

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

ANALÝZA HISTORICKÝCH
LÉKOVÝCH FOREM HEROINU
A KOKAINU

Bakalářská práce

studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelů RNDr. Karla Nesměráka, PhD. a RNDr. Martina Štíchy, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. 6. 2007

..... Evana Čarova !

podpis

OBSAH

Seznam zkratek	4
1 Teoretická část	5
1.1 Cíl práce	5
1.2 Historie studovaných látek	5
1.3 Heroin a morfin	6
1.3.1 Struktura a vlastnosti	6
1.3.2 Výroba	6
1.3.3 Farmakologie	7
1.4 Kokain	8
1.4.1 Struktura a vlastnosti	8
1.4.2 Výroba	9
1.4.3 Farmakologie	9
1.5 Studium stability lékových forem heroinu a kokainu	10
1.6 Analytické metody pro stanovení heroinu a kokainu	11
2 Experimentální část	12
2.1 Studované látky	12
2.2 Použité chemikálie	12
2.3 Použité metody měření a zpracování dat	12
2.3.1 Příprava vzorku	12
2.3.2 HPLC/MS	12
3 Výsledky a diskuse	14
3.1 Analýza heroinu	14
3.2 Analýza kokainu	20
4 Závěr	25
Literatura	26

SEZNAM ZKRATEK

APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BPC	chromatogram píků s největší intenzitou
CNS	centrální nervová soustava
DAD	detektor s diodovým polem
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprej
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
M	molekulární ion
$[M + H]^+$	protonizovaný molekulární ion
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	vícetupňová hmotnostní spektrometrie
m/z	efektivní hmotnost iontu
t_R	retenční čas
UV	ultrafialové záření

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo stanovit hlavní složky ve starých lékových formách heroinu a kokainu hydrochloridu. Úkolem bylo potvrdit nebo vyvrátit přítomnost majoritní složky, analyzovat produkty rozpadu a pokusit se identifikovat případné další látky přítomné v léčivu.

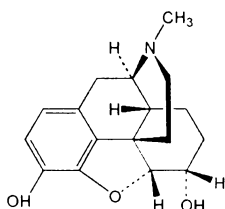
1.2 Historie studovaných látek

Výchozí látkou pro výrobu heroinu je morfin. Morfin patří mezi opiáty, což jsou látky, alkaloidy, které lze izolovat z opia. Někdy se používá termín opioidy, což jsou všechny přírodní a syntetické látky, které mají účinky podobné morfinu. Morfin byl izolován z máku setého na počátku 19. století. Začal se používat jako lék proti bolesti. Byl velice oblíben mezi lidmi ze střední vrstvy společnosti. V některých případech se hovořilo o morfinizmu, což je toxikománie charakterizovaná chorobnou závislostí na morfinu. V roce 1874 byl poprvé syntetizován diacetylmorfin. Firmou Bayer byl uveden na trh pod názvem heroin. Narozdíl od morfinu byl účinnější, snižoval pocity strachu, používal se k léčení osob závislých na morfinu a jako lék proti různým druhům kašle. Velké množství heroinu bylo posláno z Evropy na Dálný východ, kde sloužilo k léčení uživatelů opia. Ve 20. století se návyk na heroinu léčil metadonem.

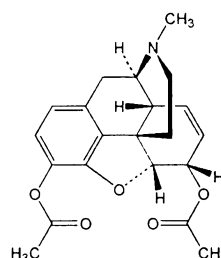
Kokain, alkaloid obsažený v listech koky pravé, byl poprvé izolován v roce 1859. Brzy se s ním začalo obchodovat, byl propagován jako „potrava pro nervy“ a „neškodný přípravek na vyléčení smutku“. Účinky kokainu studoval mj. Sigmund Freud. Kokain se přidával do nápojů, např. v roce 1885 byla na trh uvedena Coca-Cola. Obsahovala karamel, kofein, alkohol, extrakt listů koky a ořechů koly, limetkovou šťávu, vanilku a další chuťové přísady. O rok později byla zbavena alkoholu a v roce 1903 se při výrobě přestal používat kokain. Prodávala se jako lék nebo osvěžující nápoj. Kokain se používal k léčení osob závislých na morfinu a jako lokální povrchové anestetikum. Dnes je nahrazen různými syntetickými léčivy [1]–[2].

1.3 Heroin a morfin

1.3.1 Struktura a vlastnosti



Obr. 1.1: Morfin



Obr. 1.2: Heroin

Morfin, systematicky 4,5 α -epoxy-17-methyl-7,8-didehydromorfinan-3,6 α -diol, je alkaloid fenanthrenového typu. Struktura je uvedena na obr. 1.1. Sumární vzorec je C₁₇H₁₉NO₃ a relativní molekulová hmotnost 285,4. Analgeticky účinný morfin je levotočivý a má 5 asymetrických center C₅, C₆, C₉, C₁₃ a C₁₄, jimž náleží absolutní konfigurace 5*R*, 6*S*, 9*R*, 13*S* a 14*R*. Pravočivý isomer je neúčinný. Molekula obsahuje aromatické jádro, které je spojeno dvouuhlíkatým článkem s terciálním bazickým dusíkem.

Morfin je bílý krystalický prášek nahořklé chuti a bez zápachu, který se převádí pomocí kyseliny chlorovodíkové na hydrochlorid. Bezvodý hydrochlorid má teplotu tání 285–300°C. Je rozpustný ve vodě (40 mg ml⁻¹) a methanolu (50 mg ml⁻¹), méně v ethanolu (20 mg ml⁻¹) a prakticky nerozpustný v ostatních organických rozpouštědlech [3].

Heroin, systematicky diacetyl ester 4,5 α -epoxy-17-methyl-7,8-didehydromorfinan-3,6 α -diolu, je polosyntetický derivát získaný esterifikací sekundárních alkoholických skupin morfinu. Struktura je uvedena na obr. 1.2. Sumární vzorec je C₂₁H₂₃NO₅ a relativní molekulová hmotnost 369,4. Teplota tání je 173°C a teplota varu 272–274°C. Je to bílý prášek s nahořklou chutí, který páchne po octu. Hydrochlorid se dobře rozpouští ve vodě a volná báze v organických rozpouštědlech [3].

1.3.2 Výroba

Přestože je známa syntetická příprava morfinu, získává se dosud výhradně izolací z opia, což je zaschlá šťáva z nezralých makovic máku setého, *Papaver somniferum L.* Surové opium může obsahovat až 35 různých alkaloidů. K pěti hlavním patří alkaloidy fenanthrenového typu, jako jsou morfin, kodein, thebain a alkaloidy benzylochinolinového typu, jako jsou papaverin, noskapin. Opium se extrahuje zředěným vodným roztokem hydroxidu vápenatého. Ten převede

ve vodě nerozpustný morfin na rozpustnou vápenatou sůl. Pak se pH upraví na 9, čímž dojde k vysrážení morfinové báze, která se čistí přesrážením.

Syntéza herionu probíhá ve dvou krocích. Nejprve morfin reaguje s acetanhydridem za vzniku diacetylmorfinu (heroinu). Volná báze se pak vysráží pomocí uhličitanu amonného. Heroinovou bázi je možné převést pomocí kyseliny chlorovodíkové na heroin hydrochlorid [3].

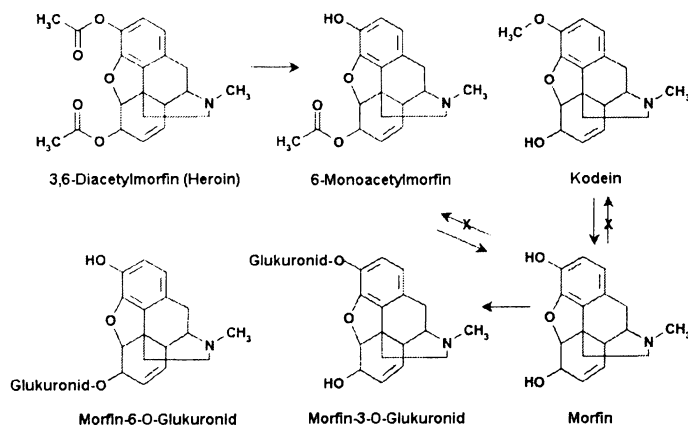
1.3.3 Farmakologie

Využití. Opiáty patří mezi narkotická analgetika. Používají se ke snížení či potlačení pocitu silné bolesti, proti průjmům, mají sedativní a ve vyšších dávkách narkotické účinky. Často se podávají v průběhu operací jako doplňkové látky k jiným anestetikům. Dříve se používala proti kašli. K nežádoucím účinkům patří ospalost, nevolnost, zácpa, zpomalené dýchání. Nejčastěji se aplikují intravenózně, intramuskulárně a subkutánně. Hlavní nevýhodou těchto látek je možnost vzniku závislosti [4].

Účinky. Pravidelné užívání morfinu nebo heroinu vede ke vzniku fyzické i psychické závislosti a současně se rozvíjí tolerance. To znamená, že jedinec potřebuje stále vyšší dávku k vyvolání stejného účinku. Účinky jsou různé. U člověka, který zkouší drogu poprvé, se při nízkých dávkách objevuje pocení, bolesti hlavy, nevolnost, nepříjemná chuť v ústech, při intoxikaci vyšší dávkou dojde ke zvracení, svědění pokožky, zúžení zornic a při extrémně vysokých dávkách nastává bezvědomí a smrt zástavou dýchání. U osob závislých na morfinu nebo heroinu se při nižších dávkách objevuje euforie, roste sebevědomí, zvyšuje se komunikativnost, mizí zábrany. Dále dochází k pocení, lehkému poklesu tělesné teploty, zácpě. U mužů vzniká impotence, ženy obvykle mají nepravidelný menstruační cyklus. Heroin působí rychleji, intenzivněji, ale kratší dobu než morfin. První příznaky abstinčního syndromu se objevují 8–10 hodin po poslední dávce. Je pozorováno slzení, zívání, pocení. Dále se objevuje neklid, zvýšená dráždivost případně svalový třes. Příznaky vrcholí za 48–72 hodin intenzivním kýcháním, únavou a depresí. Typické jsou bolesti břicha a svalů. Bývá přítomna i horečka, zvracení, průjem. Postižení odmítají potravu, což vede ke snížení tělesné hmotnosti, dehydrataci, ketoacidóze. Abstinční syndrom obvykle mizí do 7–10 dnů [4].

Farmakodynamika a kinetika. Většina narkotických analgetik se dobře vstřebává subkutánně, intramuskulárně, z nosní sliznice a ze zažívacího traktu. Nejvíce se hromadí v plicích, játrech, ledvinách a slezině. V mozku jsou koncentrace poměrně nízké. Při opakovaných dávkách může docházet k akumulaci v tukové tkáni. Narkotická analgetika prostupují placentou. V centrálním nervovém systému (CNS) interagují s opioidními receptory. Při perorálním podání podléhají velkému first pass efektu – během prvního průchodu játry se z velké části metabolizují na polární metabolity, které se vylučují ledvinami. Heroin je esterázami rozložen během několika minut

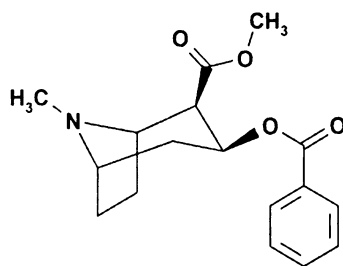
na 6-monoacetylmorfin a morfin, který se metabolizuje konjugací s kyselinou glukuronovou (obr. 1.3). Biologický poločas heroinu je 2–3 minut, 6-monoacetylmorfinu 9–40 minut a morfinu 1–7 hodin [4].



Obr. 1.3: Metabolismus heroinu

1.4 Kokain

1.4.1 Struktura a vlastnosti



Obr. 1.4: Kokain

Kokain, systematicky methyl ester (1R,2R,3S,5S)-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]-oktan-2-karboxylové kyseliny, je alkaloid tropanového typu. Struktura je uvedena na obr. 1.4. Sumární vzorec je $C_{17}H_{21}NO_4$ a relativní molekulová hmotnost 303,4. Teplota tání je 98°C a teplota varu $187\text{--}188^{\circ}\text{C}$. Molekula kokainu má čtyři asymetrická centra C_1 , C_2 , C_3 a C_5 , jimž náleží absolutní konfigurace $1R$, $2R$, $3S$ a $5S$. Existuje pouze osm stereoisomerů, protože methyldusíkový můstek může spojit atomy C_1 a C_5 jen v *cis* poloze. Přírodní kokain je levotočivý. Anesteticky nejúčinnější je synteticky připravený pravotočivý ψ -kokain.

Je to bílý prášek hořké chuti a bez zápachu. Rozpustnost volné báze ve vodě je $0,77 \text{ mg ml}^{-1}$, v chloroformu $2,0 \text{ g ml}^{-1}$ a v diethyletheru $0,25 \text{ g ml}^{-1}$. Rozpustnost hydrochloridu ve vodě je $2,0 \text{ g ml}^{-1}$, v chloroformu 55 mg ml^{-1} a v diethyletheru je téměř nerozpustný [3].

1.4.2 Výroba

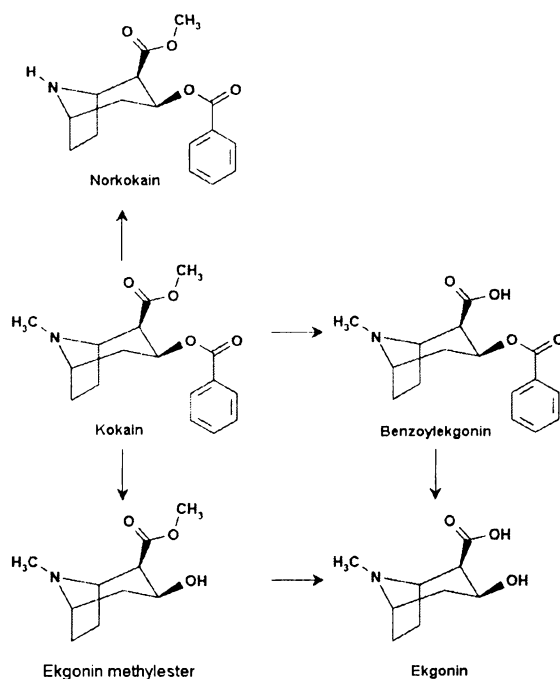
Kokain je alkaloid, který lze izolovat z listů koky pravé, *Erythroxylum coca L.* V současnosti se připravuje převážně polosynteticky. Extrahovaný komplex kokových alkaloidů se zahřívá s kys. chlorovodíkovou nebo sírovou. Tím se vytvoří methylekgonin nejen z přírodního kokainu, ale i z příbuzných alkaloidů jejich hydrolýzou a současnou esterifikací uvolněného ekgoninu. Methylekgonin se po odstranění vedlejších produktů reakce převede působením benzoylchloridu na kokain. Tento postup je výhodnější než izolace samotného kokainu zejména z hlediska výtěžnosti. Je známa i totální syntéza kokainu [3].

1.4.3 Farmakologie

Využití. Kokain reverzibilně blokuje přenos nervových vzruchů, a proto se používal jako lokální povrchové anestetikum. Kvůli svým toxickým účinkům je dnes nahrazen lokálními anestetiky esterového typu, jako jsou prokain, tetrakain nebo lokálními anestetiky amidového nebo anilidového typu, jako jsou lidokain, trimekain, bupivakain, mepivakain [5]. Dnes se používá jen výjimečně ve formě roztoku v oční a krční chirurgii.

Účinky. Při nižších dávkách se objevuje euforie, mizí únava a pocit hladu, roste sebevědomí a sexuální vzrušivost. Při vyšších dávkách dochází k paranoidnímu myšlení, nesnášenlivosti, podezřavosti, agresivitě, objevují se zrakové, sluchové i hmatové halucinace. Při extrémně vysokých dávkách klesá minutová ventilace, nastupuje kóma a smrt zástavou dýchání. Při chronickém užívání se objevuje nespavost, hyperaktivita, neklid, dochází k rozšíření zornic, poruchám paměti, pálení pokožky. Obvyklý je pokles tělesné hmotnosti. Na kokain vzniká silná psychická závislost. Abstinenční syndrom se u chronických konzumentů projevuje depresi, strachem, sebevražednými sklony, fyzickou únavou [4].

Farmakodynamika a kinetika. Kokain reverzibilně blokuje receptory sodíkových kanálů v neuronálních membránách. Tím dochází k dočasnému potlačení přenosu nervových vzruchů a vyvolání anestetického účinku. Euforické účinky vyvolává tím, že v CNS blokuje zpětný přenos katecholaminů do presynaptických neuronů, a proto se zvyšuje koncentrace těchto neurotransmiterů v synaptických štěrbinách. Kokain podléhá spontánní hydrolýze nebo je štěpen pseudocholinesterázou na benzoylekgonin a ekgonin methylester (obr. 1.5). Metabolity jsou relativně neúčinné, vylučují se do moči nebo se ukládají ve vlasech. Biologický poločas kokainu je 0,5–1,5 hodin, benzoylekgoninu 3,5–8 hodin a ekgonin methylesteru 3,5–6 hodin [4].



Obr. 1.5: Metabolismus kokainu

1.5 Studium stability lékových forem heroinu a kokainu

Při studiu stability léčiva se zjišťují produkty rozpadu, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a farmakologické účinky. Dále se určuje doba expirace a optimální podmínky pro skladování.

Heroin se ve vodném roztoku kvantitativně rozpadá na majoritní produkt 6-monoacetylmorfin a na minoritní 3-monoacetylmorfin a morfin. Rychlost rozpadu závisí na pH, teplotě, koncentraci. Při pH 4,0–5,6 má heroin poločas rozpadu vyšší než 14 dní. Rychlost deacetylace 6-monoacetylmorfinu je menší než heroinu za stejných podmínek [6]. K minimální hydrolyze heroinu hydrochloridu dochází při pH 4,0–4,5 [7].

Nejdelší doba, po kterou byla studována stabilita heroinu, je 24 měsíců. Lyofilizovaný produkt heroinu hydrochloridu byl skladován při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti 60 %. Dále byl vzorek skladován 14 týdnů při teplotě 40 °C a relativní vlhkosti 75 %. V obou případech nedošlo k výrazné změně obsahu. Skladovatelnost lyofilizovaného produktu byla stanovena na 2 roky při teplotě 15–25 °C [8].

Výsledky více koncentrovaných vodných roztoků heroinu hydrochloridu (20 a 30 mg ml⁻¹) ukazují na 4–5 % a 14–18 % ztráty po 8 týdnech skladování při teplotě 4 °C a 21 °C [9]. Roztoky heroinu hydrochloridu o koncentracích 1 a 20 mg ml⁻¹ byly skladovány 15 dní. Při teplotě 4 °C se rozpadlo v obou vzorcích pouze 10 % heroinu, zatímco při teplotě 24 °C byla minimální stabilita vzorku o koncentraci 1 mg ml⁻¹ 7 dní a vzorku o koncentraci 20 mg ml⁻¹ 12 dní [10].

Byla studována stabilita heroinu v methanolu při teplotě 28 °C po dobu 1 roku. Bylo zjištěno, že rozpad heroinu začal druhý den a skončil přibližně 38. týden [11]. Dále byla zkoumána hydrolyza heroinu za 20 minut při pH 7–12. Při $7,5 < \text{pH} < 8,0$ byl rozpad morfinových derivátů nižší než 2%. Při vyšším pH rychlost hydrolyzy prudce vzrostla [12]. Rozpadem heroinu hydrochloridu ve vodném roztoku se také zabývá práce [13].

Kokain se ve vodném roztoku spontánně hydrolyzuje za vzniku ekgonin methylesteru, benzylekgoninu a ekgoninu. Směs heroinu a kokainu hydrochloridu a jejich hydrolytických produktů byla skladována při různém pH a teplotě. Největší stabilita byla při pH 3,0–3,5 [14].

Oční kapky obsahující 5% kokainu obsahovaly po 6 měsících skladování při teplotě 5 °C a 25 °C 89% a 80% počátečního množství kokainu. Dále byl sledován vliv pH, kdy 1% roztoky kokainu byly skladovány při teplotě 25 °C. Za 6 měsíců vzorek o pH 5,0 obsahoval 80% a vzorek o pH 2,2 obsahoval 95% počátečního množství kokainu. Při teplotě 25 °C a pH 6,8 zůstalo ve vzorku, po 1 týdnu skladování, 46% počátečního množství kokainu [15]. Byl studován vliv koncentrace vodíkových iontů na stabilitu kokainu hydrochloridu v roztoku pro injekční aplikaci [16].

1.6 Analytické metody pro stanovení heroinu a kokainu

Hlavní metody, kterými lze stanovit heroin nebo kokain, jsou uvedeny v tabulce 1.1. Jedná se především o metody HPLC a GC/MS [17]. Existuje mnoho článků zabývajících se stanovením heroinu a kokainu v biologických matricích např. v plazmě, v moči, ve vlasech, v mekoniu. Byly vypracovány laboratorní příručky pro analýzu ilegálního kokainu, morfinu a heroinu.

Tab. 1.1: Hlavní metody, kterými lze stanovit heroin nebo kokain.

původ vzorku	metody	reference
léková forma	HPLC	[18] [19]
ilegální drogy	GC/MS	[20]
	různé	[21] [22] [23]
z biologické matrice	HPLC/MS	[24] [25]
	HPLC/DAD	[26]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Studované látky

Vzorek heroinu hydrochloridu byl vyroben v roce 1933 v Istituto Chimico Farmaceutico Militare (Florencie, Itálie). Analyzovaným vzorkem byl slabě hnědý roztok uchovávaný v 1 ml zatavené skleněné ampulce určené pro intravenózní aplikaci. Deklarovaná koncentrace byla 5 mg ml^{-1} .

Vzorek kokainu hydrochloridu byl vyroben ve 30. letech 20. století firmou Roberta Heislera (Chrást, Čechy)¹. Analyzovaným vzorkem byl bezbarvý roztok uchovávaný v 1 ml zatavené skleněné ampulce určené pro intravenózní aplikaci. Deklarovaná koncentrace byla 10 mg ml^{-1} .

Nejsou známy podmínky, při kterých byly vzorky skladovány.

2.2 Použité chemikálie

acetonitril pro HPLC, Lach-Ner

amoniak-vodný roztok, min 25 % p.a., Lach-Ner

destilovaná voda

methanol pro HPLC, Lach-Ner

octová kyselina, min 98 %, Lachema

2.3 Použité metody měření a zpracování dat

2.3.1 Příprava vzorku

Část vzorku heroinu hydrochloridu byla odpipetována a 50krát zředěna methanolem.

Část vzorku kokainu hydrochloridu byla odpipetována a 100krát zředěna methanolem.

2.3.2 HPLC/MS

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu HP 1100 s DAD detektorem. Pro vzorek heroinu byla vlnová délka nastavena na 285 nm a pro vzorek kokainu byla nastavena na 235 nm. Látky byly separovány na koloně Supelco RP C₁₈ o délce 150 mm, průměru 4,6 mm a velikosti zrn $5 \mu\text{m}$ při teplotě 22°C .

Pro analýzu heroinu byla použita izokratická eluce. Mobilní fáze obsahovala 0,2 % vodný roztok amoniaku a methanol (20:80, v/v). Průtok byl nastaven na $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Bylo dávkováno $10 \mu\text{l}$ vzorku a celková doba analýzy byla 9 min.

¹Podle literatury [27] byla výroba kokainu ve firmě Heisler zahájena v roce 1932. V roce 1938 firma zanikla.

Pro analýzu kokainu byla použita gradientová eluce (tab. 2.1). Mobilní fáze obsahovala 0,1 % vodný roztok amoniaku (A) a methanol (B). Bylo dávkováno 15 μl vzorku a celková doba analýzy byla 13 min.

Tab. 2.1: Gradientová eluce vzorku kokainu. Eluent A je 0,1 % vodný roztok amoniaku, eluent B je methanol.

čas [min]	eluent A [%]	eluent B [%]	průtok [ml min^{-1}]
0,0	60	40	0,5
0,5	60	40	0,5
5,0	5	95	0,5
10,0	5	95	0,8
13,0	5	95	0,8

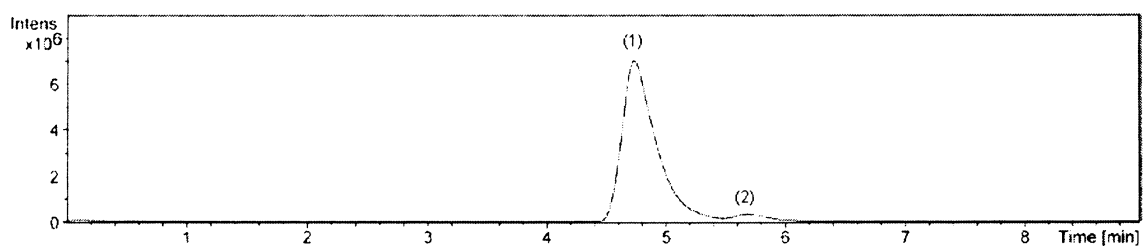
K detekci byl použit hmotnostní spektrometr Bruker Esquire 3000 s iontovou pastí a APPI ionizací. Vzorky byly měřeny v pozitivním módu. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík (30 psi). Parametry sušícího plynu: průtok 5 l min^{-1} , teplota 250°C . Vypařovací teplota byla 400°C a napětí na kapiláře bylo 1,5 kV. Rozsah měření byl 50–500 u.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

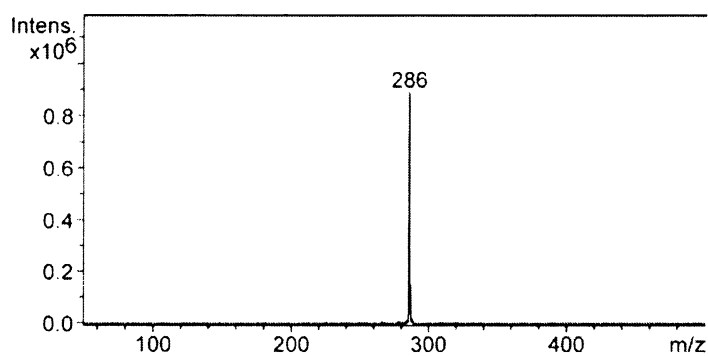
Pro analýzu byla zvolena metoda HPLC/MS umožňující separaci polárních látek. Při hledání vhodných podmínek analýzy byly zohledněny zkušenosti z článků, které se zabývají stanovením heroinu a kokainu v biologických matricích [24]–[25]. První experimenty byly prováděny s dvousložkovou mobilní fází obsahující methanol nebo acetonitril a vodný roztok kyseliny octové. Výsledky ukazovaly, že v kyselém a neutrálním prostředí byly píky látek rozmyté a retenční časy se pohybovaly v rozmezí mezi 20 až 30 minutami. Dále bylo testováno chromatografické chování studovaných látek v alkalickém prostředí. Bylo pozorováno, že při vysokých hodnotách pH dochází k rychlé hydrolyze heroinu i kokainu, což je v souladu s popisem uvedeným v kapitole 1.5. Proto byla vyvinuta nová metoda umožňující separaci hlavních hydrolytických produktů heroinu a kokainu v slabě alkalickém prostředí. Při této metodě se mobilní fáze skládala z methanolu a vodného roztoku amoniaku. Postupným zvyšováním koncentrace amoniaku v mobilní fázi byly separační podmínky optimalizovány tak, aby látky eluovaly v krátkém čase a jejich píky byly vzájemně odděleny. Každé měření bylo opakováno dvakrát, všechny následující výsledky jsou mediány.

3.1 Analýza heroinu

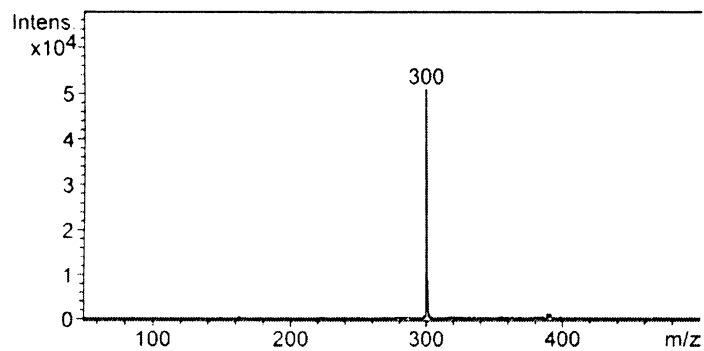
HPLC/MS: BPC chromatogram lékové formy heroinu je na obr. 3.1. Hmotnostní spektra, kde hlavními ionty jsou molekulární adukty $[M + H]^+$, jsou zobrazena na obr. 3.2–3.3. Na základě znalostí o hydrolyze heroinu a změřeného hmotnostního spektra by pík (1) s retenčním časem 4,8 min mohl odpovídat morfinu ($M_r=285,4$). Na základě znalostí dalších alkaloidů, nečistot a rozpouštědel, které se mohou vyskytovat ve vzorcích heroinu [23] a změřeného hmotnostního spektra by pík (2) s retenčním časem 5,8 min mohl odpovídat kodeinu ($M_r=299,4$). Procentuální zastoupení jednotlivých složek bylo vypočítáno metodou vnitřní normalizace. Vzorek heroinu obsahoval 96,1 % morfinu a 3,9 % kodeinu.



Obr. 3.1: HPLC/MS: BPC chromatogram vzorku heroinu: (1) morfin ($t_R=4,8$ min), (2) kodein ($t_R=5,8$ min).

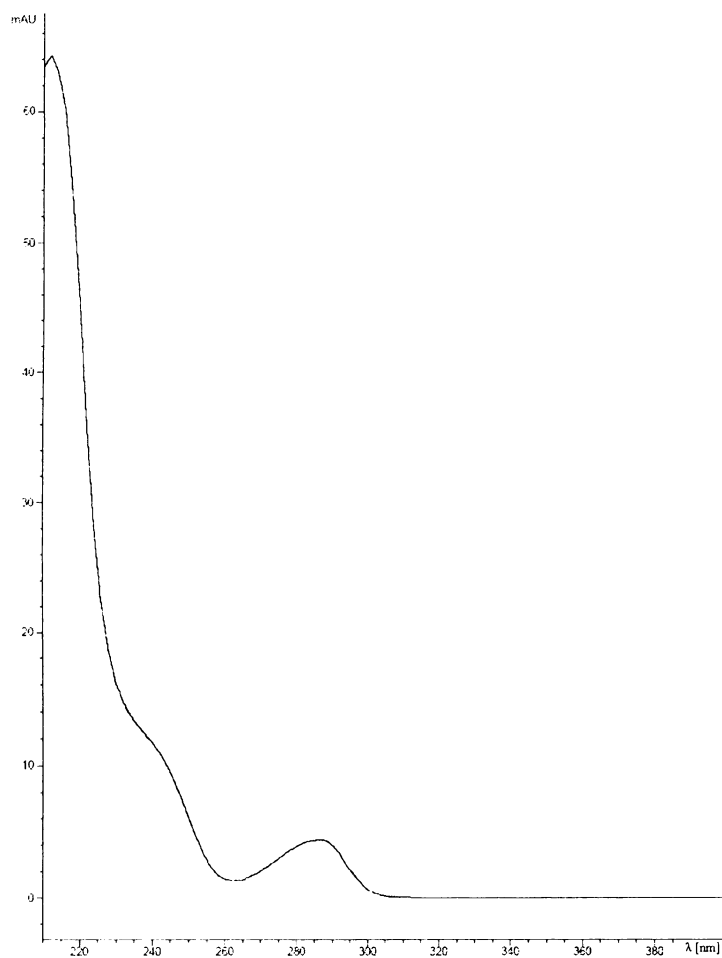


Obr. 3.2: Hmotnostní spektrum morfinu, pik (1), $t_R=4,8$ min.

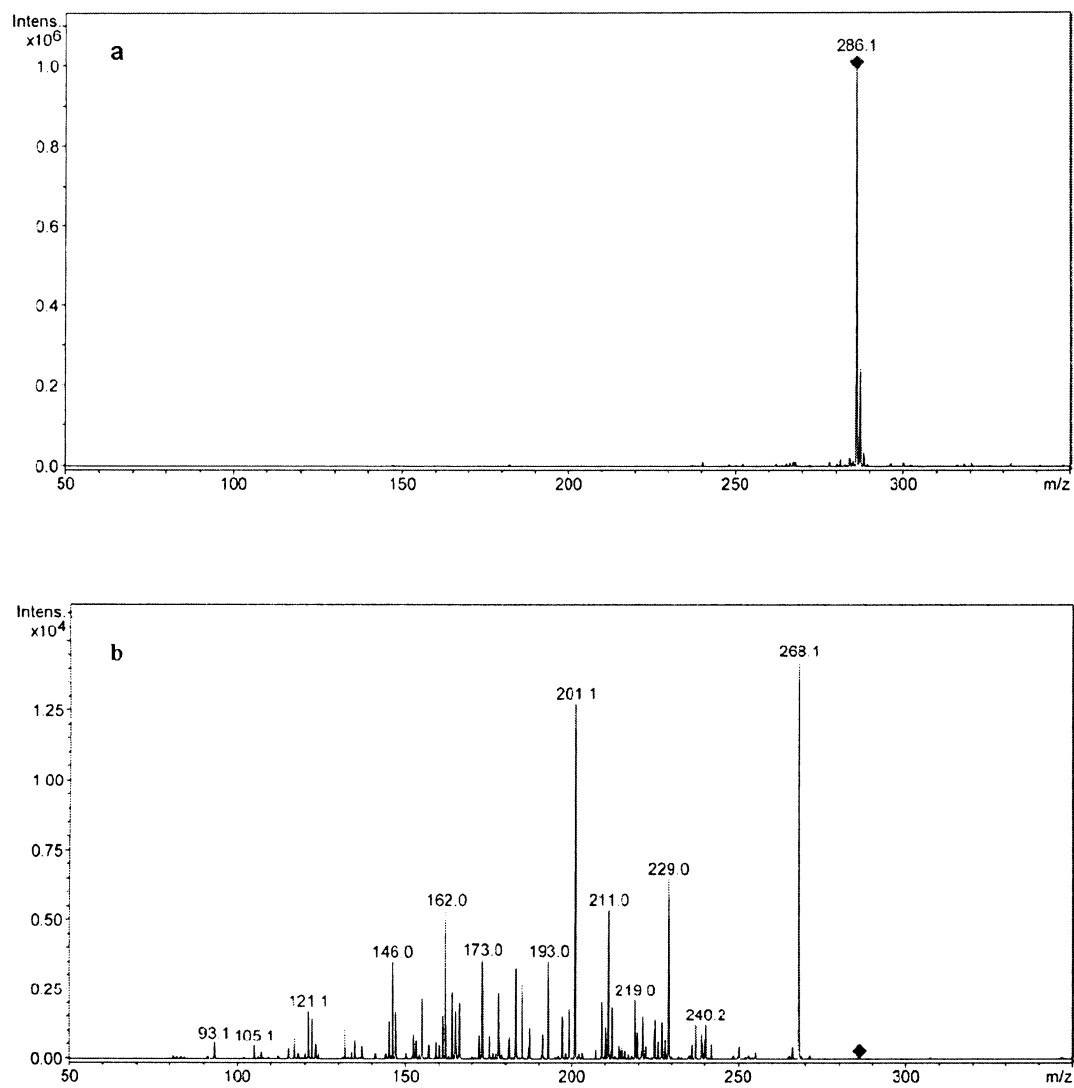


Obr. 3.3: Hmotnostní spektrum kodeinu, pik (2), $t_R=5,8$ min.

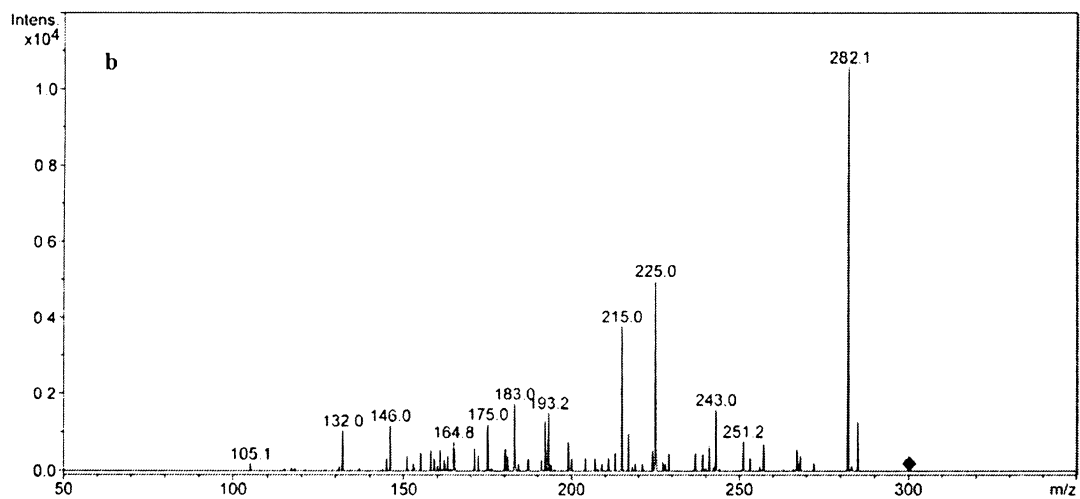
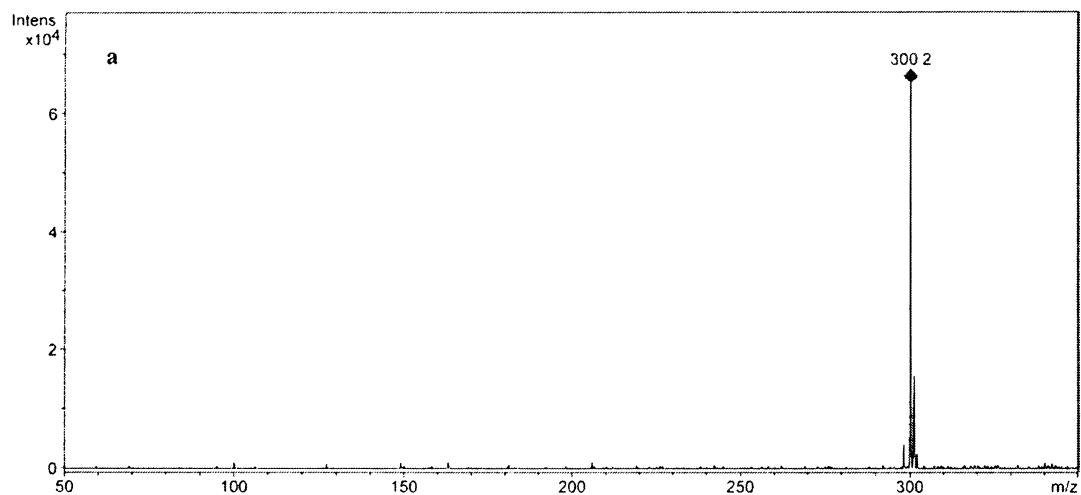
Pík (1) byl také charakterizován pomocí naměřeného UV spektra s absorpčním maximem při vlnové délce 285 nm, které je na obr. 3.4. Tento záznam byl porovnán se spektrem morfinu publikovaným v práci [28] a byla konstatována dobrá shoda. Přítomnost morfinu a kodeinu byla dále potvrzena naměřením a interpretací MS/MS spekter, která jsou na obrázcích 3.5 a 3.6.



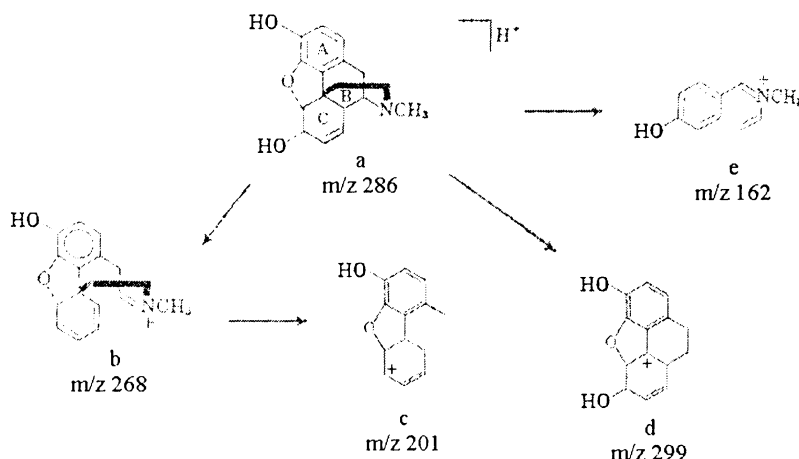
Obr. 3.4: UV spektrum morfinu



Obr. 3.5: HPLC/MS/MS spektrum morfinu: a) izolace prekurzního iontu m/z 286 b) dceřiné spektrum vznikající z iontu m/z 286



Obr. 3.6: HPLC/MS/MS spektrum kodeinu: a) izolace prekurzního iontu m/z 300 b) dceřiné spektrum vznikající z iontu m/z 300



Obr. 3.7: Základní fragmentace protonizované molekuly morfinu

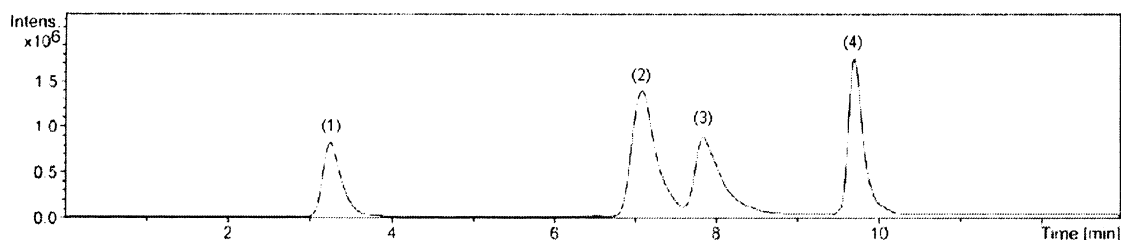
Jako prekurzor pro získání dceřiných iontů morfinu byl vybrán protonizovaný molekulární ion m/z 286. V iontové pasti byl tento ion fragmentován a produkty rozpadu byly zaznamenány jako spektrum dceřiných iontů (viz obr. 3.5b). V získaném spektru se podařilo interpretovat nejintenzivnější ionty. Morfin se fragmentuje dle schématu na obr. 3.7. Hlavní ion dceřiného spektra m/z 268 (struktura b) vzniká odštěpením molekuly vody. Vzhledem k tomu, že ion m/z 201 (struktura c) má sudý počet elektronů, je pravděpodobné že vzniká z iontu m/z 268 po odštěpení C_4H_5N . Oba tyto ionty je možné nalézt i v rozpadovém spektru protonované molekuly kodeinu, ale jejich hodnoty jsou posunuty (zvětšeny) o 14 u, což je dáno tím, že hydroxylová skupina na kruhu A je u kodeinu nahrazena methoxylovou. Ze stejných důvodů je o 14 u posunut fragment, který má u morfinu hodnotu m/z 229 (struktura d). Ten vzniká odštěpením můstku C_3H_7N . Dalším důležitým iontem, tentokrát společným pro obě látky je ion m/z 162 (struktura e). Tento ion vzniká po rozštěpení kruhu B a následném otevření epoxydu. Uvedenou interpretací MS/MS spekter byl s dostatečnou jistotou v chromatogramu identifikován pík (1) jako morfin a pík (2) jako kodein. Při objasňování fragmentačních mechanismů bylo možno vycházet z analogie s EI spektry a jejich interpretace, jak je diskutována v práci autorů Wheeler D. M., Kinstle T. H., Rinehart K. L. [29].

3.2 Analýza kokainu

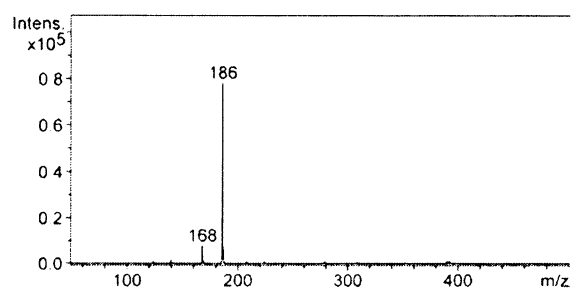
HPLC/MS: BPC chromatogram lékové formy kokainu je na obr. 3.8. Hmotnostní spektra, kde hlavními ionty jsou molekulární adukty $[M + H]^+$, jsou zobrazena na obr. 3.9–3.12. K jednotlivým píkům byly podle molárních hmotností přiřazeny molekuly, které vznikají hydrolyzou kokainu. Látky přiřazené k píkům (1)–(4) jsou spolu s retenčními časy a relativními molekulovými hmotnostmi uvedeny v tabulce 3.1. Procentuální zastoupení jednotlivých složek bylo vypočítáno metodou vnitřní normalizace (tab. 3.1).

Tab. 3.1: Retenční časy jednotlivých píků, procentuální zastoupení a molární hmotnosti složek nalezených ve vzorku kokainu.

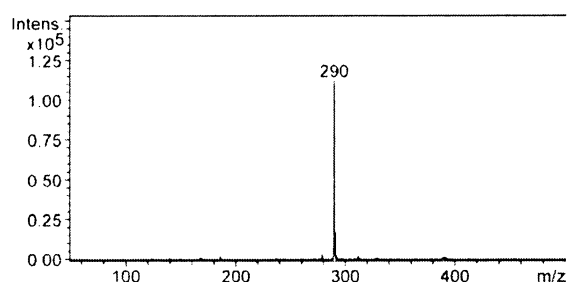
pík	t_R [min]	složka	[%]	M_r
1	3,3	ekgonin	17,4	185,2
2	7,1	benzoylekgonin	31,5	289,3
3	7,8	ekgonin methylester	24,2	199,3
4	9,7	kokain	26,9	303,4



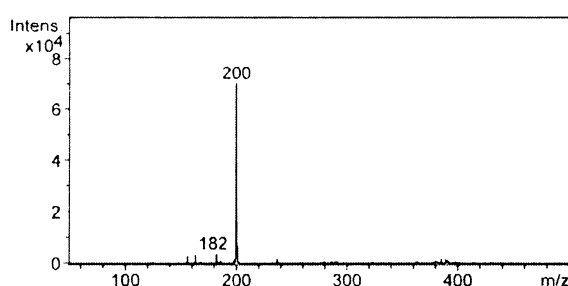
Obr. 3.8: HPLC/MS: BPC chromatogram vzorku kokainu: (1) ekgonin ($t_R=3,3$ min), (2) benzoylekgonin ($t_R=7,1$ min), (3) ekgonin methylester ($t_R=7,8$ min), (4) kokain ($t_R=9,7$ min).



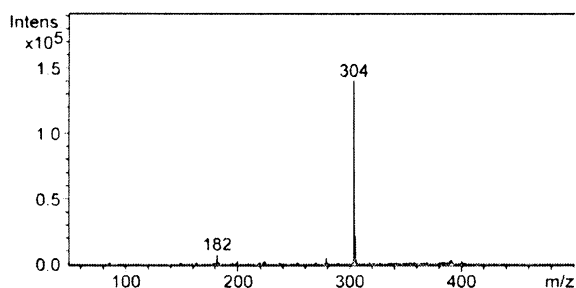
Obr. 3.9: Hmotnostní spektrum ekgoninu, pík (1), $t_R=3,3$ min.



Obr. 3.10: Hmotnostní spektrum benzoylekgoninu, pík (2), $t_R=7,1$ min.



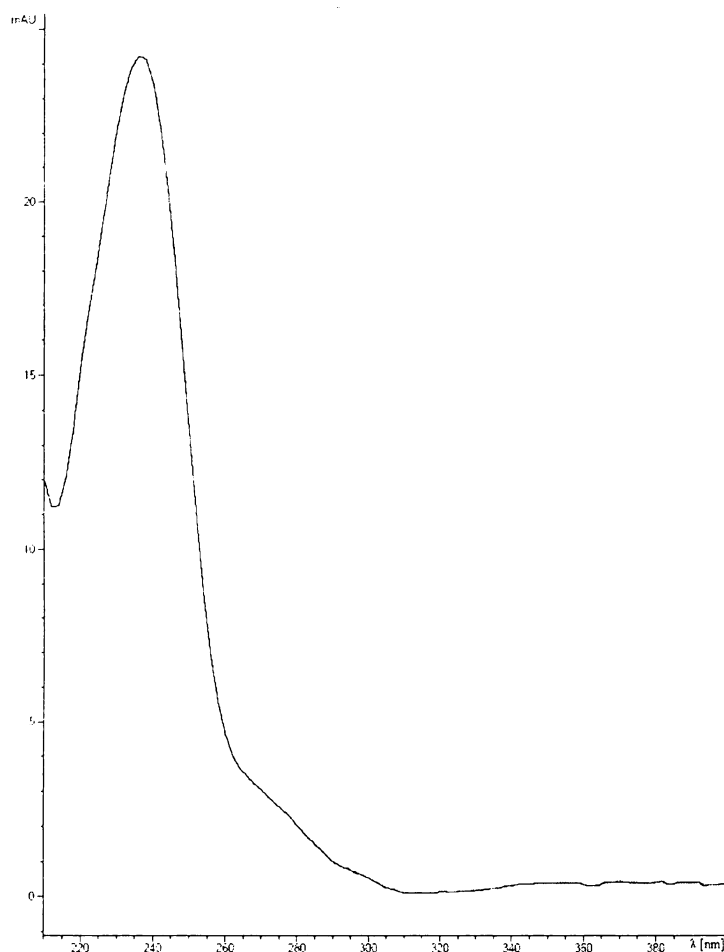
Obr. 3.11: Hmotnostní spektrum ekgonin methylesteru, pík (3), $t_R=7,8$ min.



Obr. 3.12: Hmotnostní spektrum kokainu, pík (4), $t_R=9,7$ min.

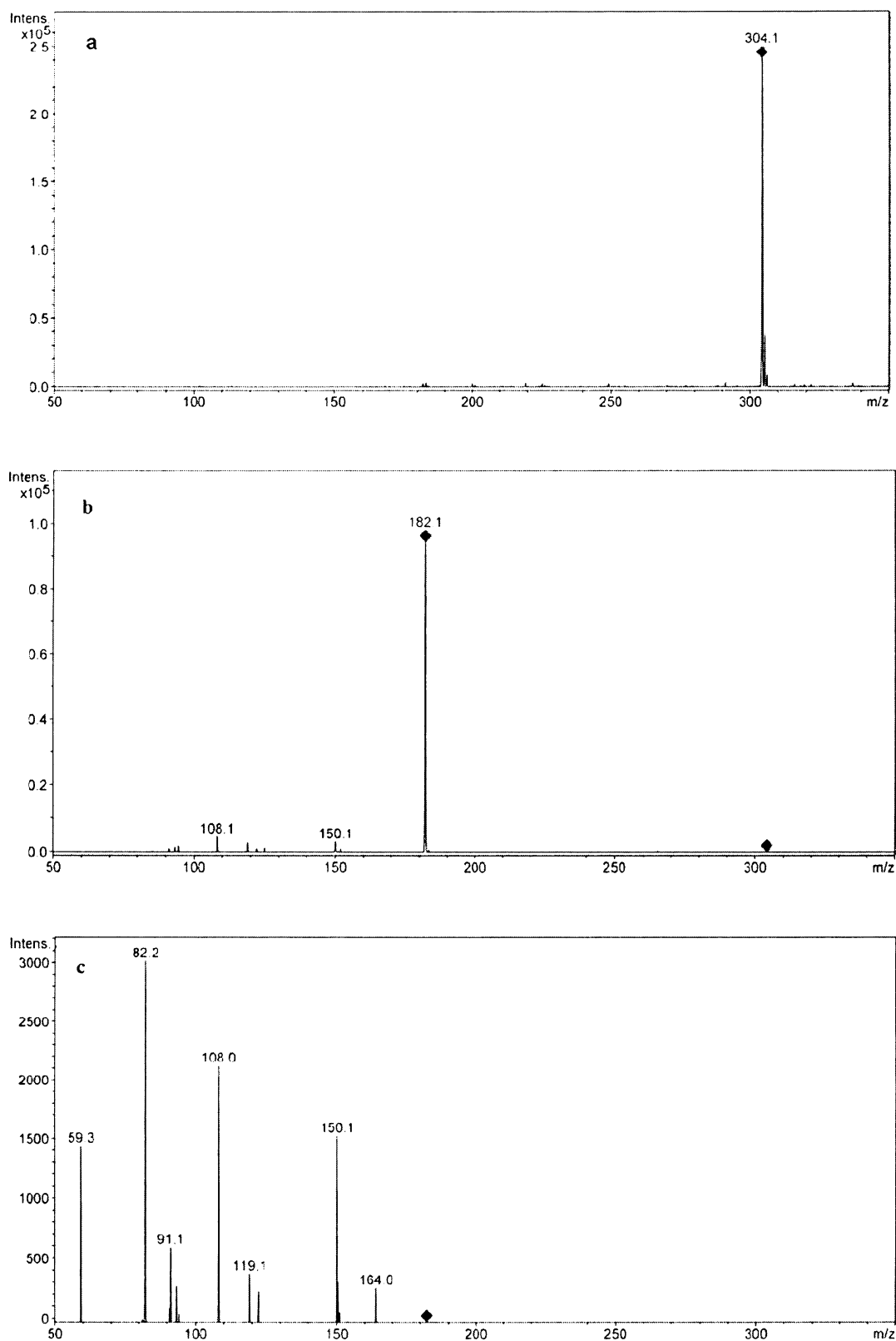
Ion m/z 168, který je na obr. 3.9, vzniká z ekgoninu odštěpením molekuly vody. Píky (2) a (3) nejsou dokonale odděleny. Ion m/z 182, který je na obr. 3.11, vzniká z ekgonin methylesteru odštěpením molekuly vody. Ion m/z 182, který je na obr. 3.12, vzniká z kokainu odštěpením molekuly kyseliny benzoové.

Pík (4) byl také charakterizován pomocí naměřeného UV spektra s absorpčním maximem při vlnové délce 235 nm, které je na obr. 3.13. Tento záznam byl porovnán se spektrem kokainu publikovaným v práci [30] a byla konstatována dobrá shoda.

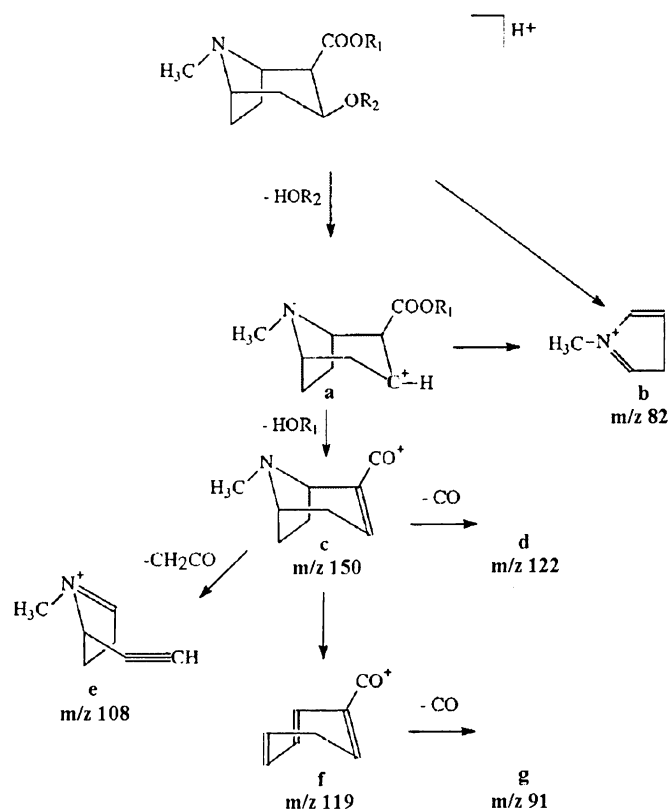


Obr. 3.13: UV spektrum kokainu

Přítomnost kokainu a jeho hydrolytických produktů byla dále potvrzena naměřením a interpretací MS/MS spekter. Nejintenzivnější ionty v rozpadových spektrech kokainu a jeho hydrolytických produktů naměřených ionizací APPI jsou ve shodě s publikovanými výsledky získanými pomocí ESI [31]. MS/MS spektrum kokainu je uvedeno na obr. 3.14. Protonizovaný molekulární ion m/z 304 a jeho nejintenzivnější dceřinný ion m/z 182 byly fragmentovány v iontové pasti. Spektra dceřinných iontů jsou uvedena na obr. 3.14b a 3.14c. Nejintenzivnější ion m/z 182 vzniká odštěpením molekuly kyseliny benzoové. V MS/MS spektrech benzoylkgoninu, ekgonin methylesteru a ekgoninu byly nalezeny ionty, které jsou ve shodě s dceřinnými ionty kokainu. Jejich přehled je uveden v tab. 3.2 a fragmentace je vysvětlena na obr. 3.15. Ion m/z 168 vzniká z benzoylkgoninu odštěpením molekuly kyseliny benzoové a z ekgoninu odštěpením molekuly vody. V MS/MS spektru benzoylkgoninu byl současně nalezen intenzivní ion m/z 105, který vzniká odštěpením $C_6H_5CO^+$. Uvedenou interpretací MS/MS spekter byly látky nalezené ve vzorku kokainu s dostatečnou jistotou identifikovány.



Obr. 3.14: HPLC/MS/MS spektra kokainu: **a)** izolace prekurního iontu m/z 304 **b)** dceřiné spektrum vznikající z iontu m/z 304 a izolace prekurního iontu m/z 182 **c)** dceřiné spektrum vznikající z iontu m/z 182



Obr. 3.15: Základní fragmentace protonizované molekuly kokainu a jeho hydrolytických produktů.

Tab. 3.2: Přehled nejintenzivnějších iontů, které byly naměřeny fragmentací kokainu a jeho hydrolytických produktů.

složka	$m/z, [M + H]^+$	substituent		ion o m/z						
		R_1	R_2	a	b	c	d	e	f	g
kokain	304	CH ₃	C ₆ H ₅ CO	182	82	150	122	108	119	91
benzoylęgonin	290	H	C ₆ H ₅ CO	168	82	150	–	–	119	–
ęgonin methylester	200	CH ₃	H	182	82	150	–	108	119	–
ęgonin	186	H	H	168	82	–	–	–	–	–

4 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce byla zaměřena na analýzu starých lékových forem heroinu a kokainu. K separaci látek byla použita metoda HPLC/MS. Podařilo se optimalizovat podmínky analýzy. Na základě změřených hmotnostních spekter a znalostí o hydrolyze heroinu a kokainu bylo zjištěno, jaké molekuly odpovídají jednotlivým píkům. Naměřená UV spektra blíže charakterizovala molekulu morfinu a kokainu. Hlavní složky nalezené ve vzorcích heroinu a kokainu byly identifikovány na základě interpretace MS/MS spekter. Procentuální zastoupení jednotlivých složek bylo vypočítáno metodou vnitřní normalizace.

Pro analýzu heroinu byla použita izokratická eluce. Mobilní fáze obsahovala 0,2 % vodný roztok amoniaku a methanol (20:80, v/v). Hlavní složkou nalezenou ve vzorku heroinu byl morfin. Další předpokládané hydrolytické produkty jako jsou 6-monoacetylmorfin a 3-monoacetylmorfin, ve vzorku nebyly nalezeny. Vzorek heroinu dále obsahoval kodein. Procentuální zastoupení jednotlivých složek je uvedeno v tabulce 4.1.

Pro analýzu kokainu byla použita gradientová eluce. Mobilní fáze obsahovala 0,1 % vodný roztok amoniaku a methanol. Přehled hlavních složek nalezených ve vzorku kokainu a jejich procentuální zastoupení je uvedeno v tabulce 4.1.

Výsledky analýzy více jak sedmdesát let starých lékových forem heroinu a kokainu nelze porovnat s podobnými studiemi, protože analýzy takto starých vzorků nebyly dosud v literatuře popsány. Nicméně výsledky analýzy lékové formy heroinu ukazují, že došlo k hydrolyze heroinu na morfin, což je ve shodě se známými údaji pro sledování stability heroinových přípravků v roztoku pro mnohem kratší časová období [6]–[7]. Rozpad kokainu v analyzované lékové formě vykázal mnohem širší spektrum produktů, hlavní složka zůstala zachována z více jak 25 %.

Tab. 4.1: Hlavní složky nalezené ve vzorcích heroinu a kokainu a jejich procentuální zastoupení.

Vzorek heroinu		Vzorek kokainu	
složka	[%]	složka	[%]
kodein	3,9	benzoylekgonin	31,5
morfin	96,1	ekgonin	17,4
		ekgonin methylester	24,2
		kokain	26,9

LITERATURA

- [1] Escotado A.: *Stručné dějiny drog*. Praha, Volvox Globator 2003.
- [2] de Ridder M.: *Heroin od léku k droze*. Praha, Argo 2002.
- [3] Melichar B. a kol.: *Chemická léčiva*. Praha, Avicenum 1972.
- [4] Bečková I., Višňovský P.: *Farmakologie drogových závislostí*. Praha, Karolinum 1999.
- [5] Hampl F., Paleček J.: *Farmakochemie*. Praha, VŠCHT 2002.
- [6] Barrett D. A., Dyssegaard A. L., Shaw P. N.: The effect of temperature and pH on the deacetylation of diamorphine in aqueous solution and in human plasma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **44**, 606–608 (1992).
- [7] Poochikian G. K., Cradock J. C.: Simple high-performance liquid chromatographic method for the separation of 3,6-diacetylmorphine hydrochloride (heroin) and hydrolysis products. *Journal of Chromatography* **171**, 371–376 (1979).
- [8] Klous M. G., Nuijen B., Van Den Brink W., Van Ree J. M., Beijnen J. H.: Diacetylmorphine for injection. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **58**, 287–295 (2004).
- [9] Omar O. A., Hoskin P. J., Johnston A., Hanks G. W., Turner P.: Diamorphine stability in aqueous solution for subcutaneous infusion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **41**, 275–277 (1989).
- [10] Kleinberg M. L., Duafala M. E., Nacov C., Flora K. P., Hines J., Davis K., McDaniel A., Scott D.: Stability of heroin hydrochloride in infusion devices and containers for intravenous administration. *American Journal of Hospital Pharmacy* **47**, 377–381 (1990).
- [11] Varshney K. M.: HPTLC study of the stability of heroin in methanol. *Journal of Planar Chromatography* **15**, 46–49 (2002).
- [12] Visky D., Kraszni M., Hosztafi S., Noszfil B.: HPCE analysis of hydrolysing morphine derivatives. Quantitation of decomposition rate and mobility. *Chromatographia* **51**, 294–231 (2000).
- [13] Derobert L., Le Breton R.: Decomposition of heroin hydrochloride in aqueous solution and application of the opiate control regulations. *Annales de médecine légale, criminologie, police scientifique et toxicologie* **31**, 116–123 (1951). PubMed ID: 14819779
- [14] Poochikian G. K., Cradock J. C.: Stability of Brompton mixtures: determination of heroin (diacetylmorphine) and cocaine in presence of their hydrolysis products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **69**, 637–639 (1980).
- [15] Murray J. B., Al-Shoura H.: Stability of cocaine hydrochloride in aqueous solution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **28** Supp., 24 (1976).

- [16] Denisov N. D.: Effect of hydrogen ion concentration on the stability of injection solutions of atropine sulfate, scopolamine hydrobromide and cocaine hydrochloride. *Farmatsevtichnyi Zhurnal* **22**, 74–79 (1967). PubMed ID: 5600228
- [17] *Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemist*. H. Brandenberger, R. A. A. Maes (eds.). New York, de Gruyter 1997.
- [18] Beaumont I., Deeks T.: Determination of morphine, diamorphine and their degradation products in pharmaceutical preparation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **238**, 520–524 (1982).
- [19] Lee D. K. T., Chiou A. H. J., Wang D. P.: Simultaneous determination of morphine HCl, ketamine HCl and droperidol in 0.9% sodium chloride by HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis* **13**, 93–95 (2005).
- [20] Zhang D., Shi X., Yuan Z., Ju H.: Component analysis of illicit heroin samples with GC/MS and its application in source identification. *Journal of Forensic Sciences* **49**, 81–86 (2004).
- [21] *Recommended methods for testing cocaine. Manual for use by national narcotics laboratories*. United Nations, New York 1986.
- [22] *Recommended methods for testing opium, morphine and heroin. Manual for use by national drug testing laboratories*. United Nations, New York 1998.
- [23] *Methods for impurity profiling of heroin and cocaine. Manual for use by national drug testing laboratories*. United Nations, New York 2005.
- [24] Rook E. J., Hillebrand E. J., Rosing H., van Ree M. J., Beijnen J. H.: The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **824**, 213–221 (2005).
- [25] Concheiro M., de Castro A., Quintela O., Lopez-Rivadulla M., Cruz A.: Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry An application to 156 road fatalities. *Journal of Chromatography B* **832**, 81–89 (2006).
- [26] Fernandez P., Morales L., Vazquez C., Bermejo A. M., Tabernero M. J.: HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Science International* **161**, 31–35 (2006).
- [27] Moravcová, Žáková: Z historie firmy Dr. Ing. Robert Heisler. *Listy muzejní. Elektronický bulletin Českého farmaceutického muzea*, roč. 2003, č. 1, str. 5–6
(přístupno z: <http://www.ceska-apatyka.cz/web2/download/LM1-2003.pdf>)
- [28] Long M. T., Hailes A. M., Kirby G. W., Bruce N. C.: Transformations of morphine alkaloids by *Pseudomonas putida* M10. *American Society for Microbiology* **61**, 3645–3649 (1995).
- [29] Wheeler D. M., Kinstle T. H., Rinehart K. L.: Mass spectral studies of alkaloids related to morphine. *Journal of the American Chemical Society* **89**, 4494–4501 (1967).

- [30] Tsumura Y., Mitome T., Kimoto S.: False positives and false negatives with a cocaine-specific field test and modification of test protocol to reduce false decision. *Forensic Science International* **155**, 154–168 (2005).
- [31] Wang P., Bartlett M. G.: Collision-induced dissociation mass spectra of cocaine, and its metabolites and pyrolysis products. *Journal of Mass Spectrometry* **33**, 961–967 (1998).