i v případě směsi ACN:NaH₂PO₄ v poměru 15:85, kde doba analýzy činila přibližně 15 minut (příloha 3). Jako nejvýhodnější MF, při které docházelo k úplné separaci jednotlivých opioidů a zároveň se podařilo snížit dobu analýzy na přibližně 10 minut, byla zvolena směs ACN:NaH₂PO₄ v poměru 20:80 (obr. 15). Takto připravená MF byla použita pro všechny další analýzy.

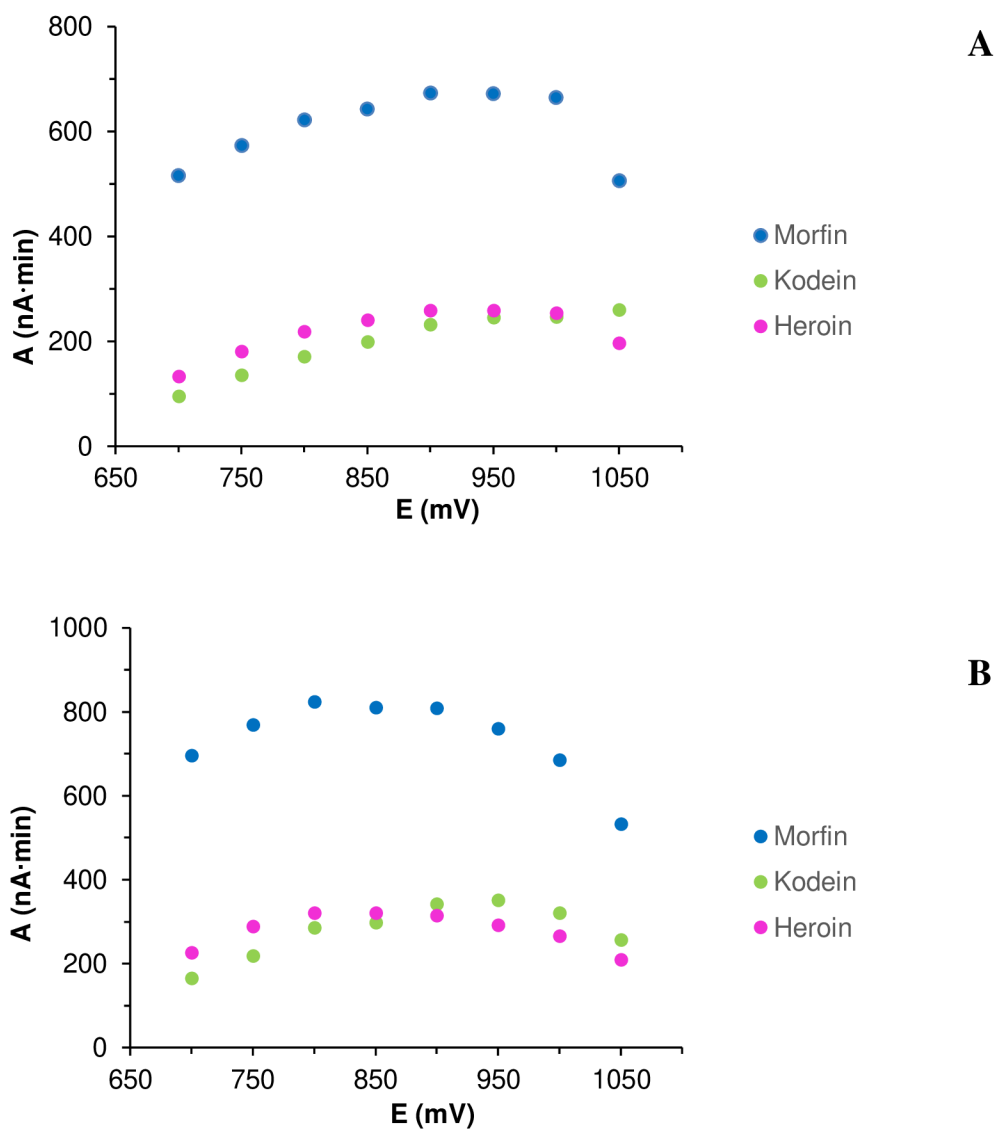
Experimentálně bylo zjištěno, že se zvyšováním obsahu ACN se podstatně snižuje retence heroinu. U dalších dvou analytů je ale snižování retence pouze nepatrné.



Obr. 15 - Chromatogramy získané metodou HPLC pro MF ACN:NaH₂PO₄ v poměru 20:80 pomocí UV detekce (A) a EC detekce (B)

4.4.2 Hydrodynamické voltamogramy

Hydrodynamické voltamogramy roztoku obsahujícího směs morfinu, kodeinu a heroínu byly měřeny v rozsahu potenciálů 700 až 1050 mV nastavovaných stejně na obě pracovní elektrody (kanál ECD1 a ECD2). Průběh obou naměřených voltamogramů (obr. 16) byl velice podobný a po jejich vyhodnocení byl jako nejvhodnější potenciál pro následující HPLC analýzy zvolen potenciál 900 mV.

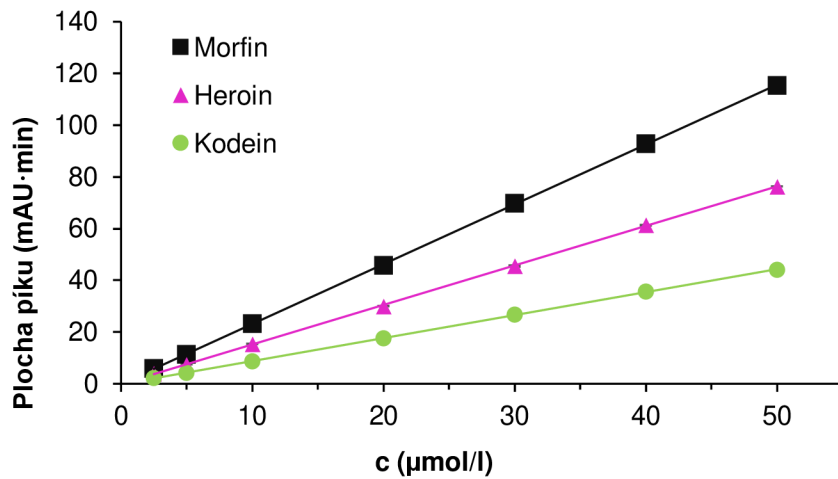


Obr. 16 - Hydrodynamické voltamogramy morfinu, kodeinu a heroínu získané EC detekcí na kanálu ECD1 (A) a kanálu ECD2 (B)

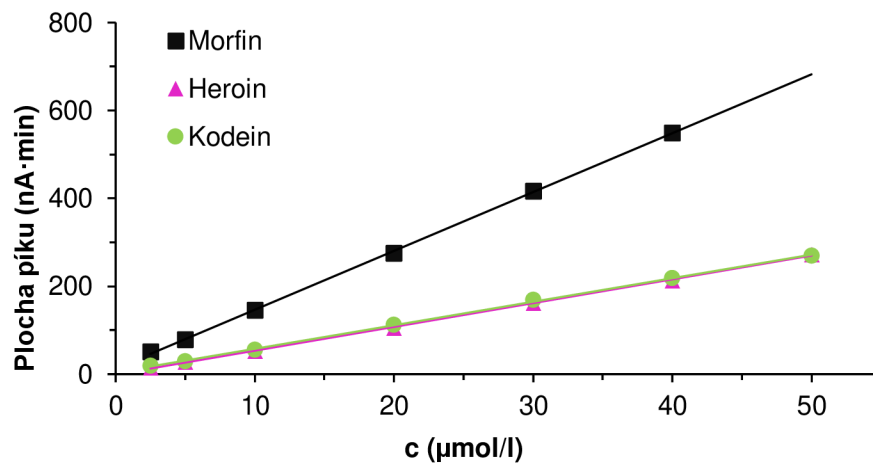
4.4.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroínu byly zkonstruovány v koncentračním rozsahu $5 \cdot 10^{-5}$ až $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l s využitím UV i EC detektoru.

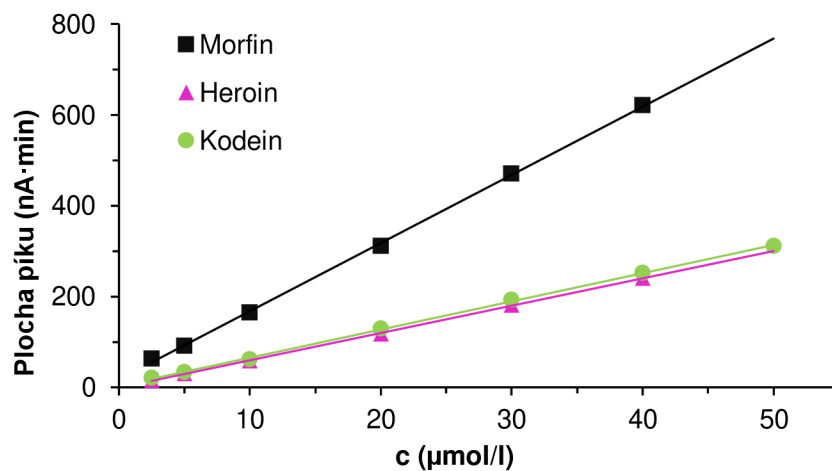
Jednotlivé závislosti včetně chybových úseček získané pomocí UV detekce lze vidět na obr. 17, pomocí ECD1 na obr. 18 a ECD2 na obr. 19. Získané regresní parametry a meze detekce pro morfin, kodein a heroin získané UV detekcí lze vidět v tabulce 5, ECD1 detekcí v tabulce 6 a ECD2 detekcí v tabulce 7. Meze detekce a stanovitelnosti byly vypočítány přímou metodou signálu podle IUPAC [66]. Pro všechny analyty jsou hodnoty LOD a LOQ pro oba typy detekce řádově srovnatelné.



Obr. 17 - Graf kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroinu získaný pomocí UV detekce



Obr. 18 - Graf kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroinu získaný detekcí ECD1



Obr. 19 - Graf kalibrační závislosti morfinu, kodeinu a heroinu získaný detekcí ECD2

Tabulka 5 - Regresní parametry kalibračních závislostí a kalibrační meze pro morfin, kodein a heroin získané pomocí UV detekce

UV	Směrnice $a \pm s_a$ (mAu·min·l/μmol)	Úsek $b \pm s_b$ (mAu·min)	R	LOD (μmol/l)	LOQ (μmol/l)	LDR (μmol/l)
Morfin	2,3135 ± 0,0072	-	1,0000	0,29	0,87	2,5–50
Kodein	0,8888 ± 0,0031	-	1,0000	0,32	0,95	2,5–50
Heroin	1,5279 ± 0,0063	-	1,0000	0,39	1,15	2,5–50

Tabulka 6 - Regresní parametry kalibračních závislostí a kalibrační meze pro morfin, kodein a heroin získané pomocí detekce ECD1

ECD1	Směrnice $a \pm s_a$ (nA·min·l/μmol)	Úsek $b \pm s_b$ (nA·min)	R	LOD (μmol/l)	LOQ (μmol/l)	LDR (μmol/l)
Morfin	13,392 ± 0,111	12,6 ± 2,5	0,9999	0,66	1,93	2,5–40
Kodein	5,357 ± 0,057	-	0,9997	1,00	2,92	2,5–50
Heroin	5,410 ± 0,052	-	0,9998	0,90	2,63	2,5–50

Tabulka 7 - Regresní parametry kalibračních závislostí a kalibrační meze pro morfin, kodein a heroin získané pomocí detekce ECD2

ECD2	Směrnice $a \pm s_a$ (nA·min·l/μmol)	Úsek $b \pm s_b$ (nA·min)	R	LOD (μmol/l)	LOQ (μmol/l)	LDR (μmol/l)
Morfin	15,004 ± 0,164	17,6 ± 3,7	0,9998	0,86	2,51	2,5–40
Kodein	6,203 ± 0,062	-	0,9998	0,93	2,72	2,5–50
Heroin	6,012 ± 0,047	-	0,9999	0,62	1,82	2,5–40

4.4.4 Analýza krevního séra

Při analýze krevního séra docházelo k dobré separaci všech analytů i vnitřního standardu až na základní linii, a to jak ve vzorku deproteinovaném metanolem, tak acetonitrilem (příloha 4). Projevil se zde však zásadní rozdíl ve velikosti píku mrtvého času, kdy v metanolu byl tento pík až za hranicí měřitelného rozsahu detektorů, v acetonitrilu byl

o poznání nižší. Z toho lze usuzovat, že při deproteinaci metanolem zůstává ve finálním vzorku velké množství balastních látek. Pro další analýzu tak byl vybrán acetonitril jako vhodnější deproteinační činidlo.

Pro kvantifikaci analytů byly použity dvě metody – vnitřního standardu a standardních přídavek. Jako vnitřní standard byl zvolen 4-etoxyfenol, který se separuje od všech analytů, je elektrochemicky aktivní a běžně se nenachází v krvi. Zvolené koncentrace analytů (viz 3.3.5) jsou v oblasti toxické koncentrace morfinu a kodeinu [67].

Tabulka 8 - Koncentrace analytů v krevním séru stanovené metodou vnitřního standardu

Látka	Metoda	UV		ECD1		ECD2	
		Stanoveno (μmol/l)	Relativní odchylka (%)	Stanoveno (μmol/l)	Relativní odchylka (%)	Stanoveno (μmol/l)	Relativní odchylka (%)
Morfin	a)	1,35	-72,98	1,80	-64,07	1,73	-65,48
	b)	1,98	-60,40	2,53	-49,38	2,45	-50,97
Kodein	a)	1,83	-63,39	3,29	-34,11	2,68	-46,45
	b)	3,10	-37,98	5,23	4,61	5,20	3,92
Heroin	a)	0,48	-90,27	0,98	-80,39	0,78	-84,26
	b)	1,54	-69,29	2,24	-55,21	2,31	-53,79

Stanovené koncentrace všech tří analytů metodou vnitřního standardu a jejich relativní odchylky vůči původní koncentraci (5 μmol/l) jsou uvedeny v tabulce 8. Ze získaných dat je jasné vidět, že metoda vnitřního standardu je v tomto případě značně nespolehlivá, kdy se relativní chyby pohybují obvykle nad 50 % a v případě heroinu je chyba až -90,27 % na UV detektoru a kolem -80 % na elektrochemickém detektoru (v případě metody přípravy vzorků a), u metody b) je situace o něco lepší). Důvodem velké nepřesnosti metody vnitřního standardu může být špatně zvolený standard, který se v daném postupu přípravy vzorku může chovat odlišně od sledovaných analytů.

Tabulka 9 - Koncentrace analytů stanovené v krevním séru metodou standardního přídávku

Látka	Metoda	UV		ECD1		ECD2	
		Stanovené ($\mu\text{mol/l}$)	Relativní odchylka (%)	Stanovené ($\mu\text{mol/l}$)	Relativní odchylka (%)	Stanovené ($\mu\text{mol/l}$)	Relativní odchylka (%)
Morfin	a)	4,06	-18,83	3,66	-26,73	3,99	-20,30
	b)	4,16	-16,90	3,56	-28,85	3,34	-33,17
Kodein	a)	4,46	-10,90	4,66	-6,74	3,98	-20,33
	b)	6,66	33,23	6,19	23,80	5,87	17,39
Heroin	a)	1,79	-64,26	2,59	-48,17	2,13	-57,48
	b)	4,30	-14,09	4,57	-8,51	4,40	-11,98

Metoda standardního přídávku (tabulka 9) poskytuje daleko lepší výsledky než metoda vnitřního standardu.

Analýza morfinu ukazuje pouze nepatrné rozdíly mezi metodami přípravy vzorku a) a b) na všech detektorech, přičemž stanovená koncentrace je vždy o něco nižší než původní koncentrace ve vzorku.

V případě kodeinu je situace odlišná, protože v případě zpracování metodou b) byly vždy nalezeny vyšší koncentrace. Vzhledem k relativním odchylkám je však zřejmě lepší metoda zpracování a), tedy nechat vzorek se standardním přídávkem stát delší dobu, ovšem dochází tak ke zbytečnému prodloužení analýzy.

Analýza heroinu naopak jednoznačně ukazuje, že lepší metodou stanovení je metoda b) s kratší dobou stání vzorku po přidání přídávku. Celkově je však důležitá skutečnost, že kodein i heroin se v těle metabolizují na morfin, u něhož se prakticky neprojevil vliv metody přípravy vzorku.

4.4.5 Analýza moči

Při stanovení opioidů v moči (příloha 5) byla používána pouze metoda vnitřního standardu. Zásadním rozdílem u tohoto typu vzorku byla koeluce nečistoty v elučním čase kodeinu. To se negativně projevilo na výsledných stanovených koncentracích. Menší koeluce se projevila také v případě morfinu, proto bylo přistoupeno ke korekci na pozadí, která byla provedena odečtením ploch nečistot naměřených ve slepých pokusech od ploch piků

ve vzorku. Tato korekce byla provedena pro morfin na UV i elektrochemickém detektoru, v případě kodeinu byla korekce nutná pouze pro elektrochemický detektor. Pro heroin nebyla korekce nutná. Zjištěné koncentrace a jejich relativní odchylky od původní koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$ jsou uvedeny v tabulce 10. Koncentrace analytu 5 $\mu\text{mol/l}$ (přidaného ke vzorku čisté moči) byla zvolena stejná jako při analýze krevního séra, protože opioidy se z těla vylučují převážně močí a do určité míry (cca 10 %) v původní nezměněné formě, proto lze v praxi očekávat jejich obdobné a větší koncentrace než v krevním séru [68]).

Tabulka 10 - Koncentrace analytů stanovené v moči metodou standardního přidavku

Látka	Korekce na pozadí	UV		ECD1		ECD2	
		Stanovené ($\mu\text{mol/l}$)	Relativní odchylka (%)	Stanovené ($\mu\text{mol/l}$)	Relativní odchylka (%)	Stanovené ($\mu\text{mol/l}$)	Relativní odchylka (%)
Morfin	Ne	6,17	23,41	4,72	-5,53	4,21	-15,86
	Ano	3,47	-30,60	4,09	-18,11	3,45	-30,95
Kodein	Ne	2,86	-42,81	9,94	98,88	10,5	109,94
	Ano	2,86	-42,81	7,02	40,49	8,35	66,98
Heroin	Ne	4,00	-19,92	4,24	-15,26	3,88	-22,42

Ze získaných výsledků je zřejmé, že nejvíce se korekce na pozadí projevila při UV detekci morfinu. Došlo k posunutí relativní odchylky z 23,41 % na -30,60 % po korekci, takže zde nečistota značně ovlivňuje signál morfinu. V případě elektrochemického detektoru došlo u morfinu pouze k malému snížení stanovené koncentrace. U kodeinu se korekce na pozadí v elektrochemické detekci projevila také zásadním způsobem, kdy se relativní chyba snížila z 98,88 % na 40,49 %, respektive ze 109,94 % na 66,98 % na druhém kanále. Stále jsou však stanovené koncentrace vyšší oproti původní koncentraci, takže se zde zřejmě projevují ještě další vlivy. V blízkosti píku heroinu nebyly zaznamenány žádné nečistoty, proto nebylo nutné provádět korekci a získané výsledky se pohybují kolem relativní chyby -20 %.

5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá analýzou vybraných opioidů – morfinu, kodeinu a heroinu. Cílem práce bylo popsat elektrochemickou oxidaci morfinu a vyvinout vhodnou HPLC metodu pro stanovení zmíněných opioidů pomocí UV a elektrochemické detekce ve vzorcích krevního séra a moči.

Pro elektrolýzu morfinu byly hledány vhodné podmínky, zejm. prostředí (rozpouštědlo, pH vodného roztoku) a elektrolyt, které by vedly k získání monomerních produktů oxidace morfinu. Byla sledována elektrolýza na platinové síťkové elektrodě a uhlíkové štětičkové elektrodě. Elektrolyzované roztoky byly následně analyzovány pomocí LC-MS s ESI ionizací v pozitivním módu. Bylo zjištěno, že na platinové elektrodě vznikají podobné produkty ve všech prostředích (voda, metanol/voda, acetonitril/voda), ovšem pouze ve vodě vznikalo jen nepatrné množství dimeru. Oproti tomu na uhlíkové elektrodě vznikal především dimer, navíc zřejmě dochází k adsorpci oxidačních produktů na samotné elektrodě. Pro elektrolýzu tak bylo jako nejvhodnější zvoleno vodné prostředí a platinová pracovní elektroda.

Dále byly porovnávány elektrolyty pro elektrolýzu – octan amonný a mravenčan amonný. Větší konverze morfinu probíhala v octanu amonném, který tak byl zvolen jako vhodný elektrolyt. Posléze byl sledován vliv pH na vznikající produkty. Hlavním oxidačním produktem s $[M+H]^+$ m/z 318 je dvakrát hydroxylovaný morfin, který v největším množství vznikal v kyselém prostředí $pH = 3$. Elektrolýzou v octanu amonném při $pH = 3$ byly sledovány vznikající produkty a následně bylo navrženo schéma elektrochemické oxidace morfinu.

Při vývoji HPLC metody byla jako nejvhodnější mobilní fáze zvolena směs acetonitrilu a fosfátového pufru (20 mmol/l, $pH = 6$) v poměru 20:80 (rychlost průtoku 0,5 ml/min) ve spojení s kyano kolonou a detekcí při 210 nm a 900 mV na elektrochemickém detektoru. Za těchto podmínek docházelo k separaci morfinu, kodeinu a heroinu na základní linii s celkovou dobou analýzy 10 minut.

Nalezené separační podmínky byly použity k sestrojení kalibračních závislostí jednotlivých opioidů a určení jejich kalibračních mezí. Limity detekce se na UV detektoru pohybují řádově v desetinách $\mu\text{mol/l}$, na elektrochemickém detektoru pak od 0,5–1 $\mu\text{mol/l}$. Metoda byla použita pro analýzu reálných vzorků – krevního séra a moči.

Úprava a analýza krevního séra spočívala v jednoduché deproteinaci metanolem nebo acetonitrilem, následném odebrání supernatantu po centrifugaci, odpaření a rekonstituování v mobilní fázi. Jako vhodnější deproteinační činidlo byl zvolen acetonitril. Testovány byly také dvě kvantifikační metody, kdy byl pro metodu vnitřního standardu použit 4-etoxyfenol. Tato metoda však neposkytovala správné výsledky ve srovnání s metodou standardního přídatku.

V případě analýzy moči byla provedena extrakce do chloroformu, odpaření rozpouštědla dusíkem a rekonstituování odparku v mobilní fázi. Stanovení všech tří opioidů v této matrici bylo provedeno pouze metodou standardního přídatku. Problémem zde byla koeluce morfinu a kodeinu s nečistotami ze vzorku, čímž došlo ke značnému ovlivnění výsledků, především u kodeinu. Do jisté míry pomohla problém odstranit korekce na pozadí slepého pokusu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] M. Balíková: *Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*. Galén, Praha, 2004.
- [2] K. Kalina: *Drogy a drogové závislosti: mezioborový přístup*. 1. vydání. Úřad vlády České republiky, Praha, 2003.
- [3] J. Kozák, J. Lejčko, I. Vrba: *Opioidy*. 1. vydání. Mladá fronta a. s., Praha, 2018.
- [4] S.D. Comer, C.M. Cahill: Fentanyl: Receptor pharmacology, abuse potential, and implications for treatment. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 106 (2019) 49–57.
- [5] *NARCOTICS DRUGS: estimated world requirements for 2021*. United Nations Publications, NEW YORK, 2021.
- [6] B.M. Kane: *Codeine*. Chelsea House, New York, 2007.
- [7] J. Gerostamoulos, K. Crump, I.M. McIntyre, O.H. Drummer: Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 617 (1993) 152–156.
- [8] P.P. Rop, F. Grimaldi, J. Burle, M.N. De Saint Leger, A. Viala: Determination of 6-monoacetylmorphine and morphine in plasma, whole blood and urine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 661 (1994) 245–253.
- [9] S. Bell: *Drugs, Poisons, and Chemistry*. 1. vydání. Facts on File, USA, 2009.
- [10] M. Borník: *Drogy, co bychom o nich měli vědět*. 1. vydání. Themis, Praha, 2001.
- [11] Rozdělení drog. *Substituční Léčba*. (2022).
- [12] T. Hájková: *Závislost na nealkoholových drogách*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2013.
- [13] B. Levine: *Principles of forensic toxicology*. 4. vydání. AACC Press, Washington DC, 2006.
- [14] M.A. Hoffman, A. Trochta, R.D. Gary, R.L. Fitzgerald, I.M. McIntyre: An evaluation of postmortem concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH). *Forensic Sci. Int.* 315 (2020) 110414.
- [15] M.P. Dybowski, A.L. Dawidowicz: Furanylfentanyl in whole blood measured by GC–MS/MS after QuEChERS extraction in a fatal case. *Forensic Toxicol.* 38 (2020) 496–504.
- [16] P. Saar-Reismaa, E. Erme, M. Vaher, M. Kulp, M. Kaljurand, J. Mazina-Šinkar: In Situ Determination of Illegal Drugs in Oral Fluid by Portable Capillary Electrophoresis with Deep UV Excited Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 90 (2018) 6253–6258.
- [17] J. Bílek: *Vývoj HPLC-FLD metodiky pro forenzní monitoring vybraných drog*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2015.
- [18] J.F. Carter, R. Sleeman, J. Parry: The distribution of controlled drugs on banknotes via counting machines. *Forensic Sci. Int.* 132 (2003) 106–112.
- [19] S. Gumjadi, M. Kommoju: Colorimetric Approaches To Drug Analysis And Applications – A Review. *Am. J. PharmTech Res.* 9 (2019) 14–37.

- [20] R. Pratiwi, E. Noviana, R. Fauziati, D.B. Carrão, F.A. Gandhi, M.A. Majid, F.A. Saputri: A Review of Analytical Methods for Codeine Determination. *Molecules*. 26 (2021) 800.
- [21] J. Langmaier, V. Maier, Z. Samec: Voltammetry of Several Natural and Synthetic Opioids at a Polarized Ionic Liquid Membrane. *ChemElectroChem*. 8 (2021) 2519–2525.
- [22] D.T. Courtwright: *Forces of habit: drugs and the making of the modern world*. Harvard University Press, Cambridge, Mass, 2001.
- [23] H. Nagase, ed.: *Chemistry of Opioids*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011.
- [24] P.J. Larkin, J.A.C. Miller, R.S. Allen, J.A. Chitty, W.L. Gerlach, S. Frick, T.M. Kutchan, A.J. Fist: Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnol. J.* 5 (2007) 26–37.
- [25] J. Perea-Sasiain: Biosynthesis of Morphine: Its Importance in Parkinson's Disease. *Rev Fac Med*. 56 (2008) 161–189.
- [26] A. Maas, B. Madea, C. Hess: Confirmation of recent heroin abuse: Accepting the challenge. *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 54–71.
- [27] Morphine (compound). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Morphine>, staženo 3. února 2022.
- [28] G.D. Busse, D.J. Triggle: *Morphine*. Chelsea House Publishers, New York, 2006.
- [29] Morphine. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00295>, staženo 3. února 2022.
- [30] 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.
- [31] S. De Gregori, M. De Gregori, G.N. Ranzani, M. Allegri, C. Minella, M. Regazzi: Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab. Brain Dis.* 27 (2012) 1–5.
- [32] A. Dasgupta: *Fighting the Opioid Epidemic*. Elsevier, Amsterdam, 2020.
- [33] D.E. Newton: *Prescription drug abuse: a reference handbook*. ABC-CLIO, Santa Barbara, CA, USA, 2015.
- [34] Codeine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284371>, staženo 3. února 2022.
- [35] Codeine. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00318>, staženo 3. února 2022.
- [36] H. Pathan, J. Williams: Basic opioid pharmacology: an update. *Br. J. Pain.* 6 (2012) 11–16.
- [37] S.B. Karch, ed.: *Drug abuse handbook*. 2nd ed. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2007.
- [38] A.G. Macleod, B. Ashford, M. Voltz, B. Williams, T. Cramond, L. Gorta, J. Simpson: Paracetamol Versus Paracetamol-Codeine in the Treatment of Post-Operative Dental Pain: A Randomized, Double-Blind, Prospective Trial. *Aust. Dent. J.* 47 (2002) 147–151.

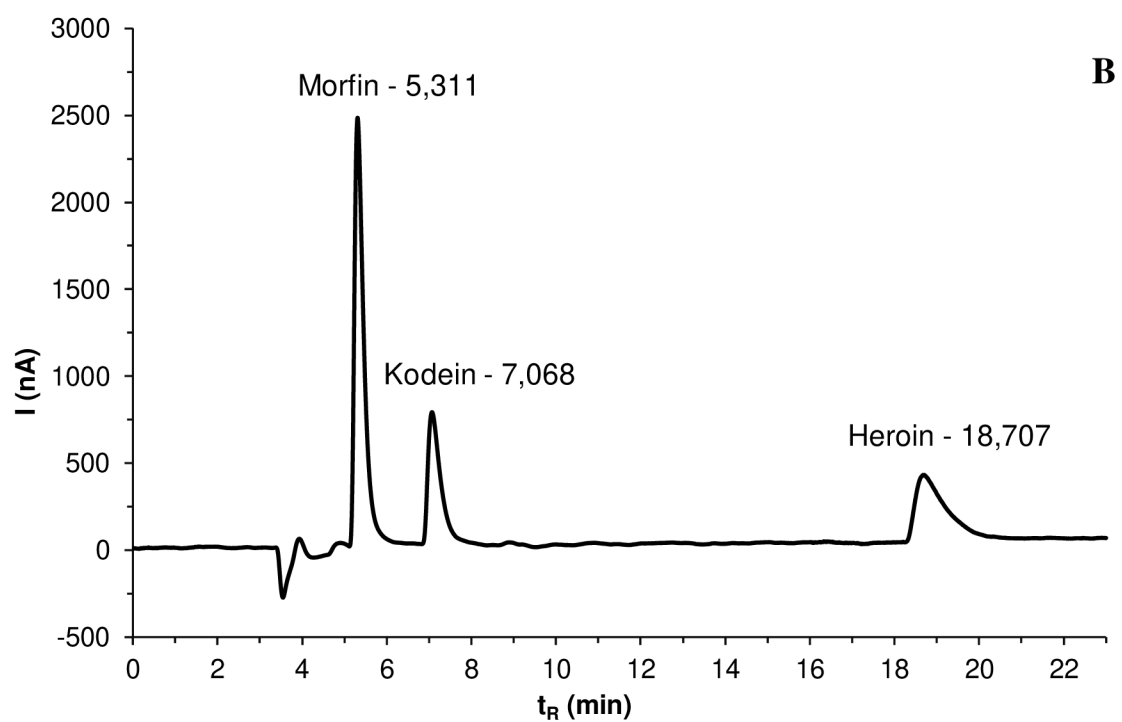
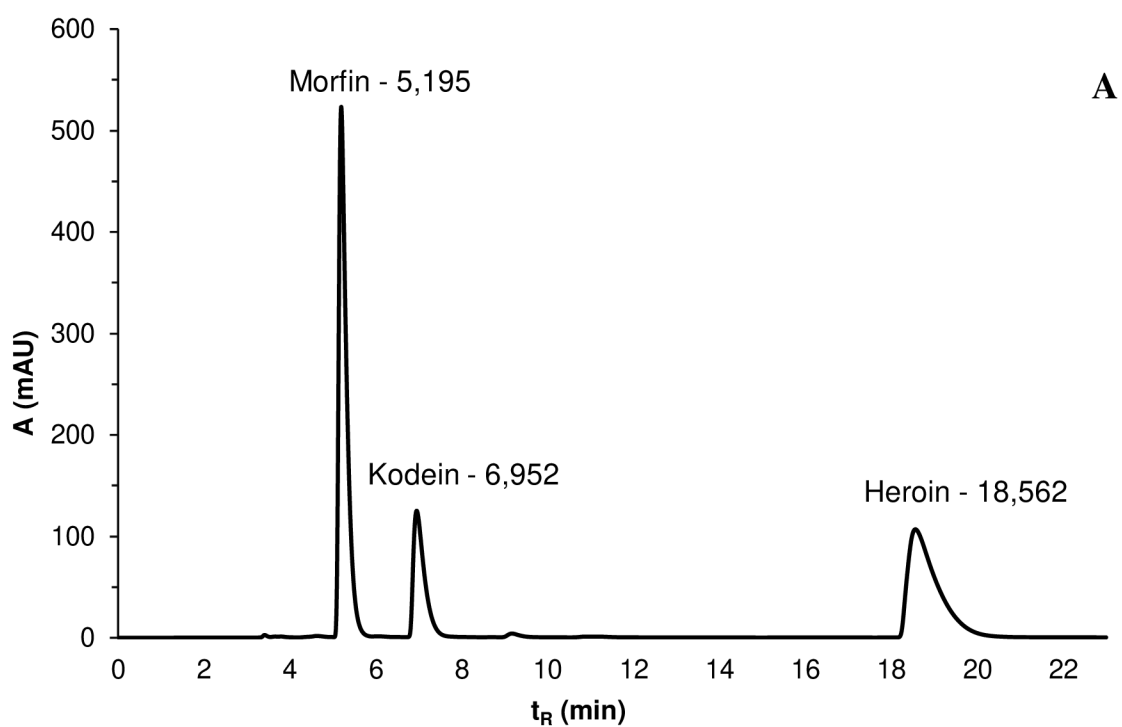
- [39] R.J. Moore, ed.: *Handbook of Pain and Palliative Care: Biopsychosocial and Environmental Approaches for the Life Course*. Springer International Publishing, Cham, 2018.
- [40] J.M.P.J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T.R.A. Macedo, A.M. Oliveira-Brett: Voltammetric Oxidation of Drugs of Abuse III. Heroin and Metabolites. *Electroanalysis*. 16 (2004) 1497–1502.
- [41] P. Blanken, W. van den Brink, V.M. Hendriks, I.A. Huijsman, M.G. Klous, E.J. Rook, J.S. Wakelin, C. Barendrecht, J.H. Beijnen, J.M. van Ree: Heroin-assisted treatment in the Netherlands: History, findings, and international context. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20 (2010) S105–S158.
- [42] Heroin. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heroin>, staženo 3. února 2022.
- [43] Diamorphine. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01452>, staženo 3. února 2022.
- [44] C. Ferreiro: *Heroin*. Chelsea House Publishers, Philadelphia, 2003.
- [45] S.P. Sharma, B.C. Purkait, S.C. Lahiri: Qualitative and quantitative analysis of seized street drug samples and identification of source. *Forensic Sci. Int.* 152 (2005) 235–240.
- [46] J.R. Ehleringer, D.A. Cooper, M.J. Lott, C.S. Cook: Geo-location of heroin and cocaine by stable isotope ratios. *Forensic Sci. Int.* 106 (1999) 27–35.
- [47] L.R. Odell, J. Skopec, A. McCluskey: Isolation and identification of unique marker compounds from the Tasmanian poppy *Papaver somniferum* N. *Forensic Sci. Int.* 175 (2008) 202–208.
- [48] E. Marchei, D. Escuder, C.R. Pallas, O. Garcia-Algar, A. Gómez, B. Friguls, M. Pellegrini, S. Pichini: Simultaneous analysis of frequently used licit and illicit psychoactive drugs in breast milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 309–316.
- [49] H.-R. Lin, K.-I. Choi, T.-C. Lin, A. Hu: Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 929 (2013) 133–141.
- [50] A. Dienes-Nagy, L. Rivier, C. Giroud, M. Augsburg, P. Mangin: Method for quantification of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in human blood by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry for routine analysis in forensic toxicology. *J. Chromatogr. A.* 854 (1999) 109–118.
- [51] P. Fernández, C. Vázquez, L. Morales, A.M. Bermejo: Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *J. Appl. Toxicol.* 25 (2005) 200–204.
- [52] M. Chiarotti, N. Fucci, C. Furnari: Comparative analysis of illicit heroin samples. *Forensic Sci. Int.* 50 (1991) 47–56.
- [53] B.A. Rashid, G.W. Aherne, M.F. Katmeh, P. Kwasowski, D. Stevenson: Determination of morphine in urine by solid-phase immunoextraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 797 (1998) 245–250.
- [54] M. Ebrahimi Rahmani, M. Ansari, M. Kazemipour, M. Nateghi: Selective extraction of morphine from biological fluids by magnetic molecularly imprinted polymers and determination using UHPLC with diode array detection. *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 958–965.

- [55] A. Boojaria, M. Masrournia, H. Ghorbani, A. Ebrahimitalab, M. Miandarhoie: Silane modified magnetic nanoparticles as a novel adsorbent for determination of morphine at trace levels in human hair samples by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 11 (2015) 497–503.
- [56] R. Bade, J.M. White, C. Gerber: Qualitative and quantitative temporal analysis of licit and illicit drugs in wastewater in Australia using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 529–542.
- [57] B.J. Tschärke, C. Chen, J.P. Gerber, J.M. White: Temporal trends in drug use in Adelaide, South Australia by wastewater analysis. *Sci. Total Environ.* 565 (2016) 384–391.
- [58] P. López, D.P.K.H. Pereboom-de Fauw, P.P.J. Mulder, M. Spanjer, J. de Stoppelaar, H.G.J. Mol, M. de Nijs: Straightforward analytical method to determine opium alkaloids in poppy seeds and bakery products. *Food Chem.* 242 (2018) 443–450.
- [59] B. Rezaei, S. Foroughi-Dehnavi, A.A. Ensafi: Fabrication of electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer and nanoparticles for determination trace amounts of morphine. *Ionics.* 21 (2015) 2969–2980.
- [60] A. Aliabadi, G.H. Rounaghi: A novel electrochemical sensor for determination of morphine in a sub-microliter of human urine sample. *J. Electroanal. Chem.* 832 (2019) 204–208.
- [61] S. Barthwal, B. Singh, N.B. Singh: A novel electrochemical sensor fabricated by embedding ZnO nano particles on MWCNT for morphine detection. *Mater. Today Proc.* 5 (2018) 9061–9066.
- [62] H. Bagheri, H. Khoshshafar, A. Afkhami, S. Amidi: Sensitive and simple simultaneous determination of morphine and codeine using a Zn₂SnO₄ nanoparticle/graphene composite modified electrochemical sensor. *New J. Chem.* 40 (2016) 7102–7112.
- [63] G. Bahrami, H. Ehzari, S. Mirzabeigy, B. Mohammadi, E. Arkan: Fabrication of a sensitive electrochemical sensor based on electrospun magnetic nanofibers for morphine analysis in biological samples. *Mater. Sci. Eng. C.* 106 (2020) 110183.
- [64] 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.
- [65] M.-B. Gholivand, A.R. Jalalvand, H.C. Goicoechea, R. Gargallo, T. Skov, G. Paimard: Combination of electrochemistry with chemometrics to introduce an efficient analytical method for simultaneous quantification of five opium alkaloids in complex matrices. *Talanta.* 131 (2015) 26–37.
- [66] IUPAC: *Compendium of Analytical Nomenclature*. Pergamon, Velká Británie, 1978.
- [67] M. Schulz, A. Schmoldt, H. Andresen-Streichert, S. Iwersen-Bergmann: Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. *Crit. Care.* 24 (2020) 195.
- [68] Y.J. Lee, S.-Y. Suh, J. Song, S.S. Lee, A.-R. Seo, H.-Y. Ahn, M.A. Lee, C.-M. Kim, P. Klepstad: Serum and urine concentrations of morphine and morphine metabolites in patients with advanced cancer receiving continuous intravenous morphine: an observational study. *BMC Palliat. Care.* 14 (2015) 53.

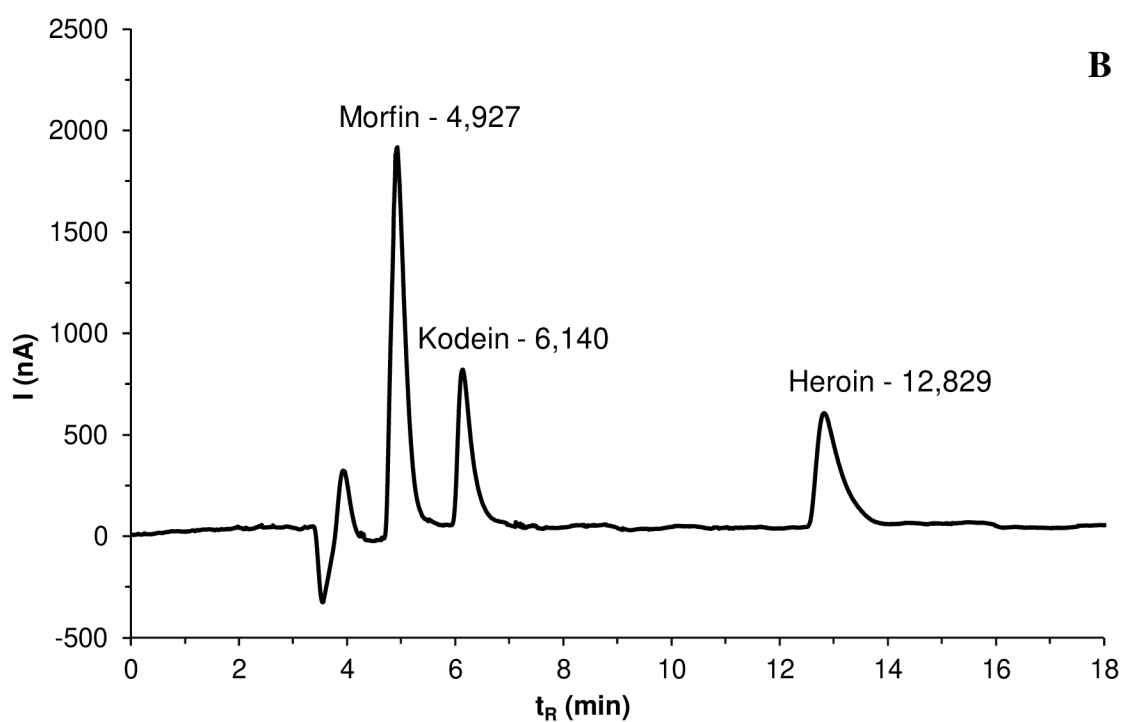
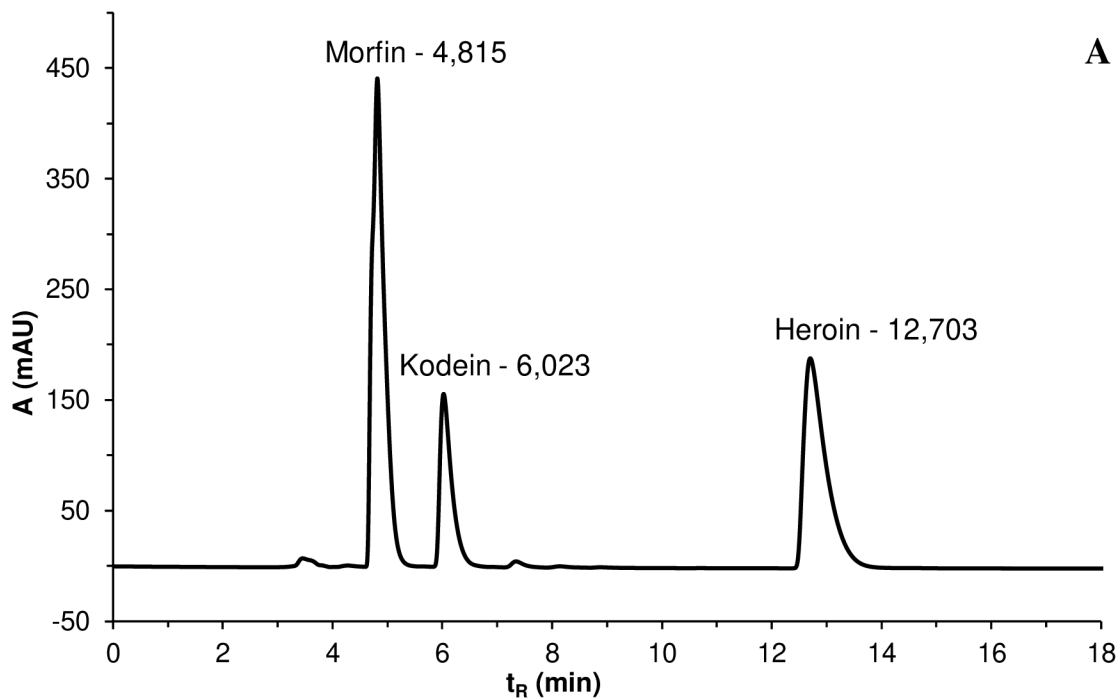
PŘÍLOHY

Typ drogy	Droga	„Psychická závislost“	„Fyzická závislost“	Abstinenční příznaky
Stimulancia	Kokain	Silná, vzniká velmi rychle zejména u i.v. aplikace nebo „crack“	Slabá	Především psychické znaky, těžké deprese, dysforie, poruchy spánku, zvýšená chuť k jídlu
	Amfetamin (Extáze)	Silná, trochu pomalejší vznik, kromě i.v. aplikace	Slabá	Dtto jako kokain
	Nikotin	Slabá, relativně rychlý vnik u kouření	Slabá	Především psychické znaky, podrážděnost, strach, úzkost, deprese, zvýšená chuť k jídlu
Tlumivé látky	Kofein	Slabá, pomalu vzniká	Slabá	Především psychické znaky, deprese, bolest hlavy
	Alkohol (ethylalkohol)	Středně silná, pomalu vzniká	Střední až silná	Těžké, strach, úzkost, deprese, dysforie, poruchy spánku, chvění, třes, otřásání, křeče, zmatenost, halucinace
	Benzodiazepiny	Slabá, pomalu vzniká	Slabá až střední	Slabé a různorodé, těžký strach, dysforie, poruchy spánku, citění mimo realitu, třes, křeče, halucinace
	Barbituráty	Slabá až střední, pomalu vzniká	Výrazná	Těžké, strach, úzkost, dysforie, poruchy spánku, třes, křeče
Disociativní anestetika	Phencyklidin (PCD) Ketamin	Střední	Slabá	Strach, úzkost, dysforie
Opiáty	Morfin, heroin	Silná, rychle vzniká při i.v. aplikaci nebo při kouření	Silná	Střední – těžké, strach, úzkost, dysforie, poruchy spánku, svalové křeče, průjem, chvění a třes, otřásání
	Methadon	Slabší	Silná	Slabší (pomaleji se vylučuje z organismu)
Kanabinoidy	Kanabis, marihuana, tetrahydrokanabinol	Střední, relativně rychle vzniká při kouření	Střední	Slabé, strach, úzkost, dysforie, poruchy spánku
Halucinogeny	Kyselina lysergová (LSD) Diethylamid, meskalin	Slabá?	Slabá	Řídké, nezvyklé vzhledem k frekvenci užívání, která nebývá tak častá, aby se vyvinula „fyzická závislost“

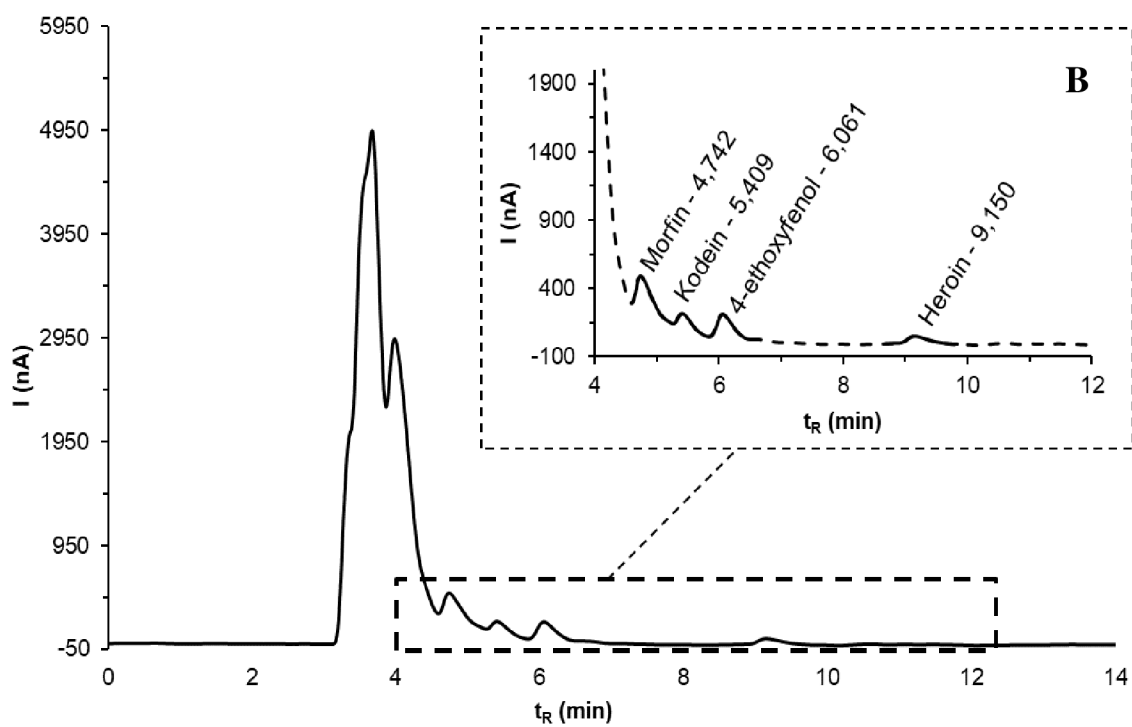
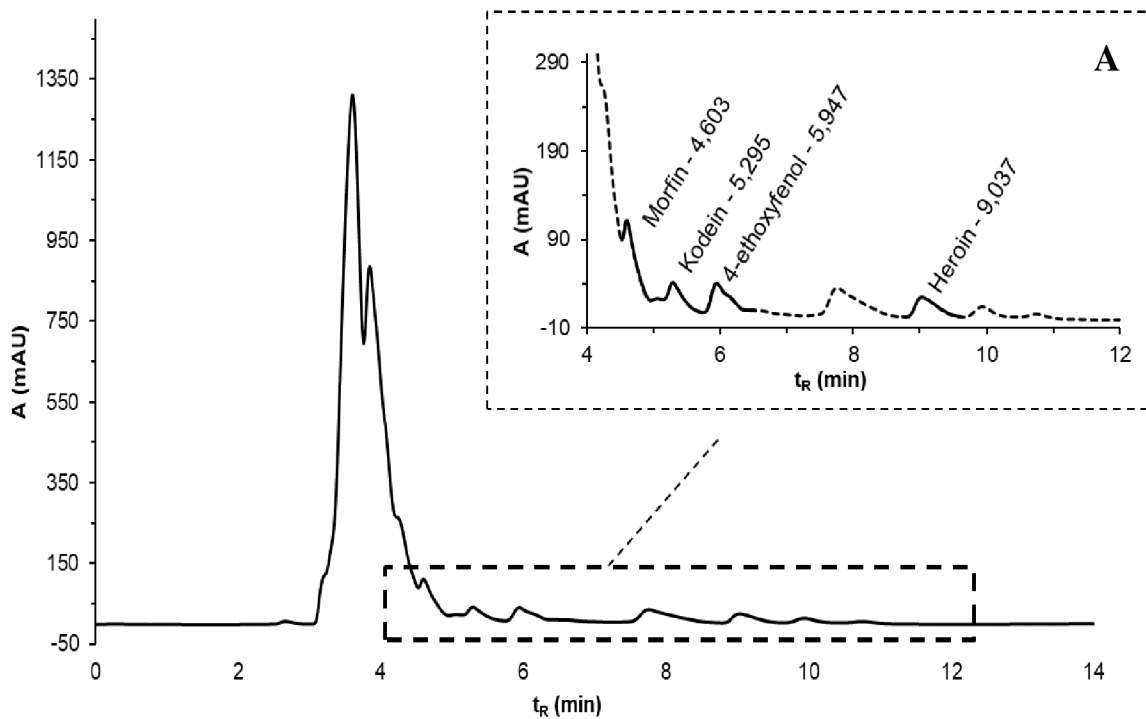
Příloha 1 - Typ závislosti při požívání konkrétní drogy a symptomy při jejím odnětí, převzato z [3]



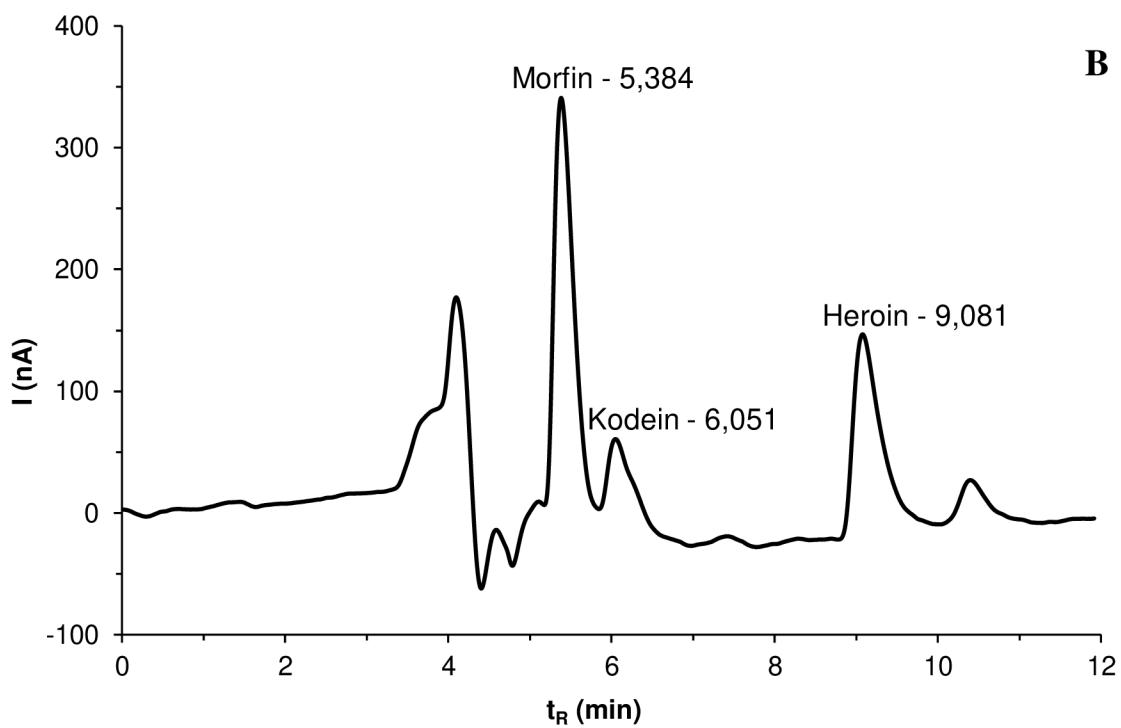
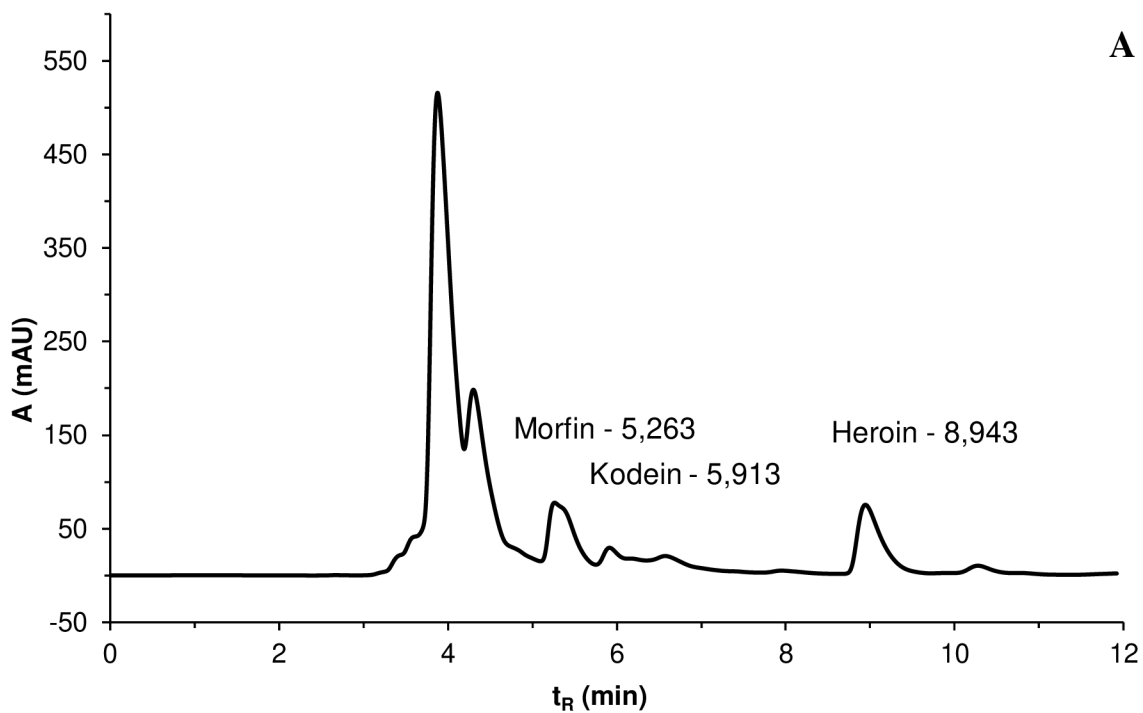
Příloha 2 – Chromatogramy získané metodou HPLC pro MF ACN:NaH₂PO₄ v poměru 10:90 pomocí UV detekce (A) a EC detekce (B)



Příloha 3 - Chromatogramy získané metodou HPLC pro MF ACN:NaH₂PO₄ v poměru 15:85 pomocí UV detekce (A) a EC detekce (B)



Příloha 4 – Chromatogramy získané metodou HPLC s UV detekcí (A) a detekcí ECD1 (B) při analýze krevního séra ve vzorku deproteinovaném acetonitrilem



Příloha 5 - Chromatogramy získané metodou HPLC s UV detekcí (A) a detekcí ECD1 (B) při stanovení opioidů v moči