

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Elektrochemické studium derivátů fentanylu a jejich
stanovení metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Beáta Pelikánová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Beáta Pelikánová
Název práce:	Elektrochemické studium derivátů fentanylu a jejich stanovení metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2022

Anotace:

Diplomová práce se zabývá studiem syntetických opioidů - fentanylu a jeho analogů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se dvěma způsoby detekce - UV a elektrochemickou detekcí. Syntetické opioidy se řadí mezi nové psychoaktivní látky. Jsou velice návykové a dlouhodobé užívání vede ke vzniku závislosti. Cílem práce je vyvinout analytickou HPLC metodu pro izokratickou eluci ke stanovení fentanylu, jeho metabolitu norfentanylu a jeho analogů – thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu. V průběhu experimentů byly testovány celkem čtyři kolony, přičemž nejlepší separaci poskytovala 15cm oktylsilikagelová kolona. Vyvinutá metoda byla úspěšně testována na vzorku moči, v níž se podařilo detekovat a kvantifikovat 5 ze 6 přidávaných opioidů.

Klíčová slova:	syntetické opioidy, fentanyl, norfentanyl, furanylfentanyl, thiofentanyl, carfentanyl, sufentanyl, HPLC-UV/VIS-ECD
Počet stran:	89
Počet příloh:	21
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Beáta Pelikánová

Title: Electrochemical study of fentanyl derivatives and their determination using HPLC with UV and electrochemical detection

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical chemistry

Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

The year of submission: 2022

Annotation:

This master's thesis focuses on the study of synthetic opioids – fentanyl and its analogues using high-performance liquid chromatography with two methods of detection – UV and electrochemical detection. Synthetic opioids belong to the category of the new psychoactive substances. They are highly addictive and continuous and repeated usage leads to addiction. The aim was to develop an analytical HPLC method with isocratic elution for determination of fentanyl, its metabolite norfentanyl, and its analogues – thiofentanyl, furanylfentanyl, carfentanyl, and sufentanyl. During the experiments, four columns in total were tested, and the best separation was achieved with a 15cm octylsilane column. The developed method was successfully tested on a urine sample, in which 5 of 6 added opioids were detected and quantified.

Keywords: synthetic opioids, fentanyl, norfentanyl, furanylfentanyl, thiofentanyl, carfentanyl, sufentanyl, HPLC-UV/VIS-ECD

Number of pages: 89

Number of appendices: 21

Language: Czech

Prohlášení:

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 29. července 2022

.....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Janě Skopalové, Ph.D za její cenné a odborné rady a zároveň i čas, který mi při vypracování této práce věnovala, a především za její velkou trpělivost. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Radku Jergovi za jeho veškerý čas, který se mnou strávil v laboratoři a rovněž za jeho věcné připomínky. V neposlední řadě děkuji své mamince, která mi umožnila studovat vysokou školu, a také nejbližší rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (projekty IGA_PrF_2021_021 a IGA_PrF_2022_023) a Grantovou agenturou České republiky (projekt 20-07350S).

Obsah

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	SYNTETICKÉ OPIOIDY	11
2.1.1	Fentanyl a norfentanyl	12
2.1.1.1	Vlastnosti, farmaceutické využití fentanylu a jeho zneužívání jako drogy	13
2.1.2	Furanylfentanyl	15
2.1.2.1	Farmakologie a toxikologie	16
2.1.3	Carfentanyl	17
2.1.4	Sufentanyl a thiofentanyl	19
2.2	METABOLISMUS FENTANYLU A JEHO ANALOGŮ	21
2.3	METODY ANALÝZY FENTANYLU A JEHO ANALOGŮ	23
2.3.1	Imunotesty	24
2.3.2	GC-MS	26
2.3.3	LC-MS a LC-MS/MS	26
2.3.4	Elektrochemické techniky	27
2.3.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	31
2.3.6	Potenciometrické stanovení fentanylů	31
2.3.7	Testování a analýza biologického materiálu	32
2.3.7.1	Krev/sérum/plazma	32
2.3.7.2	Moč	32
2.3.7.3	Vzorky od zemřelých jedinců	32
2.3.7.4	Stabilita a skladování	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	34
3.1.1	Chemikálie	34

3.1.2	Pomůcky a přístroje	35
3.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	35
3.3	EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY	36
3.3.1	Analýza fentanylů	36
3.3.2	Příprava reálného vzorku – moči	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Hledání vhodných separačních podmínek	37
4.1.1	Kolona s oktadecylsilikagelovou SF, délka 10 a 15 cm	37
4.1.2	Kolona s oktylsilikagelovou SF	41
4.1.3	CN ⁻ kolona	43
4.2	Hydrodynamické voltamogramy	45
4.2.1	0,05M HCOONH ₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN – 56 : 44	45
4.2.2	0,05M HCOONH ₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN – 57 : 43	46
4.3	Kalibrační závislost	46
4.4	Analýza fentanylů ve vzorku moči	49
4.4.1	Vyhodnocení z kalibrační přímky	51
4.4.2	Vyhodnocení metodou vnitřního standardu DMA	52
4.4.3	Vyhodnocení metodou vnitřního standardu CPA	53
5	ZÁVĚR	55
	Literatura	56
	Příloha A	65
	Příloha B	66
	Příloha C	67
	Příloha D	68
	Příloha E	69
	Příloha F	70
	Příloha G	71
	Příloha H	72
	Příloha I	73
	Příloha J	74

Příloha K	75
Příloha L	76
Příloha M	77
Příloha N	78
Příloha O	79
Příloha P	80
Příloha Q	81
Příloha R	82
Příloha S	83
Příloha T	84
Příloha U	87

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
CNS	Centrální nervová soustava
CPA	<i>N</i> -cyklopentylanilin
DEA	Správa pro vymáhání drog, z angl. <i>Drug Enforcement Administration</i>
ELISA	Enzymová imunoanalýza, z angl. <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EWS	Systém včasného varování, z angl. <i>Early Warning System</i>
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, z angl. <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HEIA	Homogenní enzymová imunoanalýza, z angl. <i>Homogeneous enzyme immunoassay</i>
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IMS	Iontová mobilitní spektrometrie, z angl. <i>Ion Mobility Spectrometry</i>
ISME	Iontově selektivní membránová elektroda, z angl. <i>Ion-Selective Membrane Electrode</i>
LC-HRMS	Kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, z angl. <i>Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s detekcí pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, z angl. <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
LC-TOF-MS	Kapalinová chromatografie s využitím analyzátoru doby letu a detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie, z angl. <i>Liquid Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>
LOD	Mez detekce, z angl. <i>Limit Of Detection</i>
LOQ	Mez stanovitelnosti, z angl. <i>Limit Of Quantification</i>

MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
nLC-EI-MS	Nanokapalinová chromatografie s využitím elektronové ionizace a detekce pomocí hmotnostní spektrometrie, z angl. <i>nano-Liquid Chromatography-Electron Ionization-Mass Spectrometry</i>
NPS	Nové psychoaktivní látky, z angl. <i>New Psychoactive Substances</i>
RIA	Radioimunoanalýza, z angl. <i>RadioImmunoAssay</i>
SERS	Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie, z angl. <i>Surface-Enhanced Raman Spectroscopy</i>
SF	Stacionární fáze
SWGDRUG	Vědecká pracovní skupina pro analýzu zabavených drog, z angl. <i>Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs</i>
UHPLC-Ion-Trap-MSⁿ	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s využitím iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru a detekcí pomocí víceúrovňové hmotnostní spektrometrie, z angl. <i>Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Ion-Trap-Mass Spectrometry (MSⁿ)</i>
UPLC-TOF-MS	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s využitím analyzátoru doby letu a detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie, z angl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>

ÚVOD

Syntetické opioidy řadíme mezi nové psychoaktivní látky, jejichž základem je struktura fentanylu. Existuje mnoho analogů fentanylu (norfentanyl, furanylfentanyl, thiofentanyl, sufentanyl, carfentanyl, ofentanyl atd.). Opioidy bývají používány k utišení velmi silných bolestí, k analgezii a v neposlední řadě jsou zneužívány jako drogy. Jsou velmi návykové a velmi rychle na nich vzniká závislost. Problémem je nízký terapeutický index, a tak velmi často dochází k předávkování, pro jehož léčbu se využívá naloxon. Jedním k významných zástupců této skupiny je fentanyl, který patří mezi agonisty μ -opioidních receptorů a odhaduje se, že je až $100\times$ účinnější než morfin.

K detekci takovýchto látek se využívá nespočet analytických metod, mezi něž můžeme zařadit vysokoúčinnou kapalinou chromatografii s různými typy detekce, nejčastěji však hmotnostní spektrometrii, či plynovou chromatografii ve spojení rovněž s hmotnostní spektrometrií. Problémem je neustálý vývoj nových analogů, a proto musí laboratoře upravovat své metody, aby zachytily co největší množství analogů fentanylů a jejich metabolitů.

Cílem této práce je vyvinutí chromatografické separační metody pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s duální UV a elektrochemickou detekcí ke stanovení fentanylu a jeho analogů při izokratické eluci. Metod nabízejících gradientovou eluci je nespočet, izokratických metod nikoliv. Během experimentů bude vyzkoušeno několik kolon pro zjištění, která z nich bude nabízet nejlepší separaci fentanylu, jeho metabolitu norfentanylu a jeho dalších 4 analog (thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu).

TEORETICKÁ ČÁST

2.1 SYNTETICKÉ OPIOIDY

Syntetické opioidy jsou třídou nových psychoaktivních látek (NPS) k nimž patří také fentanyl a jeho analogy. Od roku 2012 způsobily alarmující počet úmrtí. Samotný fentanyl je silným agonistou μ -opiodního receptoru a odhaduje se, že je 50–100× účinnější než morfin. V 60. letech byl předepisován jako analgetikum, byl zneužíván pro své euforické účinky. V posledních desetiletích byla vyvinuta spousta analogů fentanylu. Analogy, které se nedávno objevily jako NPS, se obvykle vyrábějí modifikací nebo nahrazením fentanylového propionylového řetězce (acetylfentanyl, butyrylfentanyl,...) nebo nahrazením ethylfenylové skupiny (isofentanyl). Existují i varianty, které jsou substituovány fluorovými, chlorovými či methoxyskupinami na *N*-fenylovém kruhu. Analogy fentanylu jsou vysoce účinné, ale jejich velkým problémem je malý terapeutický index, což je poměr mezi dávkou účinnou a smrtelnou. Čím vyšší je tento poměr, tím větší je relativní “bezpečnost“ léčiva.

Opioidy mohou být použity jako léky na předpis, které se často podávají k úlevě od bolesti, včetně anestezie, nebo mohou být zneužívány jako nelegální drogy, např. heroin. V současné době se nové opioidy, zejména deriváty fentanylu, staly významným problémem jak pro orgány činné v trestním řízení, tak i pro odborníky v oblasti veřejného zdraví. Mezi léty 2009–2018 bylo do EWS Evropské unie nahlášeno 49 nových syntetických opioidů, včetně 11 hlášených poprvé v roce 2018. [1]

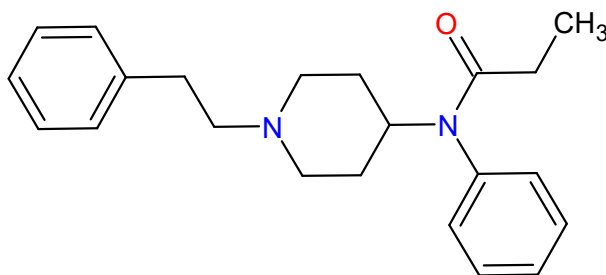
Opioidy jsou velice návykové a jejich chronické užívání vede k rychlému rozvoji tolerance k jejich účinkům. Uživatelé tedy vyžadují stále vyšší dávky, které způsobují riziko respirační deprese, zástavy dechu a smrtelného předávkování. [1]

Pro léčbu předávkování opioidy se standardně používá naloxon. Tato látka je krátkodobě působící polosyntetický kompetitivní antagonist opioidních receptorů s nejvyšší afinitou k μ -receptoru, ale blokuje také δ - a κ -receptory. Jedná se o standardní léčivo pro léčbu předávkování opioidy. Rychle zvrátí klinické příznaky předávkování opioidy, zejména respirační deprese. Včasná podání je zásadní pro snížení úmrtnosti. Kromě zastavení účinků opioidů může naloxon u závislého pacienta, který je pod jejich vlivem, vyvolat abstinenci příznaky. Lék lze podávat intravenózně, intramuskulárně, subkutánně a intranasálně. [2]

Užívání i zneužívání fentanylu a jeho analog se kontroluje obvykle pomocí pokročilých analytických technik, zejména HPLC-MS, v různých tělních tekutinách. Vhodným vzorkem pro testování přítomnosti a množství drogy je moč, jejíž odběr je neinvazivní. Přibližně 85 % fentanylu se vylučuje během 72 hodin močí a stolicí, většinou jako metabolity (norfentanyl generovaný *N*-dealkylací piperidinového kruhu), méně než 8 % se vylučuje beze změny. [3]

2.1.1 Fentanyl a norfentanyl

Fentanyl¹, (Obrázek 2.1), je syntetický opioid, který byl vyvinut pro farmaceutické použití v roce 1960 Paulem Janssenem v Belgii. Je účinný agonista μ -opioidního receptoru s terapeutickými aplikacemi při zvládnání bolesti a sedaci. Fentanyl rychle prochází hematoencefalickou bariérou díky své vysoké rozpustnosti v tucích; má rychlý nástup a krátké trvání účinku. Do lékařské praxe byl zaveden jako intravenózní anestetikum pod obchodním názvem Sublimaze v 60. letech 20. století. [2]



Obrázek 2.1: Strukturní vzorec fentanylu

Koncem 80. let firma Janssen Pharmaceutica představila transdermální fentanylovou náplast navrženou k podávání kontinuálních dávek lipofilního narkotika přes kůži. Od svého zavedení ve Spojených státech v roce 1970 se fentanyl rychle stal předním analgetikem a anestetikem s 50–100× vyšší účinností, kratším nástupem a rychlejší absorpcí lidským tělem než morfin. S postupným rozšiřováním docházelo ke zneužívání nelegálně vyráběných analogů fentanylu, které se ukázaly jako významná hrozba pro zdraví. Mnohem častěji dochází k syntetizování v asijských zemích, které distribuují analogy fentanylu na trh do Spojených států i Evropy. Například carfentanyl (elephant tranquilizer) vstoupil na americký trh v roce 2016 a je známo, že je až 100× účinnější než fentanyl. [4] Běžné příznaky vzniklé předávkováním fentanylem zahrnují apnoe a respirační selhání, které mohou mít za následek smrt. [5]

¹Fentanyl – *N*-fenyln-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]propanamid

První zpráva o analogu fentanylu, který je k dispozici na drogovém trhu ve Spojených státech, se datuje do roku 1979. V té době způsobila droga s názvem “China White“ a prodávaná jako heroin četná předávkování. Po další analýze byla tato droga identifikována jako α -methylfentanyl.

2.1.1.1 Vlastnosti, farmaceutické využití fentanylu a jeho zneužívání jako drogy

Základní fyzikálně-chemické vlastnosti týkající se fentanylu lze nalézt v *Tabulce 2.1*.

Tabulka 2.1: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností fentanylu

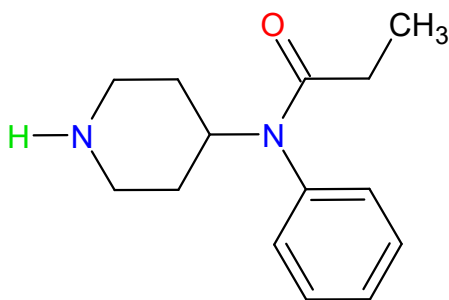
Molární hmotnost	336,47 g/mol	[6]
Teplota varu (predikovaná)	466,2 ± 38,0 °C	[6]
Teplota tání	83–84 °C	[6]
Hustota (predikovaná)	1,087 ± 0,06 g/cm ³	[6]
pK_a (predikovaná)	8,92 ± 0,20	[6]
Log P (predikovaná)	3,686 ± 0,357	[6]
Rozpustnost ve vodě při pH = 7,04	0,74 mg/ml	[7]

Farmaceutické přípravky obsahující fentanyl jsou dostupné ve formách orálních trans-mukózních pastilek, bukalních tablet, sublingválních tablet, sublingválních sprejů, nosních sprejů, výše zmíněných transdermálních náplastí a v injekční formě. Kromě analgezie snižuje fentanyl (i jeho analogy) schopnost dýchacího ústrojí, zúžuje zornice a vyvolává ospalost a euforii. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří nevolnost, závratě, zvracení, únava, bolest hlavy a zácpa. Mezi charakteristické abstinenční příznaky řadíme pocení, úzkost, průjem, bolest kostí, křeče v břiše a třes či husí kůže. Vzhledem k úzkému terapeutickému indexu je použití fentanylu na drogovém poli mimořádně nebezpečné. Vysoké dávky mohou mít za následek smrt v důsledku zástavy dýchání a plicního edému. Důležitou poznámkou je, že k vážným interakcím může dojít právě tehdy, když jsou fentanyly smíchány s heroinem, kokainem, alkoholem a dalšími látkami tlumícími CNS (zejména benzodiazepiny). Terapie pacientů, kteří jsou intoxikováni fentanyly, spočívá v podávání naloxonu, kyslíku, intravenózních tekutin a v intubaci. [2]

Mezi různými přípravky obsahujícími fentanyl, které jsou k dispozici na lékařský předpis, se v posledních letech věnuje stále větší pozornost zneužívání transdermálních náplastí fentanylu. Ty mohou být zneužity hned několika způsoby:

1. mohou být umístěny do skleněných nádob, zahřívány a kouřeny,
2. obsah gelu odstraněný z náplastí může být vstříknut do žíly nebo požit,
3. gel může být seškrábnut a vykouřen,
4. náplasti mohou být spařeny v malém objemu vody a roztok aplikován intravenózně,
5. zmrazené náplasti mohou být rozřezány na kousky a poté rozžvýkány, vloženy pod jazyk (pro absorpci ústní sliznicí) nebo vloženy do konečníku. [2]

Norfentanyl², (Obrázek 2.2), je hlavním metabolitem fentanylu a jeho základní fyzikálně-chemické vlastnosti shrnuje Tabulka 2.2. Má roli jako opioidní analgetikum a metabolit drogy. [8]



Obrázek 2.2: Strukturní vzorec norfentanylu

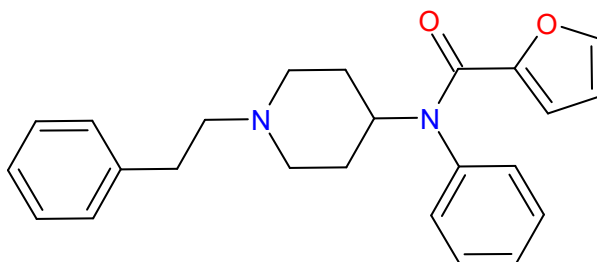
Tabulka 2.2: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností norfentanylu

Molární hmotnost	232,32 g/mol	[6]
Teplota varu (predikovaná)	359,8 ± 35,0 °C	[6]
Teplota tání	83–85 °C	[6]
Hustota (predikovaná)	1,075 ± 0,06 g/cm ³	[6]
p <i>K</i> _a (predikovaná)	9,81 ± 0,10	[6]
Log <i>P</i> (predikovaná)	1,667 ± 0,361	[6]

²Norfentanyl – *N*-fenyl-*N*-(piperidin-4-yl)propionamid

2.1.2 Furanylfentanyl

Furanylfentanyl³, (Obrázek 2.3), je analogem fentanylu, v jehož struktuře je ethylová skupina fentanylu nahrazena heterocyklickým furanovým kruhem. Byl původně syntetizován a patentován v roce 1986, viz Obrázek 2.4. Syntéza začíná reakcí 1-(2-fenylethyl)-4-piperidonu s anilinem; výsledná Schiffova báze je redukována tetrahydridoboritanem sodným na odpovídající diamin, který následně reaguje s 2-furoylchloridem (acylační činidlo) za vzniku furanylfentanylu. Jeho základní vlastnosti shrnuje Tabulka 2.3. Má jeden polohový izomer – 3-furanylfentanyl. Nikdy nebyl testován na lidech a testy na zvířatech naznačují, že jeho účinky jsou srovnatelné s fentanylem. [9, 10]

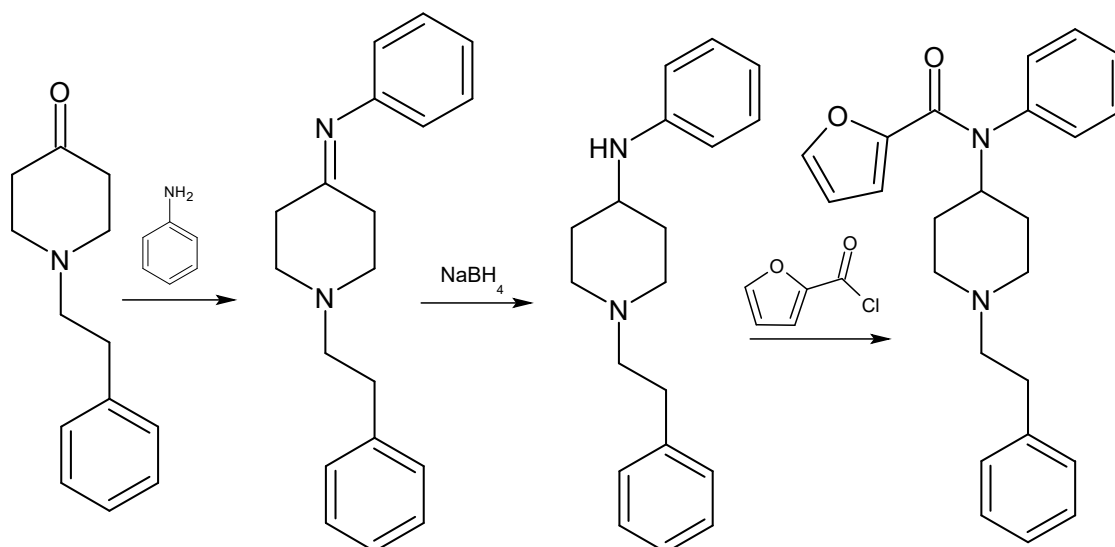


Obrázek 2.3: Strukturální vzorec furanylfentanylu

Tabulka 2.3: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností furanylfentanylu

Molární hmotnost	374,48 g/mol	[6]
Teplota varu (predikovaná)	517,2 ± 50,0 °C	[6]
Teplota tání (hydrochlorid)	232,7 °C	[11]
Hustota (predikovaná)	1,164 ± 0,06 g/cm ³	[6]
p <i>K</i> _a (predikovaná)	8,71 ± 0,10	[6]
Log <i>P</i> (predikovaná)	5,277 ± 0,0431	[6]

³Furanylfentanyl – *N*-fenyl-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]furan-2-karboxamid



Obrázek 2.4: Syntéza furanylfentanylu; převzato a upraveno [12]

Metabolismus tohoto analogu fentanylu nebyl až donedávna studován. Jeho zapojení do fentanylové krize zmobilizovalo vědce k dalšímu zkoumání metabolických drah této drogy s cílem objasnit jeho farmakokinetický profil. Metabolické studie furanylfentanylu provedli Goggin a kol. se vzorky moči. Moč byla nejprve analyzována pomocí LC-MS/MS na přítomnost *N*-dealkylovaného normetabolitu furanylnorfentanylu, poté analyzována pomocí metody UPLC-TOF-MS, která posloužila pro identifikaci dalších metabolitů. Toto byla zatím první studie odkazující na možné metabolické dráhy. Watanabe a kol. provedli *in vivo* a *in vitro* metabolické profilování furanylfentanylu a třech dalších analog fentanylu. [12]

2.1.2.1 Farmakologie a toxikologie

Studie publikovaná v roce 1988 poukázala na to, že molekulární modifikace může ovlivnit trvání účinků u 4-anilinopiperidinových analgetik. Zdá se, že přítomnost 2-furylové skupiny v molekule furanylfentanylu je zodpovědná za zvrácení respirační deprese způsobené morfinem. [12]

Furanylfentanyl je považován za velmi nebezpečnou drogu, protože jeho letální dávka se pohybuje v řádech mikrogramů. Účinky na centrální nervový systém jsou podobné účinkům fentanylu. Problémem je, že jeho účinky se neprojevují okamžitě, a proto dochází v mnoha případech ke zvyšování dávky, aby se dosáhlo maximálních farmakologických účinků; tato skutečnost často vede k předávkování. Pokud uživatel nezemře na předávkování, mohou nižší dávky způsobit rovněž smrt v důsledku zástavy srdce, která následuje po respiračních problémech. Nástup účinku nastává po 1–10 min, analgezie trvá 1–3 hod a následné účinky lze pozorovat rovněž 1–3 hod. [12] Porovnání nástupu, doby působení a doznívání účinků fentanylu a furanylfentanylu při různých dávkách a způsobech podání drogy je uvedeno v *Tabulce 2.4*.

Tabulka 2.4: Dávka a doba působení syntetických opioidů [2]

FENTANYL						
	Dávka			Působení		
	Lehká	Běžná	Silná	Počátek	Doba působení	Doznívání
Nosní podání	10–25 µg	25–50 µg	50–75 µg	—	—	—
Kožní podání	12,5 µg/h	25–50 µg/h	50–100 µg/h	2–4 h	48–72 h	—
Bukální podání	—	—	—	15–30 min	1–4 h	—
Insuflace	—	—	—	15–30 min	1–4 h	—
FURANYLFENTANYL						
Podání ústy	0,3–0,5 mg	0,5–0,9 mg	0,9–1,6 mg	—	—	—
Insuflace	0,2–0,4 mg	0,4–0,8 mg	0,8–1,6 mg	1–10 min	1–3 hod	1–3 hod

V posledních měsících roku 2017 vedlo široké rozšíření furanylfentanylu ke zvýšenému počtu záchytů drogy ve Spojených státech, Kanadě, Austrálii i v Evropě. Podle údajů DEA uvedených ve zprávě o rozvíjejících se hrozbách za poslední čtvrtletí roku 2016 je furanylfentanyl po fentanyl v zabavených a analyzovaných materiálech druhou převládající látkou mezi opioidy/analgetiky. V letech 2016 a 2017 v USA a Kanadě bylo zadrženo přes 35 kg této látky, dále i lahvičky s očními kapkami obsahující furanylfentanyl. V Austrálii a Evropě bylo zadrženo množství v řádech gramů. [12]

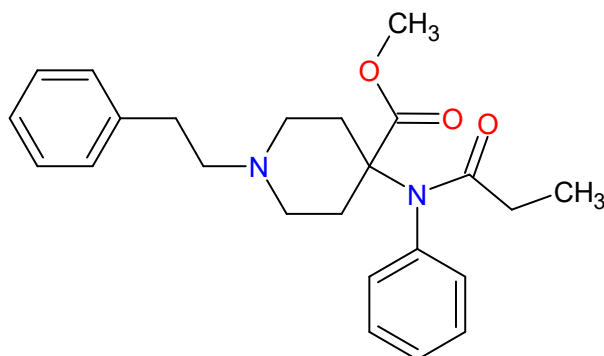
2.1.3 Carfentanyl

Carfentanyl⁴, (Obrázek 2.5), byl poprvé syntetizován chemiky v Janssen Pharmaceutical v roce 1974 a označen jako Wildnil. Fyzikálně-chemické vlastnosti toho analogu znázorňuje Tabulka 2.5. Od doby, kdy byl syntetizován, byl rozsáhle studován na zvířatech, ale bylo popsáno i několik studií na lidech. Droga je velmi silným agonistou opioidních receptorů s pořadím podle účinnosti $\mu \gg \delta > \kappa$. Vazebné studie zjistily, že vypočtené hodnoty K_i ⁵ pro lidské opioidní receptory jsou 0,024 nmol/l (μ_1), 3,3 nmol/l (δ) a 43 nmol/l (κ). Pro srovnání hodnoty K_i pro fentanyl jsou 1,9 nmol/l (μ_1), 153 nmol/l (δ) a 197 nmol/l (κ). Odhaduje se, že klinická účinnost carfentanylu je 10 000× vyšší než u morfinu, 4 000× vyšší než u heroínu a 100× vyšší než u fentanylu, což z něj činí jeden z nejsilnějších, nejúčinnějších a komerčně známých opioidů. Používat jej smí pouze veterináři jako uklidňující prostředek pro velká volně žijící zvířata (sloni, medvědi, gazely, prasata, vlci,...), pro vyšetření a procedury. Byl také používán jako chemická zbraň, což z něj činí velmi vážné riziko pro veřejnost. [2]

⁴Carfentanyl – methyl-1-(2-fenylethyl)-4-(N-propanoylanilino)piperidin-4-karboxylát; 4-karbomethoxyfentanyl

⁵ K_i - inhibiční konstanta, která charakterizuje vztah mezi enzymem a inhibitorem, neboli disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor (EI)

Carfentanyl je bílý prášek, ale byl identifikován i jako růžový, či hnědý prášek spolu s dalšími látkami. Carfentanyl citrát je bez zápachu a je vysoce rozpustný ve vodě. Lze jej strukturně potvrdit pomocí infračervené spektroskopie, nukleární magnetické rezonance, plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií či hmotnostní spektrometrií s poměrem izotopů. [13]



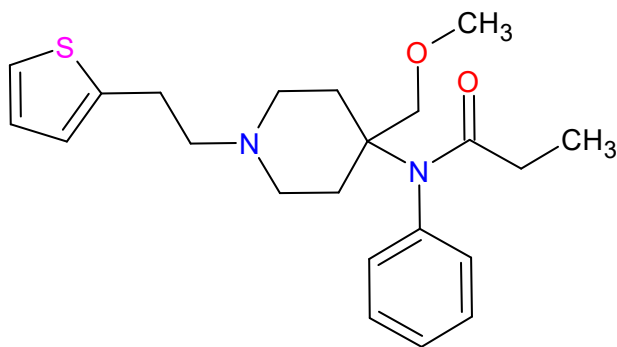
Obrázek 2.5: Strukturní vzorec carfentanylu

Tabulka 2.5: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností carfentanylu

Molární hmotnost	394,51 g/mol	[6]
Teplota varu (predikovaná)	508,1 ± 50,0 °C	[6]
Hustota	1,142 ± 0,06 g/cm ³	[6]
p <i>K_a</i> (predikovaná)	7,76 ± 0,20	[6]
log <i>P</i> (predikovaná)	3,684 ± 0,611	[6]

2.1.4 Sufentanyl a thiofentanyl

Sufentanyl⁶, (Obrázek 2.6), je syntetický silný opioid s vysoce selektivní vazbou na μ -opioidní receptory. Tyto receptory jsou široce distribuovány v lidském mozku, míše a dalších tkáních lidského těla.



Obrázek 2.6: Strukturální vzorec sufentanylu

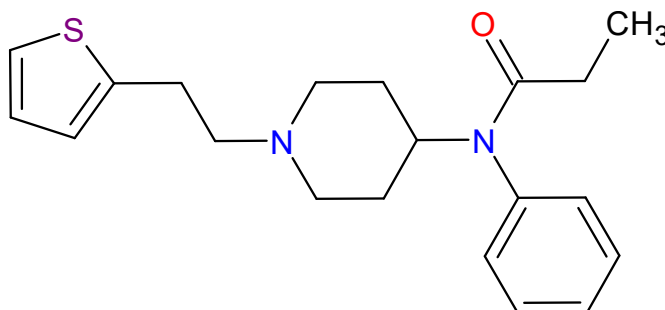
Jeho základní charakteristika je shrnuta v *Tabulce 2.6*. Používá se jako doplněk při anestezii a jako primární anestetikum. Podává se intravenózně, epidurálně a sublingválně. Sublingvální forma, vyrobená společností AcclRx Pharmaceuticals, byla schválena 2. listopadu 2018; tento způsob podání má být jednoduchou, efektivní, neinvazivní analgetickou možností, která má zdravotníkům umožnit rychleji zvládnout akutní bolest bez intravenózního či epidurálního podání. Má některé užitečné farmakologické zvláštnosti - je 5–10× účinnější než fentanyl, ale má kratší dobu účinku. [14]

Tabulka 2.6: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností sufentanylu

Molární hmotnost	386,55 g/mol	[6]
Teplota tání	96,6 °C	[6]
Teplota varu (predikovaná)	493,1 ± 40,0 °C	[6]
Hustota	120 g/cm ³	[6]
p <i>K</i> _a (predikovaná)	7,89 ± 0,20	[6]
log <i>P</i> (predikovaná)	3,950 ± 0,462	[6]

⁶Sufentanyl – *N*-fenyl-*N*-4-(methoxymethyl)-1-[2-(thiopen-2-yl)ethyl]piperidin-4-ylpropanamid

Thiofentanyl⁷, (Obrázek 2.7), je silné analgetikum a anestetikum, které se prodávalo na černém trhu v 80. letech před zavedením federálního zákona o analozích[15]. Má podobnou cestu syntézy jako fentanyl, ale při syntéze se fenethylbromid nahradí 2-(2-bromethyl)thiofenem. Více vlastností shrnuje *Tabulka 2.7*. [16]



Obrázek 2.7: Strukturní vzorec thiofentanylu

Tabulka 2.7: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností thiofentanylu

Molární hmotnost	342,50 g/mol	[6]
Teplota varu (predikovaná)	467,7 ± 40,0 °C	[6]
Hustota (predikovaná)	1,145 ± 0,06 g/cm ³	[6]
p <i>K</i> _a (predikovaná)	8,29 ± 0,20	[6]
log <i>P</i>	3,550 ± 0,402	[6]

⁷Thiofentanyl (thienylfentanyl) – *N*-fenyl-*N*-[1-[2-(2-thienyl)ethyl]-4-piperidiny]propanamid

2.2 METABOLISMUS FENTANYLU A JEHO ANALOGŮ

Znalost metabolismu fentanylu a jeho analogů je nezbytná mimo jiné pro identifikaci podávané/ých látky/látek, viz *Obrázek 2.8*. Studium těchto procesů je kritické vzhledem k jejich krátkému biologickému poločasu (jednotky hodin) a následně krátké detekční možnosti původního/původních fentanylu/ů v krvi. Identifikace charakteristických metabolitů, především v moči, může přispět k přesné identifikaci mateřské látky/látek. [17]

Metabolismus xenobiotik se často skládá z těchto dvou fází:

První fáze zahrnuje modifikaci mateřské molekuly redukcí, oxidací, dekarboxylací, deaminací, dehalogenací nebo hydroxylací, aby se ve většině případů stala droga méně biologicky aktivní a aby se připravila na fázi (2); z těchto reakcí je zvláště důležitá hydroxylace, která je katalyzovaná enzymy cytochromu P450.

Druhá fáze zahrnuje konjugaci drogy, často po modifikaci ve fázi (1), buď s hydrofilními nebo hydrofóbními skupinami, aby byla rozpustná v moči pro vylučování ledvinami nebo rozpustná ve žluči pro vylučování stolicí. [18]

Zatímco metabolity morfinu jsou farmakologicky aktivní, metabolity fentanylu a lékařsky schválených derivátů fentanylu jsou většinou neaktivní. Fentanyl je metabolizován hlavně v játrech na hlavní metabolit norfentanyl (26–55 % dávky fentanylu). Tato metabolická cesta je způsobena cytochromem CYP3A4 spolu s izoenzymy CYP3A5 a CYP3A7 prostřednictvím oxidativní *N*-dealkylace piperidinového kruhu. Může být také amidově hydrolyzován na despropionylfentanyl, nebo hydroxylován na ethylovém řetězci na hydroxyfentanyl, který je *N*-dealkylován na hydroxynorfentanyl [20]. Prochází rychlou a rozsáhlou biotransformací a má krátký biologický poločas, 98,6 % dávky je eliminováno z plazmy během jedné hodiny. Méně než 8 % se vylučuje v nezměněné podobě [18]. Byl navržen tak, aby byl vysoce lipofilní, aby mohl pronikat přes membrány a fyziologické brány (hematoencefalická bariéra). Vylučování xenobiotik močí vyžaduje, aby drogy, resp. jejich metabolity byly hydrofilní, proto eliminace fentanylu ledvinami zahrnuje jeho biotransformaci na polárnější metabolity. [18] Metabolity jsou přítomny především ve slinách, moči, stolici a plazmě. Asi 70 % podané dávky se vyloučí močí za 72 hodin (většinou ve formě metabolitů) a asi 10–20 % se vyloučí v nezměněné podobě za 48 hodin, pouze 8–10 % nezměněného fentanylu se z těla uvolňuje ledvinami nebo stolicí. [17]

Furanylfentanyl a jeho 4 metabolity byly nalezeny ve vzorcích odebraných intoxikovaným pacientům. Téměř ve všech případech byl nalezen produkt hydrolyzy 4-anilino-*N*-fenethylpiperidin (4-ANPP) a jeho sulfátový konjugát. Unikátní metabolit, vytvořený tvorbou dihydrodiolu heterocyklické furanylové skupiny, byl pozorován v 86 % případů. Na druhou stranu, *N*-dealkylovaný metabolit furanylfentanylu byl detekován jen zřídka. [17]

Pro carfentanyl nebyla doposud publikována studie o metabolických drahách této drogy *in vivo* u lidí. Identifikace metabolitů carfentanylu byla provedena pomocí lidských jaterních mikrozomů a lidských hepatocytů. Carfentanyl a jeho metabolit, norfentanyl, se mohou hromadit v lidském těle, což může způsobit rezistenci na antidotum. [17]

Sufentanyl je metabolizován podobně jako fentanyl (jaterní cesta na identické *N*-dealkylované produkty), a proto ho nelze odlišit od fentanylu metodami, které detekují pouze produkty metabolické transformace. [17]

2.3 METODY ANALÝZY FENTANYLU A JEHO ANALOGŮ

Podle doporučení SWGDRUG je třeba pro stanovení použít minimálně dvě analytické techniky. Použité analytické techniky mohou zahrnovat imunotesty, GC-MS, LC-HRMS či LC-MS/MS. Kvůli neustálému objevování nových a nových analogů musí forenzní laboratoře přizpůsobovat své analytické metody tak, aby držely krok s trendy a zároveň zachovaly *status quo* v identifikaci analogů fentanylu a jejich metabolitů v biologických vzorcích. [18]

Široká škála možných matic vzorků vyžaduje flexibilní, přenosné a levné analytické techniky schopné rychle indikovat přítomnost a relativní hrozbu fentanylu a jeho analogů. U biologických kapalných vzorků je kvantifikace fentanylu nebo analogů fentanylu v reálném čase nezbytná pro odhad efektivní terapeutické dávky. Dříve byly používány metody jako Ramanova spektroskopie (SERS) či chromatografické metody s různými detektory. Zatímco chromatografické metody jsou považovány za „zlatý standard“ pro kvantitativní analýzu, jejich provoz je obecně drahý, jsou omezeny na centralizovanou laboratoř a vyžadují technicky vyškolené odborníky. Nicméně kvůli obrovskému počtu analogů fentanylu, které lze snadno oddělit a identifikovat pomocí chromatografie, mohou být tyto metody nejvhodnější pro analytickou kvantifikaci těchto látek. Pro detekci fentanylu byly použity i jiné metody použitelné v terénu, jako je nanokapalinová chromatografie s využitím elektronové ionizace a detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (NLC-EI-MS), ruční SERS a iontová mobilní spektrometrie (IMS), bohužel mohou být nákladné. [5]

2.3.1 Imunotesty

Imunotesty jsou předběžnou screeningovou technikou běžně používanou k předpokládané identifikaci v případě přítomnosti drog v biologických vzorcích. Využívají protilátky, které jsou specifické pro proteinový ligand, a které se naváží na cílovou molekulu analytu (antigen). Vytvořený imuno-komplex se oddělí od nenavázaných částic a následně se sleduje signál volné nebo vázané frakce. I když lze imunotesty s vysokou propustností automatizovat a mohou poskytovat rychlé, citlivé a nákladově efektivní výsledky, v důsledku malých strukturálních rozdílů mezi morfinem a syntetickými opioidy imunotesty používané v rutinních klinických testech často nereagují právě na syntetické analogy. Proto je třeba potvrdit přítomnost či identifikovat příslušný analog pomocí hmotnostní spektrometrie. Avšak v případech, kdy potřebujeme identifikovat samotný fentanyl, se využít dají – např. při analýze fentanylu ve vlasech [21]. Křížová reaktivita fentanylu a analogu fentanylu v moči byla popsána pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA) vyvinuté společností Janssen Life Sciences. [18]

Farmakokinetické vlastnosti fentanylu činí návrh spolehlivého screeningového imunotestu fentanylu náročným. Fentanyl má krátký plazmatický poločas⁸ a rychle se biotransformuje na několik metabolitů, včetně norfentanylu, despropionylfentanylu, hydroxyfentanylu a hydroxynorfentanylu, které se všechny objevují v moči. Odhaduje se, že pouze 6 % fentanylu se objevuje v moči v nezměněné podobě, takže imunotesty zaměřené na mateřskou sloučeninu musí být schopny detekovat relativně nízké koncentrace fentanylu v řádu ng/ml (3 nmol/l). Snyder a kol. [22] testovali technickou výkonnost, diagnostickou

⁸Plazmatický poločas – čas, za který koncentrace látky v krevní plazmě klesne na polovinu ustáleného stavu

přesnost a klinickou využitelnost nového automatizovaného fentanylového homogenního enzymového imunotestu (HEIA) v moči pacientů léčených pro chronickou bolest. Stanovení v moči pomocí HEIA použili i autoři článku [23], kde limit detekce pro fentanyl byl 1 ng/ml.

Angelini a kol. [24] detekují fentanyl a jeho analogy pomocí laterálního průtokového imunotestu (LFI) pomocí testovacích proužků. Oba testy byly navrženy jako kompetitivní LFI; jeden pruh v testovací oblasti indikuje pozitivní výsledek, dva pruhy znamenají výsledek negativní. Hodnotili účinnost LFI při detekci fentanylu ve směsích, protože fentanyl se často při pouličním prodeji mísí s jinými nelegálními drogami (nejčastěji heroinem). Autoři měli obavy, že heroin by mohl maskovat přítomnost fentanylu v neznámém vzorku, a proto byly vytvořeny směsi fentanylu a heroinu v poměru 1 : 10. Všechny testy obsahující fentanyl přinesly pozitivní výsledky a přítomnost heroinu v tomto poměru neměla žádný vliv na výkonnost LFI. LFI se dá využít k detekci fentanylu, heroinu, carfentanylu a dalších v moči a ve slinách [25], k detekci fentanylu a jeho analogů v zadržovaných vzorcích a posmrtné moči [26]. V publikaci [27] bylo srovnáno 19 komerčně dostupných imunotestů na třiceti analogích fentanylu. Fentanyl a některé blízké příbuzné analogy byly detekovány bez problémů, ale některé strukturně rozmanitější deriváty (např. 4-methoxybytyrylfentanyl nebo 3-methylfentanyl) nebyly detekovány správně. Carfentanyl byl detekován pouze soupravami speciálně navrženými pro jeho detekci.

Využití imunotestů neslouží jen k detekci fentanylu a jeho metabolitů v lidských vzorcích. Častým využitím je detekce ve vzorcích od zvířat, konkrétně u dostihových koní pomocí ELISA nebo RIA, kde jsou nejčastějšími vzorky krev a moč. [28], [29]

Imunotesty ELISA využili autoři publikace [30], kteří vyvinuli vysoce citlivé homogenní imunotesty pro detekci fentanylu v moči při minimální koncentraci 2 ng/ml. Detekci v moči nejen pomocí ELISA, ale i pomocí zkřížené reaktivity využili autoři [31], kde byla lidská moč obohacena o fentanyl nebo jeho analogy; výsledky ukazují, že test ELISA byl schopen detekovat fentanyl v moči s limitem detekce 0,25 ng/ml. Využít se dá rovněž pro stanovení fentanylu, opiátů a benzodiazepinů ve vlasech, přičemž pozitivní výsledky ELISA byly potvrzovány pomocí GC nebo LC-MS [32]. Pro stanovení fentanylu v koňské plazmě a moči využili autoři [33] komerční testovací soupravy ELISA; měření fentanylu po intravenózním a intramuskulárním podání v neředěné plazmě ale nebylo reprodukovatelné, zatímco kvantifikace fentanylu v moči byla závislá na složení. Komerčně dostupné testy ELISA s využitím zkřížené reaktivity ke zjištění vhodnosti pro účely toxikologického screeningu využili autoři [34].

2.3.2 GC-MS

Hmotnostně spektrometrická detekce v GC využívá obvykle elektronovou ionizaci, při níž jsou vzniklé ionty charakteristicky fragmentovány. K identifikaci látek využívá porovnání získaných hmotnostních spekter se spektry v knihovnách. Přímé stanovení drog, které nejsou těkavé, jsou polární a tepelně nestabilní, obvykle není možné. Proto se používají postupy úpravy vzorku, např. derivatizace, které jsou nejen časově, ale i finančně náročné. [18]

GC-MS nebo GC-MS/MS slouží ke stanovení fentanylu a jeho analogů v moči [35], [36], [37], [38], v plné krvi [39], ve vlasech [40], [41], z materiálu nalezeného na místě činu [42], plazmě nejen pomocí GC-MS, ale i GC-AFID [43].

2.3.3 LC-MS a LC-MS/MS

Vzhledem k pokroku v kapalinové chromatografii a hmotnostní spektrometrii je kombinace těchto metod stále více využívána díky snadněji aplikovatelnému přístupu na širokou škálu analytů. LC-MS se stále více používá jako metoda pro detekci a kvantifikaci drog a jejich metabolitů. Můžeme obejít úskalí, které skrývá GC-MS (derivatizace, tepelná nestabilita). Zajímavé použití nabízí **LC-TOF-MS**, které poskytuje vysokou přesnost změřené hmotnosti jako pomůcku při identifikaci klíčových metabolitů. [18]

Z důvodu syntetizování neustále nových analogů s mnohem silnějším účinkem je třeba vytvořit metody, které budou schopny detekovat takové látky. Jednou z úspěšně používaných metod je **UHPLC-Ion-Trap-MSⁿ** pomocí níž autoři stanovili 13 analog fentanylu (acetylfentanyl, alfentanyl, β -hydroxythiofentanyl, butyrylfentanyl, carfentanyl, despropionylfentanyl, fentanyl, furanylfentanyl, norfentanyl, 4-fluorisobutyrylfentanyl, 4-fluorbutyrylfentanyl, sufentanyl a valerylfentanyl (U-47700)). [44]

Tandemová hmotnostní spektrometrie se často používá k charakterizaci fragmentačních drah a ke stanovení elementárního složení při kompenzaci špatné chromatografické kapacity LC. To se provádí pomocí dvou sekvenčních kvadrupólových hmotnostních filtrů. Pro identifikaci a kvantifikaci fentanylových sloučenin slouží monitorování vícenásobných reakcí. Mez detekce v krvi a moči při použití této metody se pohybují v rozmezí 0,01–0,5 ng/ml pro nové opioidní sloučeniny, včetně acetylfentanylu či hlavního metabolitu norfentanylu. [18]

LC-TOF-MS se využívá velmi zřídka, ale v tomto spojení můžeme provést screening 67 drog a metabolitů v séru nebo plazmě [45]. Mnohem více využívané je spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, kdy je možno stanovit fentanyl a jeho 18 analogů [46], pomocí multiplexní detekce lze stanovit fentanyl a jeho analogy v plné krvi [44], v krvi, séru, plazmě a moči [47], [1], v plazmě a slinách [48] nebo ze sušených krevních skvrn [49].

2.3.4 Elektrochemické techniky

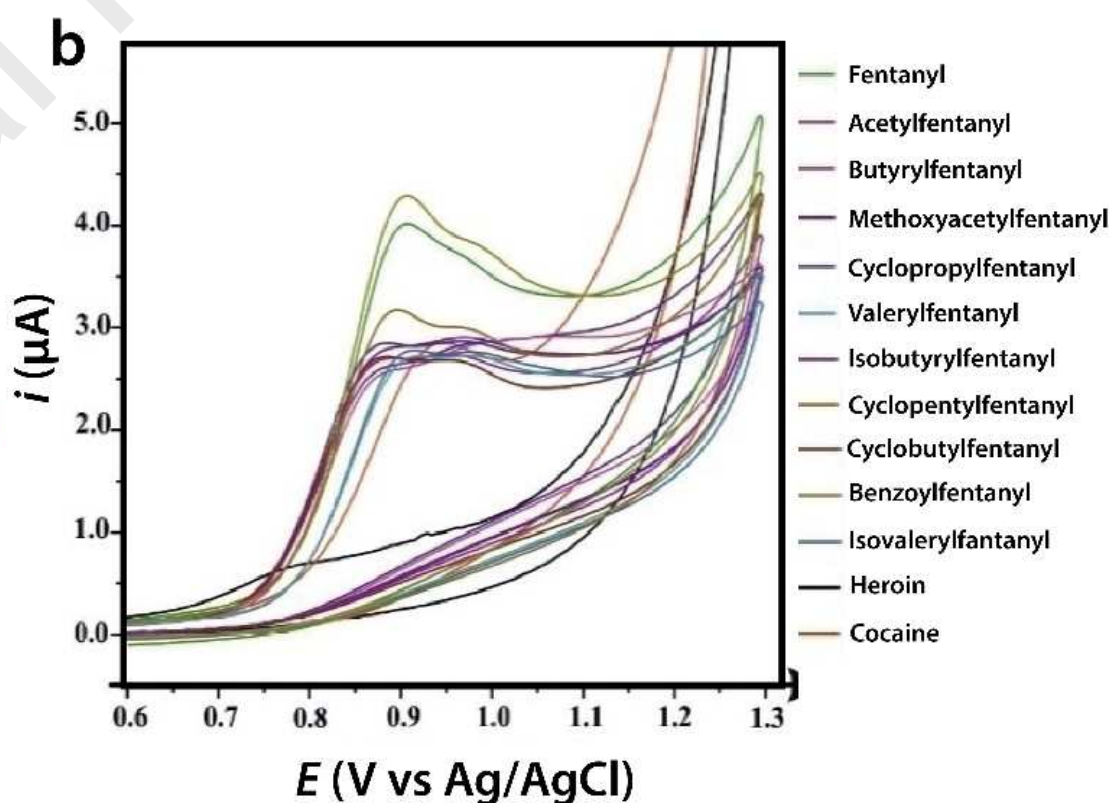
Elektrochemické techniky byly široce demonstrovány pro terénní screening pro různé analyty a nabízejí kombinace rychlé doby odezvy a vysoké citlivosti spolu s přenosným levným přístrojovým vybavením. Elektrochemická zařízení jsou proto mimořádně atraktivní pro decentralizovanou detekci jako nástroje poskytující rychlé chemické informace na pomoc při zvládnání problémů. [50]

Elektrochemická detekce je relativně levná, přenosná a rychlá, ale současné metody postrádají dostatečnou selektivitu nezbytnou pro pozitivní identifikaci a kvantifikaci různých analogů fentanylu. Elektroanalytická zařízení se tedy mohou nejlépe hodit jako výchozí indikátory fentanylu nebo jeho analogů buď v prášcích nebo přímo v biologických tekutinách pro analýzu na místě – nabízejí příležitost rychle identifikovat druhy opioidů přítomné v krvi či moči pacienta tak, aby mohla být podána účinná dávka. Výhody elektroanalýzy tedy spočívají v poskytování rychlých, kvalitativních informací na pomoc při zvládnání epidemie fentanylu v první linii. Tento přístup zdůrazňuje nejnovější vývoj v oblasti elektrochemické detekce fentanylu prostřednictvím voltametrických metod. [5]

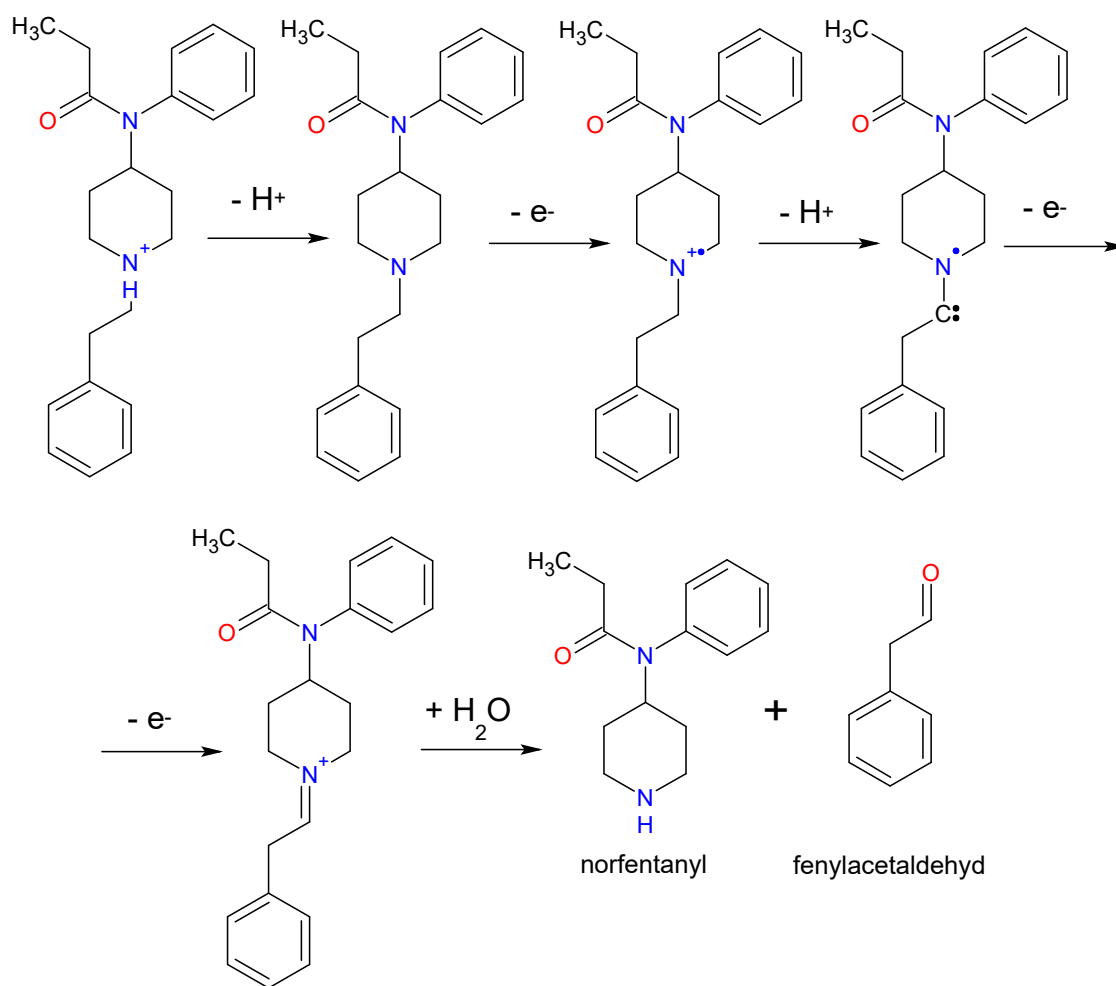
První metoda pro detekci fentanylu byla vyvinuta na základě techniky adsorpční rozpuštěcí voltametrie (AdSV) v roce 1994 [51]. Další metoda byla popsána pro snímání fentanylu v rozsahu koncentrací 10 $\mu\text{mol/l}$ –10 mmol/l v roce 2002 [52]. Sítotisková uhlíková elektroda (SPCE – Screen-Printed Carbon Electrode) modifikovaná iontovou kapalinou byla použita pro stanovení fentanylu metodou cyklické voltametrie [53]. Nedávno byla popsána SPCE modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami a iontovou kapalinou pro měření fentanylu [54]. Navzdory přesnosti a spolehlivosti těchto metod většina z nich trpí určitými omezeními, jimiž jsou omezený lineární rozsah, nepříznivé limity detekce či složitý proces přípravy vzorku. [55] Souhrn literatury pro elektrochemické stanovení fentanylu ukazuje *Tabulka 2.8*.

Elektroda ze skelného uhlíku (GCE – Glassy Carbon Electrode) se běžně používá jako vhodná platforma v elektrochemických aplikacích díky fantastickým vlastnostem, jako je nízký proud pozadí a široký rozsah potenciálu. Tato uživatelsky přívětivá platforma má na svém povrchu pomalý přenos elektronů. Tento problém lze vyřešit úpravou povrchu elektrody různými technikami. Mezi různé používané materiály řadíme i uhlíkové “nanocibule“ (CNOs – Carbon Nano-Onions), které jsou jedním z nejnovějších uhlíkových alotropů a jsou považovány za uhlíkovou nanostrukturu s nulovým rozměrem. Studie uvádějí, že vodivost CNOs s takovými specifickými strukturami je blízká chování kovů a jejich katalytická aktivita závisí na jejich velkém povrchu. Další výhody zahrnují vysokou odolnost proti korozi, vysoký poměr povrchu k objemu, dobrou tepelnou stabilitu a vynikající řízenou distribuci velikostí částic. [55]

Většina dosud uváděných elektrochemických fentanylových senzorů využívá voltametrii k řízení nevratné oxidační *N*-dealkylace piperidinového terciárního aminu při cca 0,8 V vs Ag/AgCl. Jak je patrné z obrázku, *Obrázek 2.9*, tuto reakci poskytují všechny analogy fentanylu. Ve stejné potenciálové oblasti poskytují proudovou odezvu i další drogy, jako např. heroin a kokain, a proto je obtížné voltametriky tyto drogy odlišit od fentanylu a jeho derivátů. Platinové a zlaté elektrody nebyly použity k voltametrickému zkoumání fentanylů, pravděpodobně kvůli potenciálovému omezení při relativně vysokých potenciálech. Po přenosu dvou elektronů a dvou protonů v elektrochemické reakci následuje krok hydrolyzy, jehož výsledkem jsou dva produkty. *Obrázek 2.10* znázorňuje mechanismus elektrochemické oxidace fentanylu. [5]



Obrázek 2.9: Překrytí cyklických voltamogramů pro 50 $\mu\text{g/ml}$ heroinu, kokainu, fentanylu a 10 analogů fentanylu při pH 7,0 [5]



Obrázek 2.10: Mechanismus elektrochemické oxidace fentanylu [5]

Tabulka 2.8: Souhrn současné literatury pro elektrochemickou detekci fentanylu

Elektroanalytická metoda	Analyt	Elektroda	Modifikace elektrody	Ref.
Adsorpční rozpouštěcí voltametrie	DBPPE ⁹	Hg	—	[56]
Adsorpční rozpouštěcí voltametrie	Fentanyl	Hg	—	[57]
Potenciometrie	Fentanyl	PVC membrána	FT(4-CP)B-IPC ¹⁰	[58]
Potenciometrie	Fentanyl	PVC membrána	FT[(bTFM)P]B-IPC ¹¹	[59]
Potenciometrie	Fentanyl	PVC membrána	Fentanyl-fosfo-wolframový ion-párový komplex	[60]
Elektricky generovaná chemiluminiscence	Fentanyl	Skelný uhlík	Skelné uhlíkové mikrokuličky a iontová kapalina	[61]
Diferenčně pulzní voltametrie	Sufentanyl	Uhlíková SPE	Vícestranné uhlíkové nanotrubičky (MWCNTs)	[62]
Square wave voltametrie	Fentanyl	Uhlíková SPE	MWCNTs a iontová kapalina	[63]
Cyklická square wave voltametrie	Fentanyl, norfentanyl	Uhlíková SPE	Iontová kapalina	[64]
Diferenčně pulzní voltametrie	Fentanyl	Uhlíková	Jednostenné uhlíkové nanotrubičky (SWCNTs)	[65]
Cyklická square wave voltametrie	Fentanyl	Dutá mikrožehla naplněná uhlíkovou pastou	—	[66]
Diferenčně pulzní voltametrie	Fentanyl	Uhlíková SPE	Zinková kovovo-organická struktura	[67]
Diferenčně pulzní voltametrie	Fentanyl	Skelný uhlík	Uhlíkové “nanocibule“	[55]

⁹DBPPE – N,N'-difenyl-N,N'-bis(1-fenylmethyl-4-piperidiny)-ethandiamid

¹⁰FT(4-CP)B-IPC – Fentanyl-tetrakis(4-chlorfenyl)boritanový ion-párový komplex

¹¹FT[(bTFM)P]B-IPC – Fentanyl-tetrakis[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]boritanový ion-párový komplex

2.3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná pro dělení méně těkavých organických látek.

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Během separace dochází ke mnoha interakcím - interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní a stacionární fáze a sorpce analytů na stacionární fázi. HPLC chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího zařízení, kolony a detektoru.

UV detektory se používají v HPLC pro detekci analytů, které obsahují ve své struktuře chromofor. Měřením absorpce záření o různých vlnových délkách lze analyt identifikovat. Mezi výhody tohoto detektoru patří jeho spolehlivost, snadné použití, vysoká linearita a přesnost; omezením je, že látka musí mít chromoforickou aktivitu. [68]

HPLC–UV metoda pro stanovení fentanylu, alfentanylu a sufentanylu se dá využít při jejich stanovení ve vzorcích stěru při 205, 208, resp. při 230 nm [69] nebo ve vzorcích lidské krve a plazmy při 200 nm [70], v plazmě při 195 nm, remifentanylu v lidské i psí krvi při 210 nm [71], v krysí plazmě k objasnění farmakokinetického chování při 201 nm [72] či ke stanovení reziduí fentanylu po aplikování transdermálních náplastí při 254 nm [73]. Rovněž lze HPLC–UV využít k nucené degradaci fentanylu a následné identifikaci a analýze nečistot a degradačních produktů při 215 nm [74].

Elektrochemická detekce (ECD) pro HPLC je selektivní a extrémně citlivá detekční technika, která se používá v řadě analýz (neurotransmitery, katecholaminy, sacharidy či analýza drog). Pro detekci se používají průtokové cely a elektrody, které lze miniaturizovat. Coulometrická detekce je technika, při které je téměř 100 % analytu v proudu MF oxidováno nebo redukováno na povrchu elektrody při konstantním potenciálu.

Stanovení fentanylu pomocí HPLC-UV-ECD uvádí literatura [75]. Stanovení heroinu, fentanylu a jeho analogů pomocí HPLC s UV detekcí při 205 nm a amperometrickou detekcí s potenciálem $E = +1,0$ V vs. Ag/AgCl a proudovým rozsahem 100 nA–1 mA je popsáno v literatuře [76].

2.3.6 Potenciometrické stanovení fentanylů

Potenciometrické metody s iontově selektivními membránovými elektrodami (ISME) mohou poskytnout cenné a přímočaré prostředky pro testování fentanylu ve farmaceutických přípravcích díky možnosti stanovení přímo a bez jakékoliv další separace. Nízká cena, snadné použití, údržba, jednoduchost a rychlost testovacího postupu a spolehlivost získaných informací je činí velmi lákavými pro testování farmaceutických produktů. [77]

2.3.7 Testování a analýza biologického materiálu

Tato kapitola je zde zařazena, protože v experimentální části bude po vyvinutí metody testován i biologický materiál. Právě v praxi se využívá biologický materiál pro kvalitativní i kvantitativní analýzu nejčastěji. Níže zmíněné se využívají nejvíce.

2.3.7.1 Krev/sérum/plazma

U žijících jedinců se odebírá plná krev z předloketní žíly. Koncentrace drogy v krvi odráží množství drogy v době odběru. Vzorky plné krve by měly být odebírány do zkumavky, která obsahuje konzervační i antikoagulační činidlo. Poměr koncentrace fentanylu v krvi a plazmě se uvádí 0,8–1,0 a pro norfentanyl 1,0–1,3; jako další byl popsán poměr pro sufentanyl 0,6–0,7. V ideálním případě je pro účely forenzní toxikologie nejlepší odebírat a analyzovat femorální¹² nebo periferní krev¹³. [36, 78]

2.3.7.2 Moč

Moč jako biologický vzorek lze použít k prokázání expozice drogami. Po absorpci jsou drogy nebo metabolity drog obvykle přítomny v moči ve vyšších koncentracích než v krvi. V moči jsou cílovými analyty často metabolity původních drog, které jsou často neaktivní. Vyšší koncentrace drog v moči mají tu výhodu, že prodlužují dobu, po kterou lze zjistit předchozí užití drog.

2.3.7.3 Vzorky od zemřelých jedinců

Tkáně

Vzorky tkání, mozek, játra, ledviny nebo svalová tkáň v blízkosti místa vpichu, lze testovat při postmortálních vyšetřeních. Játra jsou optimálním vzorkem v nepřítomnosti krve nebo moči. Koncentrace drog stanovené při tkáňové analýze je velmi obtížné interpretovat.

Sklivec

Sklivec, průhledné, čiré, bezbarvé, rosolovité těleso nacházející se za čočkou a před sítnicí oka, je další alternativní vzorek doporučený pro posmrtnou analýzu. Sklivec je anatomicky izolované místo, takže je méně náchylné k hnilobným změnám. Pro analýzu lze často odebrat pouhé 2–3 ml. Koncentrace drog ve sklivci jsou často podobné jako v krvi; výklad by však měl být prováděn opatrně.

¹²krev ze stehenní tepny

¹³krev, která obíhá v cévách

2.3.7.4 Stabilita a skladování

Bylo prokázáno, že fentanyl je stabilní v plazmě při pokojové teplotě po dobu 6 hodin a po dobu 6 měsíců při -20 °C. V krvi s přídavkem fluoridu sodného byl fentanyl stabilní po dobu 1 týdne při pokojové teplotě. V moči byl fentanyl a norfentanyl stabilní po dobu 24 hodin při pokojové teplotě nebo při 4 °C. Carfentanyl a furanylfentanyl byly stabilní v lidské krvi konzervované fluoridem sodným po dobu minimálně 30 dnů při pokojové teplotě, chlazené nebo mražené. Testy stability udávají ztráty fentanylu a jeho analogů menší než 20 % za specifikované období. Osvědčené postupy pro detekci fentanylu v toxikologických vzorcích vyžadují, aby byly skladovány v chladničce nebo zmrazené až do doby analýzy. [36]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

3.1.1 Chemikálie

- Octan amonný p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
- Mravenčan amonný 99% p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Methanol pro HPLC (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Acetonitril pro HPLC (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- Kyselina boritá p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina octová 99% p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Uhličitan sodný p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
- Chloristan sodný monohydrát (Fluka, Neu-Ulm, Německo)
- Chlorid draselný p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)
- Amoniak p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Fentanyl (Lipomed, Švýcarsko)
- Norfentanyl (Lipomed, Švýcarsko)
- Furanylfentanyl (Lipomed, Švýcarsko)
- Carfentanyl (Chiron, Norsko)
- Sufentanyl (Lipomed, Švýcarsko)
- Thiofentanyl (Chiron, Norsko)
- Dimethylanilin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Deionizovaná voda (Millipore, 18,2 MΩ)

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Během experimentů bylo používáno běžné laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce) a pomůcky (špachtle, lžička, váženky). Pevné chemikálie byly odvažovány na analytických vahách ABS 220-4 (KERN, Balingen, Německo) a objemy kapalin byly odebírány pomocí automatických pipet. Pro odplynění mobilní fáze byl použit ultrazvuk POLSONIC Sonic 6 (Varšava, Polsko). Pro úpravu pH roztoků byl použit pH metr inoLab 720 s elektrodou SenTix 41 (WTW, Weilheim, Německo). Chromatografické analýzy byly prováděny pomocí kapalinového chromatografu Ultimate 3000 (Thermo Scientific Dionex, Massachusetts, USA) s UV (DioNex 3000 variable Wavelength detector) a elektrochemickou detekcí (ECD-3000RS vybaveným coulometrickou celou 6011 RS s pracovní elektrodou z mikroporézního grafitu a referentní hydrogen-palladiovou elektrodou).

Chromatografická separace fentanylu a jeho analogů byla testována na čtyřech typech kolon:

- Kolona C18 (Hypersil GOLD; 4,6 mm × 100 mm; 5 μm)
- Kolona C18 (Phenomenex Gemini-NX 5u C18 110A; 2,0 mm × 150 mm, 5 μm)
- Kolona C8 (ZORBAX Eclipse XDB - C8; 4,6 mm × 150 mm, 5 μm)
- Kolona CN^- (ZORBAX 300SB-CN; 4,6 mm × 150 mm, 5 μm)

3.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Zásobní roztoky octanu amonného a mravenčanu amonného o koncentraci 0,05 mol/l byly připraveny navážením pevné látky a rozpuštěním v definovaném objemu deionizované vody.

Mobilní fáze byly dle daného poměru připravovány pomocí odměrného válce, později pomocí pipet (kvůli malým rozdílům v poměrech). Acidita vodné složky MF byla upravována amoniakem na pH = 9, případně pH = 10. Po smíchání vodné a organické složky MF byl tento roztok přefiltrován přes filtr, aby došlo k odstranění případných nerozpuštěných částic. Takto přečištěná MF byla sonifikována po dobu minimálně 5 minut, aby došlo k odstranění přebytečných bublinek vzduchu, které by mohly zavzdušnit systém HPLC.

Zásobní roztoky fentanylu, furanylfentanylu, sufentanylu, carfentanylu, thiofentanylu a norfentanylu byly připraveny v koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v acetonitrilu nebo methanolu a uchovávány v mrazáku při -18 °C; následně byly ředěny dle potřeby.

Byla vytvořena směs všech šesti fentanylů o koncentraci každé složky $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l buď v ACN nebo v MeOH. Takto připravené směsi byly poté ředěny příslušnou mobilní fází, ve které probíhalo měření, na koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Byly připraveny i roztoky dvou interních standardů, dimethylanilinu a *N*-cyklopentylanilinu, o koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

3.3 EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

3.3.1 Analýza fentanylů

Chromatografická separace byla prováděna v systému s izokratickou elucí. Průtok mobilní fáze systémem byl zprvu nastaven na 0,5 ml/min, později byl ale navyšován na 1,2 ml/min. Vlnová délka UV detektoru byla zpočátku na 205 nm, ale nebyla dostatečně selektivní, a proto po zbytek experimentu byla nastavena na 255 nm. Potenciály na elektrochemickém detektoru byly nastaveny na 0,9 a 1,1 V, po proměření hydrodynamických voltamogramů byly měněny v závislosti na použité mobilní fázi.

3.3.2 Příprava reálného vzorku – moči

K 10 ml vzorku moči byly přidány analyty a vnitřní standardy o výsledné koncentraci 0,2 $\mu\text{mol/l}$. Moč byla upravena na $\text{pH} = 11$ pomocí 50% NaOH a poté rozdělena na 2 díly po 5 ml do plastových centrifugačních zkumavek. Poté byly vzorky extrahovány 2 ml chloroformu na třepačce (1 350 rpm) po dobu 10 minut, následně byly odstředěny (4 000 rpm., 10 min), 2 ml chloroformové spodní fáze byly nadvakrát odebrány do 1,2ml skleněných vilek a rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha. Odparek byl rekonstituován v 100 μl MF: (0,05M HCOONH_4 + 0,01M KCl, $\text{pH} = 9$) : ACN (57 : 43); průtok 1,2 ml/min. Analýza každého duplikátu byla opakována dvakrát. Objem nastříkovaného vzorku činil 20 μl .

VÝSLEDKY A DISKUZE

Studium dostupné literatury ukázalo, že prací popisujících izokratickou HPLC separaci syntetických opioidů je poměrně málo. Prvotní podmínky pro separaci fentanylu, jeho čtyř analogů (thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu) a metabolitu norfentanylu byly inspirovány prací autorů Zuway a kol. [79]. Tito autoři použili ve svém článku MF se složením methanol : 0,01 mol/l octan amonný (obohacen o 0,1 mol/l chlorid draselný) v poměru 30 : 70 při použití kolony C18 ACE 3 (150 mm × 4,6 mm; 3 μm). Analýza probíhala při průtoku 0,8 ml/min a vlnové délce UV detektoru 264 nm. Jejich cílem bylo detekovat katinony, nikoli fentanyl a jeho analogy.

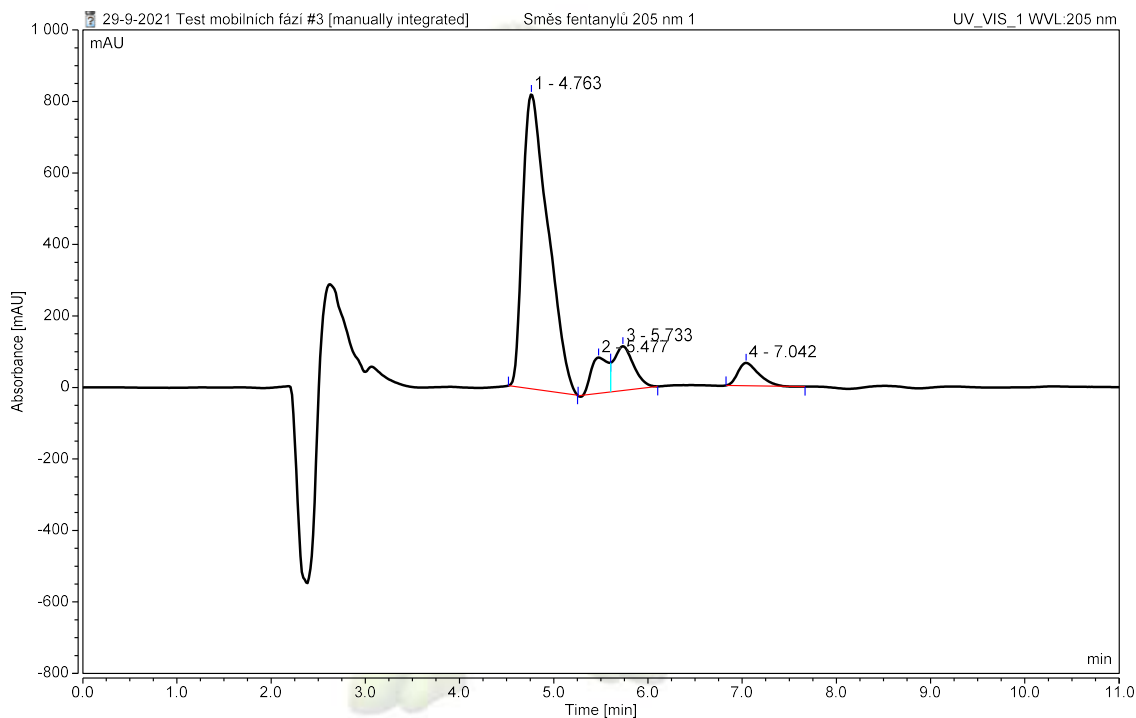
Autoři článku Elbardisy a kol. [76] použili velmi podobnou mobilní fázi, jejíž složení bylo 0,02 mol/l mravenčan amonný : acetonitril v poměru 70 : 30 s přídavkem 0,1 mol/l KCl do vodné složky elektrolytu při použití kolony Eclipse XDB-C8 (150 mm × 4,6 mm; 5 μm). Analýza probíhala při průtoku mobilní fáze 1,5 ml/min a vlnovou délku UV detektoru nastavili na 205 nm.

4.1 Hledání vhodných separačních podmínek

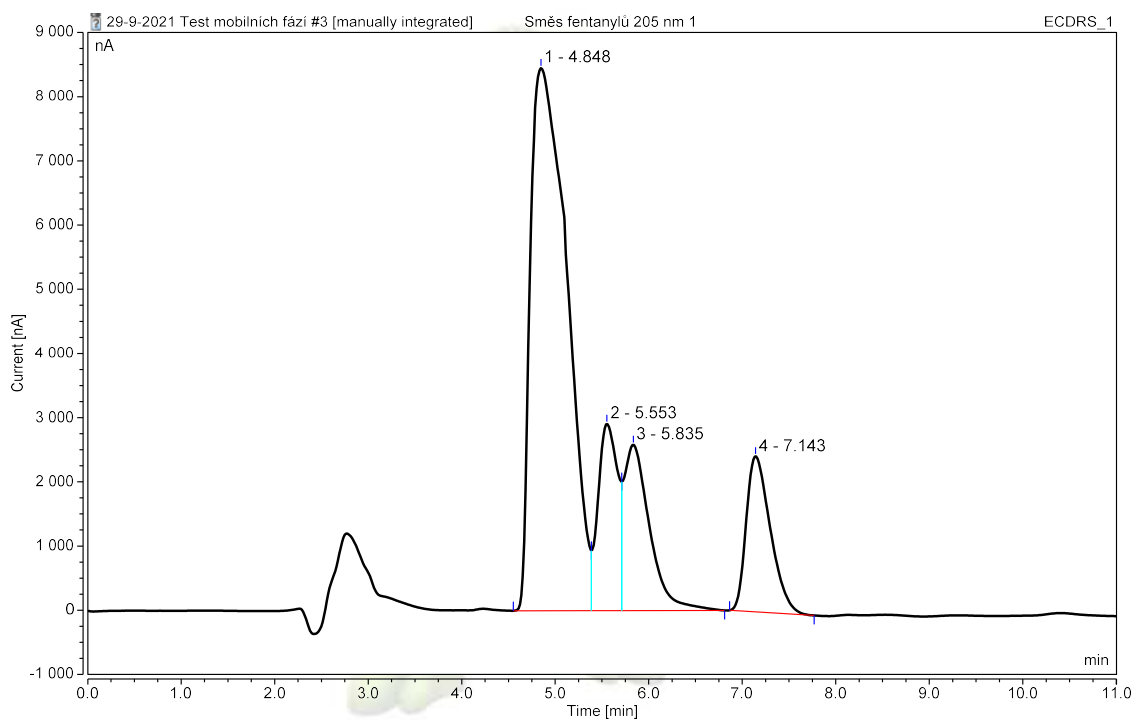
4.1.1 Kolona s oktadecylsilikagelovou SF, délka 10 a 15 cm

Pro první experimenty byla vybrána kolona C18, jako nejčastěji používaná kolona v kapalinové chromatografii. I když se jedná o kolonu s reverzní fází, dokáže separovat i bazické látky, jako je to v tomto případě.

První použitá MF se skládala z vodného roztoku octanu amonného (pH = 7) a acetonitrilu v objemovém poměru 40 : 60. Za těchto podmínek se separovaly čtyři z pěti analytů, přičemž dva z nich se separovaly pouze částečně, *Obrázek 4.1a* a *4.1b*. Norfentanyl, který je nejpolárnější z analyzovaných fentanylů, se na koloně nezadržoval vůbec. UV detekce probíhala při vlnové délce 205 nm, což je poměrně neselektivní. Pro další experimenty proto byla zvýšena na 255 nm. Postupné zvyšování obsahu vodné složky mobilní fáze ze 40 % až na 55 % (v/v) vedlo k prodloužení retence analytů (s výjimkou norfentanylu, který se ve všech testovaných MF na koloně nezadržoval), avšak separace byla horší, *Příloha A*.



(a) UV detekce, $\lambda = 205 \text{ nm}$



(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek 4.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C18, mobilní fáze: $0,05\text{M CH}_3\text{COONH}_4$, $\text{pH} = 7$: ACN (40 : 60), průtok: $0,5 \text{ ml/min}$.

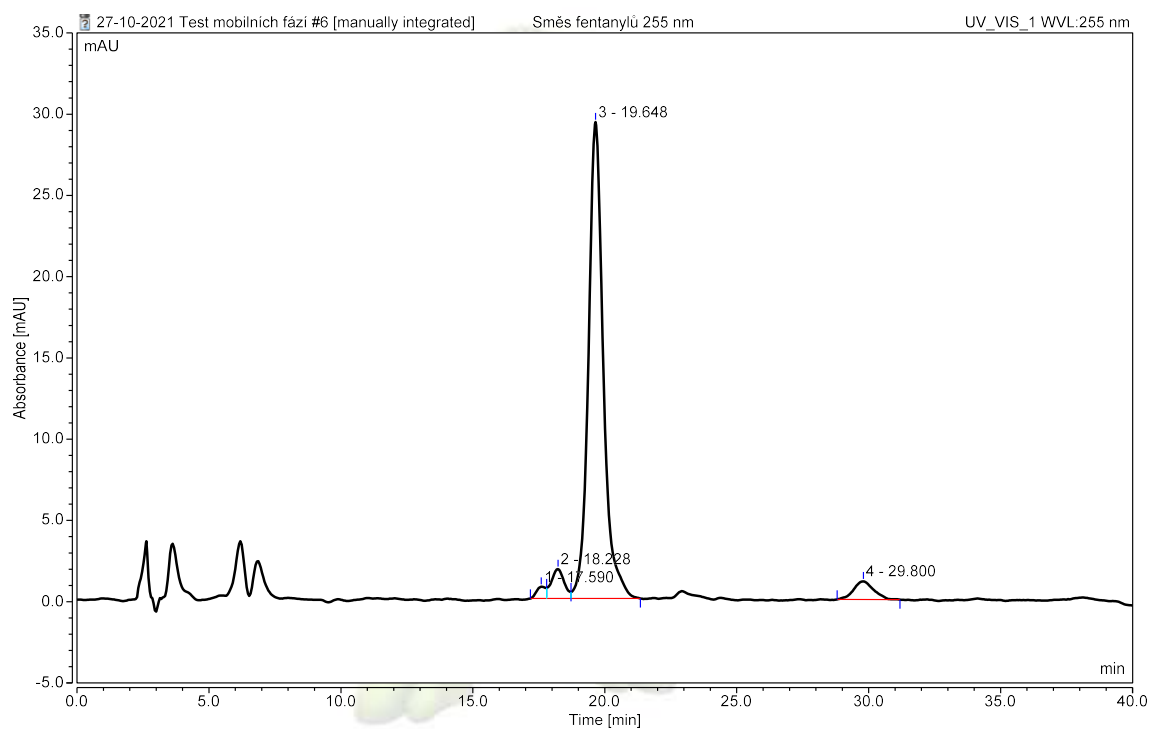
Autoři Zuway a kol. použili jako vodnou fázi octan amonný s přidavkem chloridu draselného a autoři Elbardisy a kol. použili mravenčan amonný obohacený rovněž o chlorid draselný. Aby bylo zjištěno, zda přidavek chloristanových, příp. chloridových iontů a úprava pH má vliv na účinek separace, byly připraveny následující modifikace, *Tabulka 4.1*.

Tabulka 4.1: Různé modifikace MF s použitím octanu amonného (s přidavkem chloristanu sodného) s acetonitrilem a mravenčanu amonného (s přidavkem chloridu draselného) s acetonitrilem v poměru složek 52 : 48

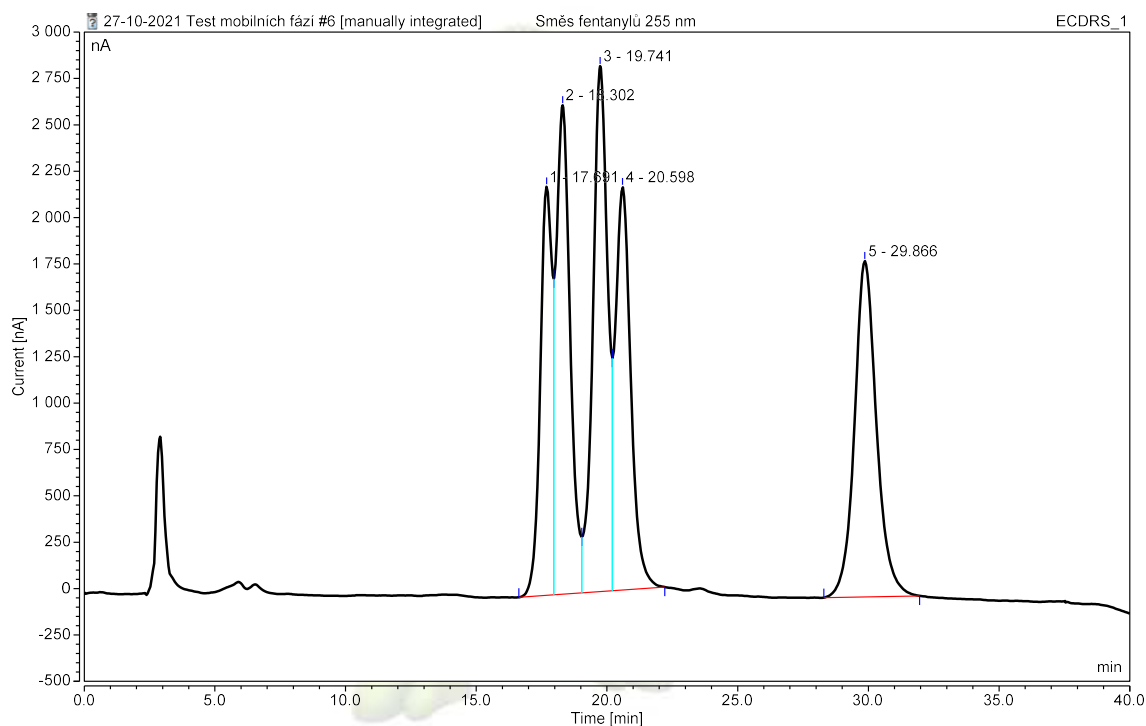
Modifikace MF	Příloha
0,05M CH ₃ COONH ₄ + 0,05M ClO ₄ ⁻ , pH = 9 : ACN	B
0,05M CH ₃ COONH ₄ + 0,05M ClO ₄ ⁻ : ACN (celková směs upravena na pH = 9)	C
0,05M CH ₃ COONH ₄ , pH = 9 : ACN	D
0,05M CH ₃ COONH ₄ : ACN (celková směs upravena na pH = 9)	E
0,05M HCOONH ₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN	F
0,05M HCOONH ₄ + 0,05M KCl : ACN (celková směs upravena na pH = 9)	G
0,05M HCOONH ₄ , pH = 9 : ACN	∅
0,05M HCOONH ₄ : ACN (celková směs upravena na pH = 9)	H

Z měření a následného porovnání vychází, že nejlepší separaci poskytují mobilní fáze s přidavkem chloristanových či chloridových iontů a úpravou pH vodné fáze. Ve srovnání mravenčan vs. octan je o malinko lepší separace u mravenčanu, avšak rozdíl není nikterak markantní.

Protože bylo zjištěno, že chloridy mají pozitivní vliv na účinnost separace, byly přidávány i nadále do vodné složky mobilní fáze. MF se složením 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN byla použita v jiných poměrech – 54 : 46, *Příloha I*, a 56 : 44, *Obrázek 4.2a* a *4.2b*. Zvyšování obsahu vodné fáze vedlo k mírnému zlepšení separace. Je zřetelných 5 píků, které nejsou odděleny na základní linii a vykazují velmi malé rozlišení. Pro zjištění pořadí, ve kterém se fentanyl a jeho analogy eluují byly jednotlivé standardy analyzovány samostatně v mobilní fázi 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN v poměru 56 : 44. První se eluuje fentanyl, následován thiofentanylem, furanylfentanylem, carfentanylem a sufentanylem.



(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek 4.2: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu (1), thiofentanylu (2), furanyl-fentanylu (3), carfentanylu (4) a sufentanylu (5) (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M HCOONH_4 + 0,05M KCl , pH = 9 : ACN (56 : 44), průtok: 0,5 ml/min.

Byla vyzkoušena i 15cm kolona. Prodloužení délky kolony vedlo ke zhoršení separace dvojic fentanyl – thiofentanyl a furanylfentanyl – carfentanyl, a také ke zvýšení retenčních časů analytů až o 7 minut u posledního eluovaného sufentanylu, a proto byla tato kolona vyloučena z dalších experimentů, *Příloha J*.

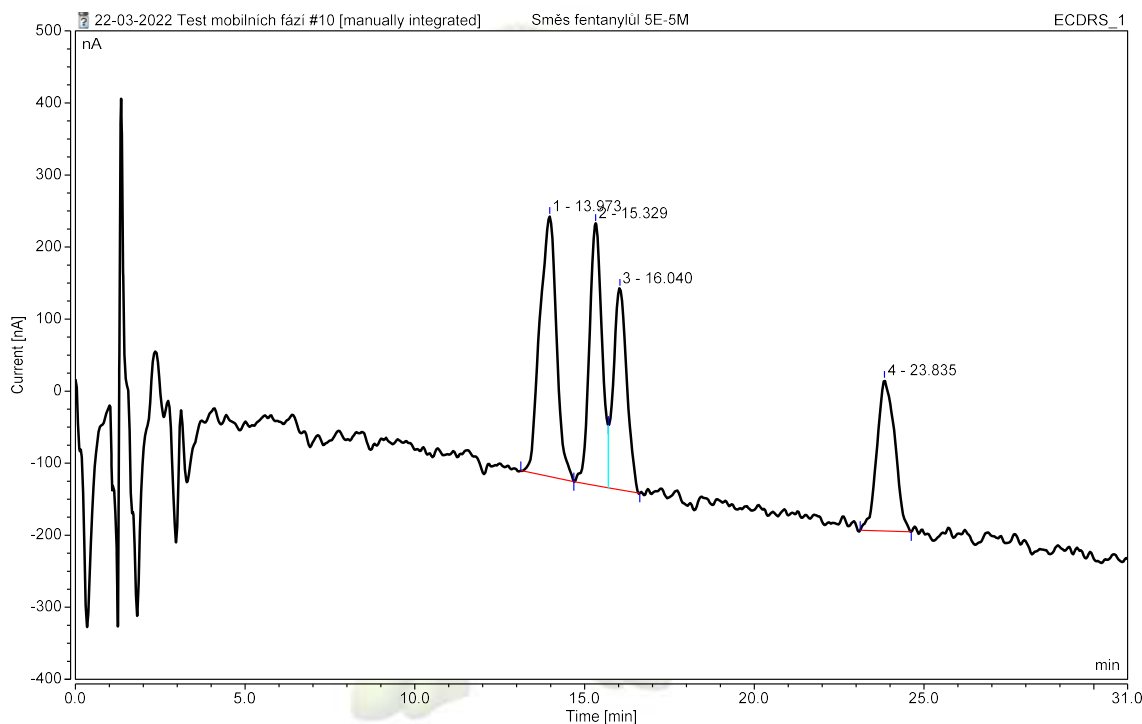
4.1.2 Kolona s oktylsilikagelovou SF

Kolona C18 neposkytovala separaci, kdy by byl zřetelně a na základní linii oddělen fentanyl a jeho analogy, proto byla pro chromatografickou separaci použita kolona C8, která má kratší uhlovodíkový řetězec a mohlo by docházet k rychlejšímu ustavení rovnováhy a zlepšení separace.

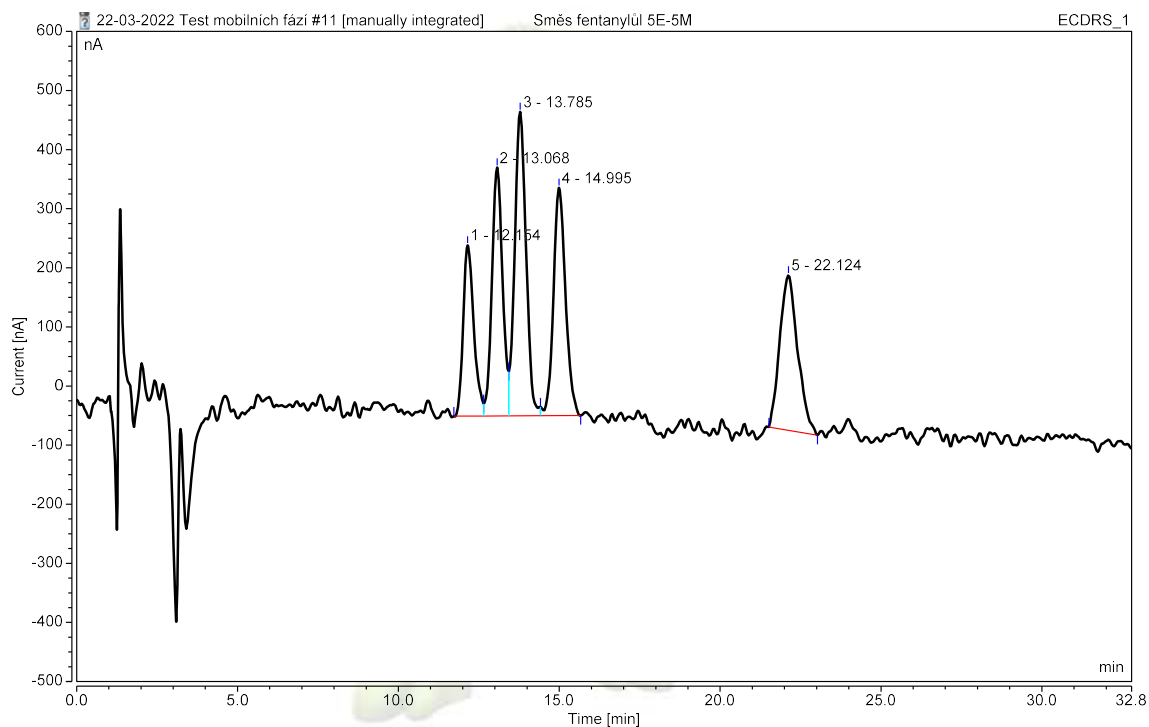
Složení mobilní fáze zůstalo stejné – 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN. Bylo započato s poměrem 52 : 48, kdy byl navyšován obsah vodné složky po 2 % až na 58 : 42. Zvyšování obsahu vodné fáze vedlo k lepší separaci, vyjma posledního poměru. Při prvních třech postupných poměrech koeluovaly 2. a 3. pík, *Příloha K, L a M*, u posledního poměru koeluovaly první dva píky, *Příloha N*. Poměr 56 : 44 byl vyhodnocen jako nejpříjemnější, a proto v něm byla proměřena sada standardů (jako u 10cm kolony C18).

- Pořadí fentanylu a jeho analogů bylo totožné jako u 10cm kolony C18, tedy fentanyl, následován thiofentanylem, furanylfentanylem, carfentanylem a sufentanylem; norfentanyl se eluuje v mrtvém čase.
- Rovněž byl proměřen i hydrodynamický voltamogram, viz kapitola 4.2.

Kromě výše uvedených poměrů vodné a organické složky MF byl ještě testován poměr 57 : 43 s různou koncentrací KCl – 0,05 mol/l a 0,10 mol/l. Jak je patrné z chromatogramů s ECD detekcí, *Obrázek 4.3a a 4.3b*, při vyšší koncentraci KCl bylo dosaženo lepší separace.



(a) Elektrochemická detekce, $E = +1,0$ V; $c(\text{KCl}) = 0,05$ mol/l



(b) Elektrochemická detekce, $E = +1,0$ V; $c(\text{KCl}) = 0,10$ mol/l

Obrázek 4.3: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu (1), thiofentanylu (2), furanyl-fentanylu (3), carfentanylu (4) a sufentanylu (5) (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M $\text{HCOONH}_4 + 0,05\text{M}$ KCl (a), resp. 0,10M KCl (b), pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.

Mobilní fáze 0,05M HCOONH₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN s poměrem 57 : 43 byla vybrána jako nejvhodnější. Byl v ní proměřován hydrodynamický voltamogram (*Kapitola 4.2*), kalibrační sada (*Kapitola 4.3*) a posléze i reálné vzorky (*Kapitola 4.4*).

Poslední vyzkoušenou mobilní fází u této kolony byla kyselá MF se složením MeOH : H₂O : 0,05M CH₃COOH v poměru 10 : 89 : 1. Chromatogram byl zcela bez píků, látky pravděpodobně eluují v mrtvém čase, *Příloha O*.

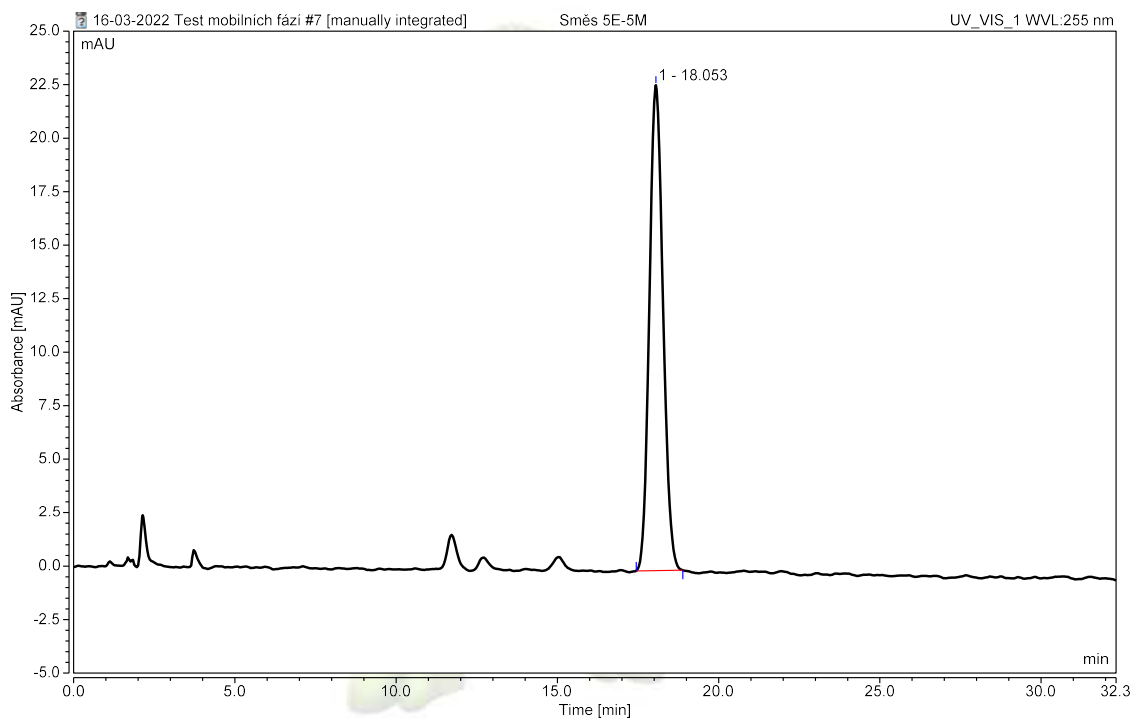
4.1.3 CN⁻ kolona

Poslední testovanou kolonou byla kyanokolona, která je vhodná pro separaci bazických látek, mezi než se fentanyly řadí.

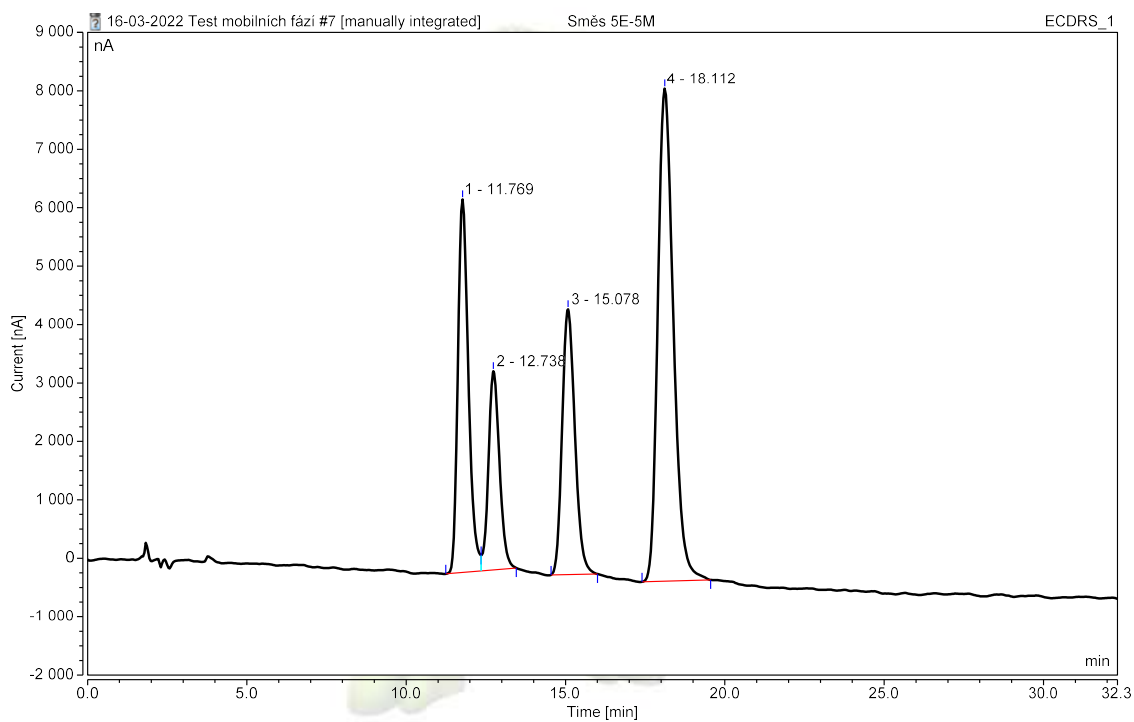
První testovaná MF měla složení MeOH : H₂O : 0,05M CH₃COOH v poměru 10 : 89 : 1. Směs šesti fentanylů se v tomto systému neseperoala, všechny analyty byly eluovány v mrtvém čase, *Příloha P*.

Mobilní fáze se složením 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN vykazovala požadovanou separaci na koloně C8, a proto byla i u této kolony vyzkoušena. Bylo započato s poměrem 58 : 42, při němž fentanyly vykazovaly krátkou zádrž na koloně a silně koeluovaly, *Příloha Q*. S rostoucím obsahem vodné složky v MF docházelo k prodloužení retenčních časů a zlepšení separace fentanylů. V přílohách jsou ukázány chromatogramy pro mobilní fáze s poměry vodné a acetonitrilové složky 64 : 36, *Příloha R*, a 70 : 30, *Příloha S*. Nejlepší separace bylo dosaženo při poměru vodné a acetonitrilové složky 74 : 26, *Obrázek 4.4a* a *4.4b*. Porovnáním s chromatogramy získanými analýzou jednotlivých fentanylů bylo zjištěno, že furanylfentanyl a sufentanyl jsou eluovány společně okolo 18. minuty.

Acetonitril nevykazoval potřebnou separaci, a proto byl vyměněn za methanol. Změna organické složky nevedla ke zlepšení separace. Byly vyzkoušeny dva poměry vodné a methanolové složky – 50 : 50 a 60 : 40. Ani v jednom z obou poměrů nebylo dosaženo vyhovující separace analytů.



(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek 4.4: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu (1), thiofentanylu (2), carfentanylu (3) a furanylfentanylu a sufentanylu (4) (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: CN^- , mobilní fáze: $0,05\text{M HCOONH}_4 + 0,05\text{M KCl}$, $\text{pH} = 9$: ACN (57 : 43), průtok: $1,0 \text{ ml/min}$.

4.2 Hydrodynamické voltamogramy

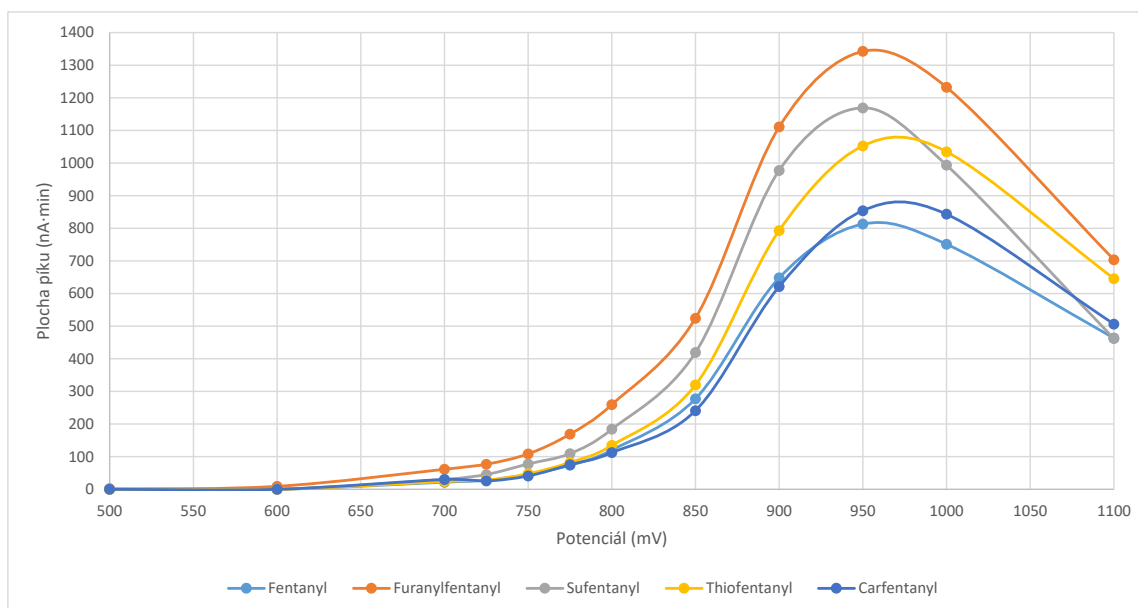
Pro zjištění vhodného potenciálu pracovní elektrody k elektrochemické detekci fentanylů byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy za účelem nalezení nejlepších separačních podmínek. Měření probíhala s kolonou se stacionární fází C8 a byly použity dvě mobilní fáze,

- 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN s poměrem 56 : 44 a
- 0,05M HCOONH₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN s poměrem 57 : 43.

Potenciál první elektrody v duální elektrochemické cele se postupně zvyšoval až na maximální hodnotu doporučenou výrobcem, tedy 1,1 V. Potenciál druhé elektrody byl nastaven na konstantní hodnotu 1,05 V.

4.2.1 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN – 56 : 44

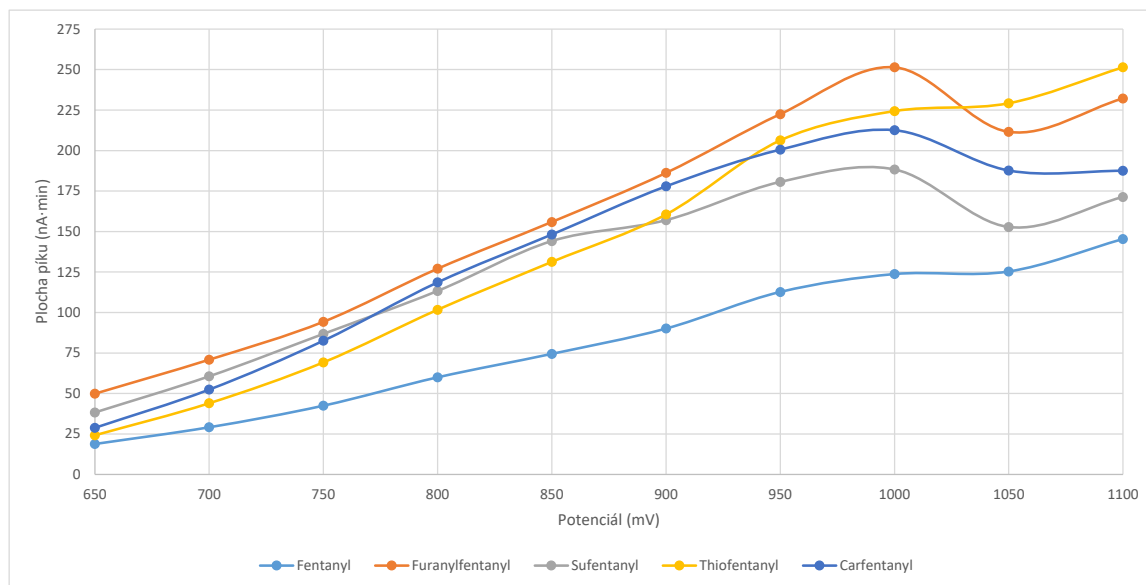
Pro tuto mobilní fázi byl proměřován hydrodynamický voltamogram v rozsahu potenciálů 0,5–1,1 V. Jak ukazuje *Obrázek 4.5*, největší plocha píku pro všech pět fentanylů byla získána při potenciálu první pracovní elektrody 0,95 V.



Obrázek 4.5: Hydrodynamický voltamogram. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (56 : 44), průtok: 1,0 ml/min, detektor ECD – ECD1.

4.2.2 0,05M HCOONH₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN – 57 : 43

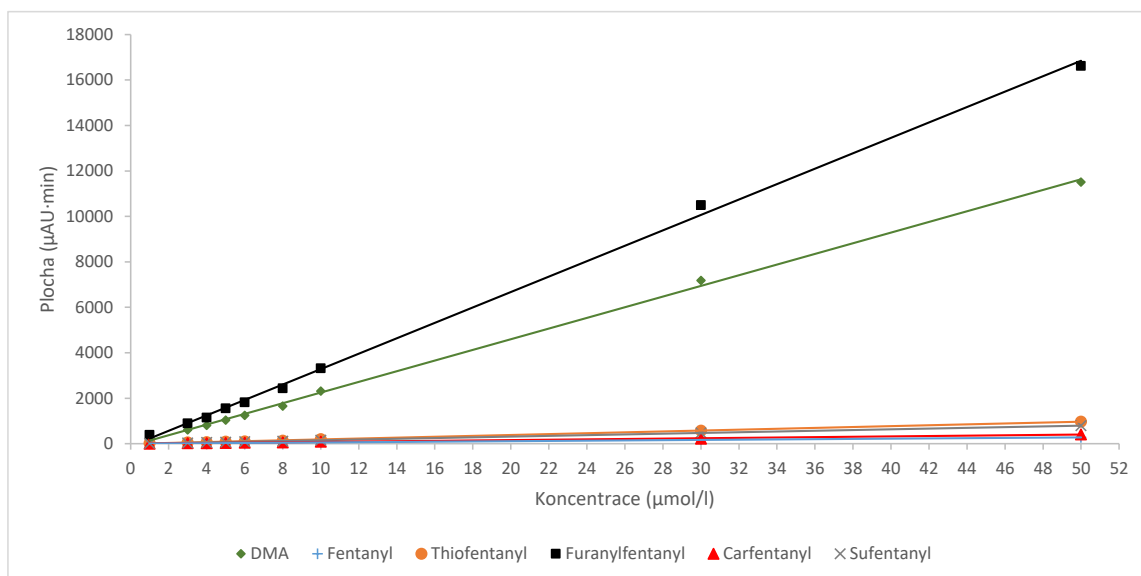
U této mobilní fáze byl hydrodynamický voltamogram proměřován v rozsahu potenciálů 0,65–1,1 V. Závislost plochy píku na potenciálu, *Obrázek 4.6*, vykazuje u thiofentanylu a carfentanylu pozvolný nárůst až do hodnoty 1,1 V. U dalších tří derivátů – fentanylu, furanylfentanylu a sufentanylu je zřetelné maximum při 1,0 V. Protože při potenciálech nad 1,0 V výrazně roste hladina šumu a také dochází k rychlejšímu stárnutí elektrodo-
vého materiálu, byl pro další experimenty nastaven na první pracovní elektrodu detekční potenciál 1,0 V.



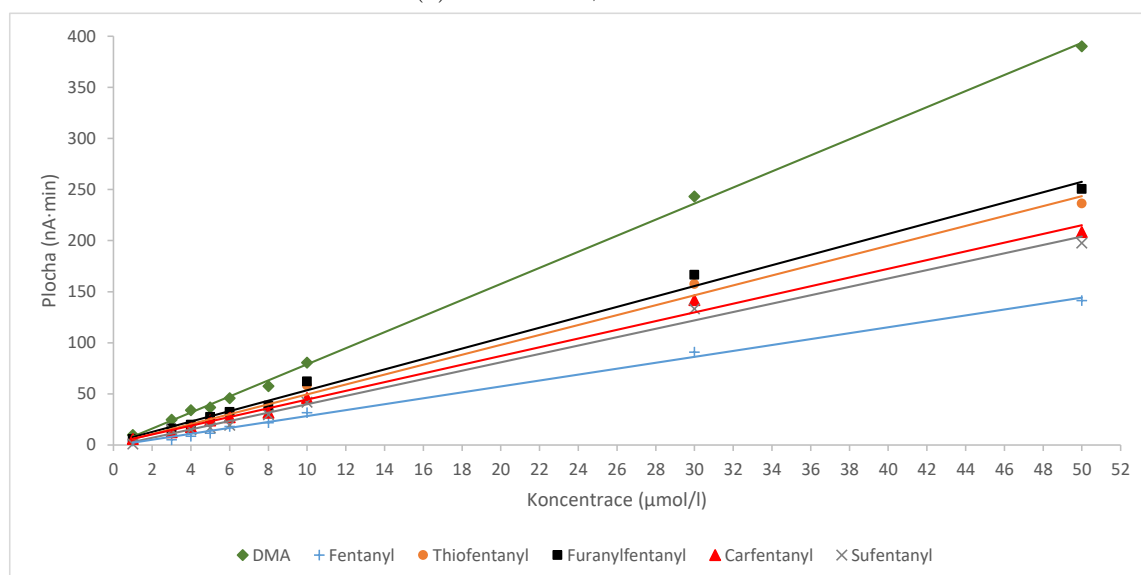
Obrázek 4.6: Hydrodynamický voltamogram. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min, detektor ECD – ECD1.

4.3 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti fentanylu, jeho analogů a dimethylanilinu (DMA), který byl zamýšlen pro použití jako vnitřní standard ke kvantifikaci fentanylů ve vzorku moči, byly sestrojeny v koncentračním rozsahu 1–50 $\mu\text{mol/l}$ s využitím UV a ECD detektoru. Kalibrační závislosti pro všechny látky z UV detekce, kde kvůli velkým rozdílům v ploše pík zanikají rozdíly mezi fentanylem, thiofentanylem, carfentanylem a sufentanylem v grafu, a z elektrochemické detekce zobrazují *Obrázky 4.7a* a *4.7b*. Grafy závislosti včetně chybových úseček pro jednotlivé látky – vnitřní standard dimethylanilin, fentanyl a jeho analogy získané pomocí UV a ECD detekce (ECD1) jsou k dispozici v přílohách, *Příloha T.1, T.2, T.3, T.4, T.5* a *T.6* a *Příloha U.1, U.2, U.3, U.4, U.5* a *U.6*. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány pomocí programu QC Expert 3.2. (Trilobyte, Pardubice, Česká republika) přímou metodou analytu.



(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



(b) Elektrochemická detekce, $E = +1,0 \text{ V}$

Obrázek 4.7: Graf kalibrační závislosti DMA, norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.

Níže uvedené tabulky shrnují základní regresní parametry týkající se jednotlivých látek získané UV detekcí, *Tabulka 4.2*, a ECD detekcí, *Tabulka 4.3*.

Tabulka 4.2: Regresní parametry kalibrační přímky ($y = ax + b$) z UV detekce pro fentanyl, jeho analogy a interní standard, korelační koeficient, hodnoty LOD a LOQ pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ pro rozsah koncentrací 1–50 $\mu\text{mol/l}$

Látka	Směrnice $\left(\frac{\mu\text{AU}\cdot\text{min}\cdot\text{l}}{\mu\text{mol}}\right)$	Úsek $(\mu\text{AU}\cdot\text{min})$	Korelační koeficient	LOD $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}\right)$	LOQ $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}\right)$
DMA	$234,60 \pm 2,66$	$-96,51 \pm 53,48$ (nevýznamný)	0,9996	1,4	2,1
Fentanyl	$5,54 \pm 0,11$	$-0,75 \pm 2,21$ (nevýznamný)	0,9986	2,4	3,5
Thiofentanyl	$19,46 \pm 0,17$	$-6,56 \pm 3,36$ (nevýznamný)	0,9997	1,1	1,6
Furanylfentanyl	$339,16 \pm 4,56$	$-110,99 \pm 91,80$ (nevýznamný)	0,9994	1,7	2,4
Carfentanyl	$8,11 \pm 0,21$	$-3,95 \pm 4,31$ (nevýznamný)	0,9976	3,2	4,6
Sufentanyl	$16,04 \pm 0,11$	$-9,45 \pm 2,28$ (VÝZNAMNÝ)	0,9998	0,9	1,3

Tabulka 4.3: Regresní parametry kalibrační přímky ($y = ax + b$) z ECD detekce pro fentanyl, jeho analogy a interní standard, korelační koeficient, hodnoty LOD a LOQ pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ pro rozsah koncentrací 1–50 $\mu\text{mol/l}$

Látka	Směrnice $\left(\frac{\text{nA}\cdot\text{min}\cdot\text{l}}{\mu\text{mol}}\right)$	Úsek $(\text{nA}\cdot\text{min})$	Korelační koeficient	LOD $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}\right)$	LOQ $\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}\right)$
DMA	$7,86 \pm 0,10$	$0,35 \pm 1,77$ (nevýznamný)	0,9996	1,4	2,0
Fentanyl	$2,90 \pm 0,10$	$-0,61 \pm 1,32$ (nevýznamný)	0,9982	2,7	4,0
Thiofentanyl	$4,85 \pm 0,14$	$1,05 \pm 2,84$ (nevýznamný)	0,9970	3,5	5,1
Furanylfentanyl	$5,10 \pm 0,14$	$2,59 \pm 2,79$ (nevýznamný)	0,9974	3,3	4,7
Carfentanyl	$4,27 \pm 0,12$	$1,82 \pm 2,44$ (nevýznamný)	0,9972	3,4	4,9
Sufentanyl	$4,10 \pm 0,12$	$-1,14 \pm 2,41$ (nevýznamný)	0,9970	3,5	5,1

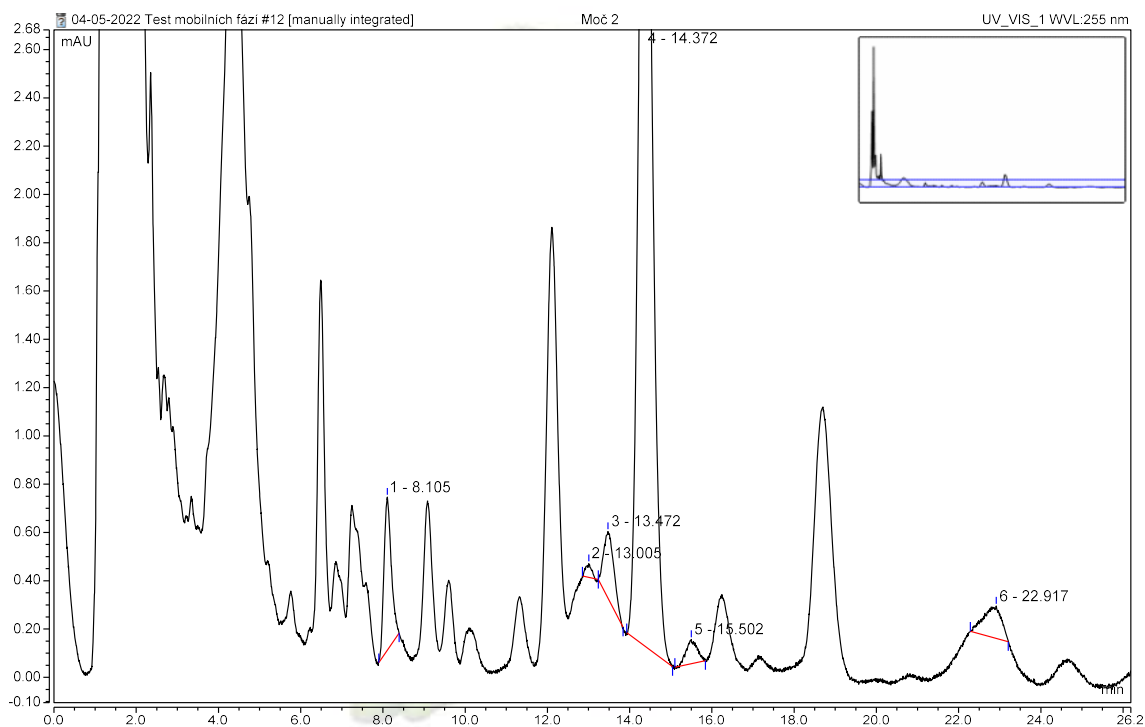
V UV detekci má směrnice kalibrační přímky furanylfentanylu o 1–2 řády vyšší hodnotu oproti ostatním fentanylům, což ukazuje vyšší citlivost stanovení furanylfentanylu. V ECD mají směrnice kalibračních závislostí všech fentanylů stejný řád, citlivost elektrochemického detektoru je tedy pro všechny fentanyly srovnatelná. DMA, fentanyl a carfentanyl vykazují srovnatelné meze detekce i meze stanovitelnosti u obou použitých detektorů. V případě thiofentanylu, furanylfentanylu a sufentanylu je výhodnější použití UV detektoru, jehož mez detekce je přibližně o 2 jednotky nižší než u ECD detektoru.

4.4 Analýza fentanylů ve vzorku moči

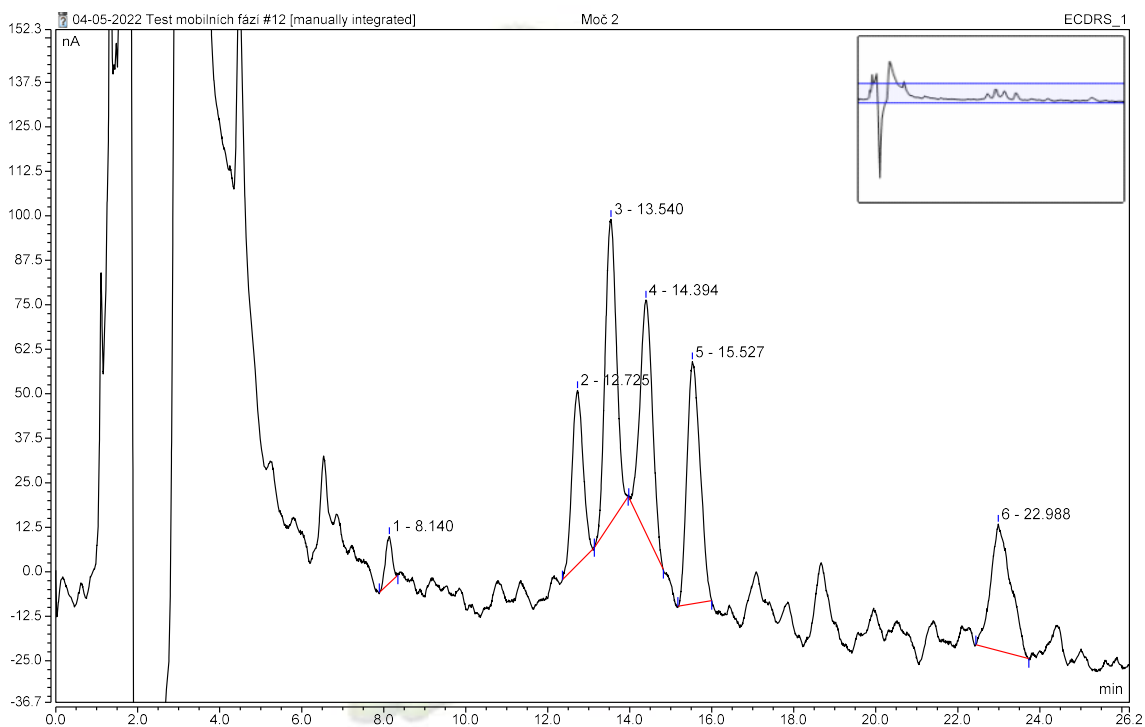
Vyvinutá analytická metoda byla testována na vzorku moči obohacené směsí šesti fentanylů. Lze předpokládat, že koncentrace fentanylů v moči budou v reálných vzorcích vyšší než v krvi, plazmě či séru. Podle literatury [80] jsou jak terapeutické (typicky 0,3–1,2 ng/ml), tak fatální (3–20 ng/ml) koncentrace fentanylu v krvi velmi nízké. Použití vyvinuté metody pro analýzu krve s takto nízkou koncentrací by vyžadovalo větší množství vzorku a použití účinného prekoncentračního kroku pro zvýšení koncentrace fentanylu v analytickém vzorku. Také z důvodu dostupnosti byla tedy zvolena moč jako matrice pro přípravu biologického vzorku na testování HPLC-UV-ECD metody.

Vzorek moči obohacený o interní standard (DMA nebo CPA) a analyty byl upraven na $\text{pH} = 11$ pro převedení bazických analytů (jejich hodnoty $\text{p}K_a$ jsou v rozmezí 7,7–9,8) na nenabitou formu, která se lépe extrahuje do chloroformu. Po odebrání chloroformové spodní fáze bylo rozpouštědlo odpařeno do sucha a odparek byl rekonstituován v mobilní fázi.

Obrázek 4.8a ukazuje chromatogram z UV detektoru, na chromatogramu z ECD detektoru je patrné 6 píků, Obrázek 4.8b, přičemž pík eluující se v retenčním čase okolo 8. minuty patří vnitřnímu standardu DMA, poté je eluován fentanyl, thiofentanyl, furanylfentanyl, carfentanyl a nakonec sufentanyl.



(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



(b) Elektrochemická detekce, $E = +1,0 \text{ V}$

Obrázek 4.8: Chromatogram vzorku moči obohacený o vnitřní standard (dimethylanilin) (1), norfentanyl, fentanyl (2), thiofentanyl (3), furanylfentanyl (4), carfentanyl (5) a sufentanyl (6) (koncentrace každé látky $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$), Kolona: C8, mobilní fáze: $0,05\text{M HCOONH}_4 + 0,10\text{M KCl}$, $\text{pH} = 9$: ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.

4.4.1 Vyhodnocení z kalibrační přímky

Kalibrační závislosti fentanylu, jeho analogů a vnitřního standardu DMA včetně směrodatných odchylek se nacházejí v příloze, jak je uvedeno v kapitole 4.3. Budou z nich vybrány rovnice kalibračních přímek, které poslouží k výpočtu, *Tabulka 4.4* a *4.5*.

Tabulka 4.4: Rovnice kalibračních přímek z UV detekce pro jednotlivé látky

DMA: $y = 234,6x - 96,509$	Furanylfentanyl: $y = 339,16x - 110,99$
Fentanyl: $y = 5,542x - 0,7459$	Carfentanyl: $y = 8,1095x - 3,9458$
Thiofentanyl: $y = 19,459x - 6,556$	Sufentanyl: $y = 16,043x - 3,9458$

Tabulka 4.5: Rovnice kalibračních přímek z ECD detekce pro jednotlivé látky

DMA: $y = 7,8641x + 0,3468$	Furanylfentanyl: $y = 5,099x + 2,5931$
Fentanyl: $y = 2,8962x - 0,6145$	Carfentanyl: $y = 4,2652x + 1,8220$
Thiofentanyl: $y = 4,849x + 1,0475$	Sufentanyl: $y = 4,1027x - 1,1378$

Tabulka 4.6: Průměrné plochy píků analytů a vnitřního standardu ve vzorku moči z UV a ECD detekce, koncentrace vypočtené z kalibračních přímek a výtěžnost analytického postupu. Vzorky byly připraveny v duplikátu a každý duplikát byl analyzován dvakrát. Teoretická koncentrace při 100% výtěžku extrakce je 10 $\mu\text{mol/l}$, celkový počet měření: 4.

Látka	Průměrná plocha píků analytu (mAU·min – UV) (nA·min – ECD)		Vypočtená koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)		Výtěžnost (%)	
	UV	ECD	UV	ECD	UV	ECD
Fentanyl	0,0084	14,6335	0,1361	5,2648	1,4	52,6
Thiofentanyl	0,0875	29,1718	0,3414	5,8000	3,4	58,0
Furanylfentanyl	1,5440	27,6460	0,3318	4,9133	3,3	49,1
Carfentanyl	0,1383	27,1211	0,5036	5,9315	5,0	59,3
Sufentanyl	0,0661	22,0892	0,5931	5,6614	5,9	56,6

Výše uvedená *Tabulka 4.6* ukazuje, že výtěžnost při použití UV detekce je zanedbatelná oproti elektrochemické detekci, kde je minimálně 50 %.

4.4.2 Vyhodnocení metodou vnitřního standardu DMA

Při výpočtu pomocí metody vnitřního standardu byl využit odezvo­vý faktor s využitím směrníc kalibračních přímek standardu k_s a analytu k_x , aby byl pokryt celý rozsah koncentrací.

Odezvo­vý faktor F , *Rovnice 4.1*, a následně koncentrace fentanylu a jeho analogů c_x byly vypočítány podle následujících rovnic – *Rovnice 4.2* (pro plochu píku A_x fentanylu a jeho analogů), *Rovnice 4.3* (pro plochu píku A_s vnitřního standardu DMA) a *Rovnice 4.4* (pro výpočet koncentrace ve vzorku). *Rovnice 4.5* ukazuje dosažení do vzorce.

$$F = \frac{k_s}{k_x} \quad (4.1)$$

$$A_x = k_x \cdot c_x \quad (4.2)$$

$$A_s = k_s \cdot c_s \quad (4.3)$$

$$c_x = \frac{A_x}{A_s} \cdot \frac{k_s}{k_x} \cdot c_s = \frac{A_x}{A_s} \cdot F \cdot c_s \quad (4.4)$$

$$c_x = \frac{A_x}{A_s} \cdot \frac{k_s}{k_x} \cdot c_s = \frac{14,6335}{3,6215} \cdot \frac{7,8641}{2,8962} \cdot 2 \cdot 10^{-7} = 2,1944 \text{ } \mu\text{mol/l} \quad (4.5)$$

Následující schéma znázorňuje postup, který posloužil pro výpočet koncentrace analytu v analyzovaném vzorku extraktu za předpokladu při 100% výtěžnosti extrakce, *Tabulka 4.7*.

Tabulka 4.7: Schéma znázorňující postup při přepočtu koncentrace analytu v moči na teoretickou koncentraci v analyzovaném vzorku extraktu

Koncentrace analytu v moči	$2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$	$2 \cdot 10^{-9} \text{ mol/10 ml}$
Rozdělení na 2 stejné díly	5 ml	5 ml
	$1 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$	$1 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$
Při 100% extrakci	$1 \cdot 10^{-9} \text{ mol/100 } \mu\text{l} = 1 \text{ nmol/100 } \mu\text{l}$	$1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/1 ml} = 10 \text{ nmol/1 ml}$
		10 $\mu\text{mol/l}$

Tabulka 4.8: Průměrné plochy píků analytů ve vzorku moči z UV detekce, koncentrace stanovené pomocí metody vnitřního standardu DMA a výtěžnost analytického postupu. Vzorky byly připraveny v duplikátu a každý duplikát byl analyzován dvakrát. Teoretická koncentrace při 100% výtěžku extrakce je 10 $\mu\text{mol/l}$, celkový počet měření: 4.

Látka	Průměrná plocha píků analytu (mAU·min – UV) (nA·min – ECD)		Vypočtená koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)		Výtěžnost (%)	
	UV	ECD	UV	ECD	UV	ECD
Fentanyl	0,0084	14,6335	0,0324	2,1944	0,3	21,9
Thiofentanyl	0,0875	29,1718	0,2013	2,6127	2,0	26,1
Furanylfentanyl	1,5440	27,6460	3,3780	2,3547	33,8	23,5
Carfentanyl	0,1383	27,1211	0,3617	2,7616	3,6	27,6
Sufentanyl	0,0661	22,0892	0,1796	2,3383	1,8	23,4

Výše uvedená *Tabulka 4.8* ukazuje, že výtěžnost při použití UV detekce je zanedbatelná u všech fentanylů vyjma furanylfentanylu, kde výtěžnost přesahuje 35 % a je vyšší než při použití ECD detekce. Ostatní fentanyly vykazují výtěžnost při elektrochemické detekci v rozmezí 20–28 %.

4.4.3 Vyhodnocení metodou vnitřního standardu CPA

N-cyklopentylanilin byl použit jako alternativní vnitřní standard s větší lipofilitou ($\log P = 3,16$ [6]) než DMA ($\log P = 2,13$ [6]). Na rozdíl od DMA nebyla u CPA měřena kalibrační závislost, ale pouze odezva (plocha píků) pro koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, proto se výpočet s využitím odezvového faktoru mírně lišil. Z *Rovnice 4.6* byl vypočítán průměrný odezvový faktor F , který byl poté dosazen do *Rovnice 4.7* a byla vypočítána koncentrace fentanylu a jeho analogů ve vzorku moči (dosazení do vzorce znázorňuje *Rovnice 4.8*).

$$\frac{A_x}{c_x} = F \cdot \frac{A_s}{c_s} \Rightarrow F = \frac{A_x \cdot c_s}{A_s \cdot c_x} \quad (4.6)$$

$$c_x = \frac{A_x \cdot c_s}{F \cdot A_s} \quad (4.7)$$

$$c_x = \frac{A_x \cdot c_s}{F \cdot A_s} = \frac{14,6335 \cdot 50}{0,7544 \cdot 175,5712} = 5,5238 \mu\text{mol/l} \quad (4.8)$$

Tabulka 4.9: Průměrné plochy píků analytů ve vzorku moči z UV detekce, koncentrace stanovené pomocí metody vnitřního standardu CPA a výtěžnost analytického postupu. Vzorky byly připraveny v duplikátu a každý duplikát byl analyzován dvakrát. Teoretická koncentrace při 100% výtěžku extrakce je 10 $\mu\text{mol/l}$, celkový počet měření: 4.

Látka	Průměrný odezvový faktor F	Průměrná plocha píku analytu (mAU·min – UV) (nA·min – ECD)		Vypočtená koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)		Výtěžnost (%)	
		UV	ECD	UV	ECD	UV	ECD
Fentanyl	0,7544	0,0084	14,6335	0,1052	5,5238	1,1	55,2
Thiofentanyl	1,3054	0,0875	29,1718	0,6332	6,3642	6,3	63,6
Furanylfentanyl	1,4739	1,5440	27,6460	9,8960	5,3416	99,0	53,4
Carfentanyl	1,2512	0,1383	27,1211	1,0442	6,1728	10,4	61,7
Sufentanyl	0,9768	0,0661	22,0892	0,6388	6,4401	6,4	64,4

Výše uvedená *Tabulka 4.9* ukazuje, že nastala tatáž situace jako při použití vnitřního standardu dimethylanilinu – při UV detekci je výtěžnost velmi malá s výjimkou furanylfentanylu, kdy dosahuje téměř 100 %; ECD detekce nabízí výtěžnosti v rozmezí 53–65 %.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo vyvinout HPLC metodu pro izokratickou eluci ke stanovení fentanylu, jeho metabolitu norfentanylu a jeho analogů – thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu. Pro detekci byly použity dva detektory – UV detektor a coulometrický detektor. Během experimentů byly vyzkoušeny celkem 4 kolony – 10cm C18, 15cm C18, 15cm C8 a 15cm CN⁻.

Byly testovány mobilní fáze s vodnými roztoky různých elektrolytů (mravenčan amonný a octan amonný bez přídavku i s přídavkem chloristanu sodného, kyselina boritá, kyselina fosforečná) o různém pH a methanolem či acetonitrilem jako organickými složkami. Nejlepších separačních podmínek bylo dosaženo s mobilní fází se složením 0,05M HCOONH₄ + 0,10M KCl, pH = 9 : ACN v poměru 57 : 43 pro kolonu s oktysilikagelovou SF. Průtok byl nastaven na 1,2 ml/min, vlnová délka UV detektoru byla 255 nm a potenciál na obou elektrodách byl po proměření hydrodynamického voltamogramu nastaven na 1,0 V. Analýza trvala při výše uvedeném nastavení necelých 25 minut. Analýzou jednotlivých standardů bylo zjištěno eluční pořadí: fentanyl následován thiofentanylem, furanylfentanylem, carfentanylem a sufentanylem. V žádném z testovaných separačních systémů nebylo možné analyzovat norfentanyl, neboť se nezadržoval na koloně.

Po vyvinutí metody byl proměřen i vzorek biologického materiálu, konkrétně moč. Moč byla vhodně upravena a byla naspikovaná sadou fentanylů a vnitřními standardy, které poté posloužily ke kvantifikaci. Výsledná koncentrace analytů a vnitřního standardu byla 0,2 μmol/l. Po vyhodnocení 3 dostupnými metodami je zřejmé, že metoda vnitřního standardu dimethylanilinu vykazuje 20–30% výtěžnost oproti metodě kalibrační přímky a metodě vnitřního standardu *N*-cyklopentylanilinu, kde se výtěžnost pohybuje v rozmezí 50–65 % za předpokladu použití elektrochemické detekce. Anomálii způsobil furanylfentanyl, který vykazoval u metody vnitřního standardu (DMA i CPA) při použití UV detekce vyšší výtěžnosti, než u ECD detekce. Další kroky, které by mohly vést ke zvýšení výtěžnosti jsou vícenásobná extrakce či změna samotného nepolárního rozpouštědla.

Elektrochemická detekce se ukázala být výhodnější pro analýzu fentanylu v moči než UV detekce, neboť je selektivnější, tj. umožňuje detekovat pouze elektroaktivní látky ve vzorku a poskytuje tak jednodušší a lépe vyhodnotitelný chromatogram v případě komplexních vzorků.

Literatura

- [1] ADAMOWICZ, Piotr; BAKHMUT, Zhanetta; MIKOLAJCZYK, Anna. Screening procedure for 38 fentanyl analogues and five other new opioids in whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of applied toxicology*. 2020, roč. 40, č. 8, s. 1033–1046. ISSN 0260-437X.
- [2] ZAWILSKA, Jolanta B. An Expanding World of Novel Psychoactive Substances: Opioids. *Frontiers in psychiatry*. 2017, roč. 8, s. 110–110. ISSN 1664-0640.
- [3] WATANABE, Shimpei; VIKINGSSON, Svante; ROMAN, Markus aj. In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Studies for the New Synthetic Opioids Acetylfentanyl, Acrylfentanyl, Furanylfentanyl, and 4-Fluoro-Isobutyrylfentanyl. *The AAPS journal*. 2017, roč. 19, č. 4, s. 1102–1122. ISSN 1550-7416.
- [4] FLETCHER, JE; SEBEL, PS; MURPHY, MR; MICK, SA; FEIN, S. Comparison of sufentanil and fentanyl as supplements to general anesthesia. *Anesthesia and analgesia*. 1991, roč. 73, č. 5, s. 622–626. ISSN 0003-2999.
- [5] GLASSCOTT, Matthew W; VANNOY, Kathryn J; IRESH FERNANDO, P.U. Ashvin aj. Electrochemical sensors for the detection of fentanyl and its analogs: Foundations and recent advances. *TrAC, Trends in analytical chemistry (Regular ed.)* 2020, roč. 132, s. 116037. ISSN 0165-9936.
- [6] AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. *SciFinder-n, Chemical Abstract Service (CAS)*. 2022. Online. Dostupný také z: <https://scifinder-n.cas.org/>.
- [7] ROY, Samir D.; FLYNN, Gordon L. Solubility Behavior of Narcotic Analgesics in Aqueous Media: Solubilities and Dissociation Constants of Morphine, Fentanyl, and Sufentanil. *Pharmaceutical Research*. 2004, roč. 6, s. 147–151.
- [8] KIM, Sunghwan; CHEN, Jie; CHENG, Tiejun aj. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic acids research*. 2021, roč. 49, č. D1, s. D1388–D1395.
- [9] SHOFF, Elisa N.; ZANEY, M. Elizabeth; KAHL, Joseph H.; HIME, George W.; BOLAND, Diane M. Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017, roč. 41, č. 6, s. 484–492. ISSN 0146-4760.

- [10] BARBOSA, Lilian de Melo; SANTOS, Jandyson Machado; MORAIS, Damila Rodrigues aj. Fast UHPLC–MS/MS method for analysis of furanylfentanyl in different seized blotter papers. *Drug testing and analysis*. 2019, roč. 11, č. 1, s. 178–183. ISSN 1942-7603.
- [11] SWGDRUG - SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS. *Furanylfentanyl*. 2022. Online. Dostupný také z: <https://www.swgdrug.org/>.
- [12] MISAILIDI, Nektaria; PAPOUTSIS, Ioannis; NIKOLAOU, Panagiota aj. Furanylfentanyl: another fentanyl analogue, another hazard for public health. *Forensic toxicology*. 2017, roč. 36, č. 1, s. 1–11. ISSN 1860-8965.
- [13] MISAILIDI, Nektaria; PAPOUTSIS, Ioannis; NIKOLAOU, Panagiota aj. Fentanyl continues to replace heroin in the drug arena: the cases of ocfentanil and carfentanil. *Forensic toxicology*. 2017, roč. 36, č. 1, s. 12–32. ISSN 1860-8965.
- [14] GUITTON, Jérôme; BURONFOSSE, Thierry; DÉPAGE, Michel aj. Possible involvement of multiple cytochrome P450s in fentanyl and sufentanil metabolism as opposed to alfentanil. *Biochemical pharmacology*. 1997, roč. 53, č. 11, s. 1613–1619. ISSN 0006-2952.
- [15] *Treatment of controlled substance analogues, 21 U.S.C. § 813 (2010)*. Dostupný také z: <https://www.law.cornell.edu/uscode/text/21/813>.
- [16] HENDERSON, Gary L. Designer Drugs: Past History and Future Prospects. *Journal of Forensic Sciences*. 1988, roč. 33, č. 2, s. 1197–6J. ISSN 00221198.
- [17] CHOÍŇSKA, Marta Katarzyna; ŠESTÁKOVÁ, Ivana; HRDLIČKA, Vojtěch aj. Electroanalysis of Fentanyl and Its New Analogs: A Review. *Biosensors (Basel)*. 2022, roč. 12, č. 1, s. 26. ISSN 2079-6374.
- [18] LEE, Gerard. *A review of synthetic fentanyl metabolism and the metabolism of select synthetic fentanyl analogues*. 2019.
- [19] WILDE, Maurice; PICHINI, Simona; PACIFICI, Roberta aj. Metabolic Pathways and Potencies of New Fentanyl Analogs. *Frontiers in pharmacology*. 2019, roč. 10, s. 238–238. ISSN 1663-9812.
- [20] DEPRIEST, A Z; PUET, B L; HOLT, A C; ROBERTS, A; CONE, E J. Metabolism and Disposition of Prescription Opioids: A Review. *Forensic science review*. 2015, roč. 27, č. 2, s. 115–145. ISSN 1042-7201.
- [21] WANG, Wen-Ling; CONE, Edward J.; ZACNY, James. Immunoassay evidence for fentanyl in hair of surgery patients. *Forensic Science International*. 1993, roč. 61, č. 1, s. 65–72. ISSN 0379-0738.
- [22] SNYDER, Marion L.; JAROLIM, Petr; MELANSON, Stacy E.F. A new automated urine fentanyl immunoassay: Technical performance and clinical utility for monitoring fentanyl compliance. *Clinica Chimica Acta*. 2011, roč. 412, č. 11, s. 946–951.

- [23] WANG, Guohong; HUYNH, Kim; BARHATE, Rekha aj. Development of a homogeneous immunoassay for the detection of fentanyl in urine. *Forensic Science International*. 2011, roč. 206, č. 1, s. 127–131.
- [24] ANGELINI, Daniel J; BIGGS, Tracey D; PRUGH, Amber M aj. Detection of fentanyl and derivatives using a lateral flow immunoassay. *Forensic chemistry*. 2021, roč. 23, s. 100309. ISSN 2468-1709.
- [25] ANGELINI, Daniel J.; BIGGS, Tracey D.; MAUGHAN, Michele N. aj. Evaluation of a lateral flow immunoassay for the detection of the synthetic opioid fentanyl. *Forensic Science International*. 2019, roč. 300, s. 75–81. ISSN 0379-0738.
- [26] ANGELINI, Daniel J.; BIGGS, Tracey D.; PRUGH, Amber M. aj. The use of lateral flow immunoassays for the detection of fentanyl in seized drug samples and postmortem urine. *Journal of forensic sciences*. 2021, roč. 66, č. 2, s. 758–765. ISSN 0022-1198.
- [27] WHARTON, Rebekah E; CASBOHM, Jerry; HOFFMASTER, Ryan aj. Detection of 30 Fentanyl Analogs by Commercial Immunoassay Kits. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021, roč. 45, č. 2, s. 111–116.
- [28] TOBIN, T; TAI, HH; TAI, CL aj. Immunoassay detection of drugs in racing horses. IV. Detection of fentanyl and its congeners in equine blood and urine by a one step ELISA assay. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1988, roč. 60, č. 1, s. 97–115.
- [29] TOBIN, T; KWIATKOWSKI, S; WATT, DS aj. Immunoassay detection of drugs in racing horses. XI. ELISA and RIA detection of fentanyl, alfentanil, sufentanil and carfentanil in equine blood and urine. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1989, roč. 63, č. 1, s. 129–152.
- [30] WANG, Guohong; HUYNH, Kim; BARHATE, Rekha aj. Development of a homogeneous immunoassay for the detection of fentanyl in urine. *Forensic Science International*. 2011, roč. 206, č. 1, s. 127–131. ISSN 0379-0738.
- [31] RUANGYUTTIKARN, Werawan; LAW, Michael Y.; ROLLINS, Douglas E.; MOODY, David E. Detection of Fentanyl and its Analogs by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. *Journal of Analytical Toxicology*. 1990, roč. 14, č. 3, s. 160–164.
- [32] MOORE, C.; MARINETTI, L.; COULTER, C.; CROMPTON, K. Analysis of pain management drugs, specifically fentanyl, in hair: Application to forensic specimens. *Forensic Science International*. 2008, roč. 176, č. 1, s. 47–50. Practical Aspects of Drug Testing in Hair.
- [33] DELBEKE, F. T.; DEBACKERE, M. ELISA detection of fentanyl in horse urine and plasma. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 1989, roč. 12, č. 1, s. 1–4. ISSN 0140-7783.

- [34] SCHACKMUTH, Madison; KERRIGAN, Sarah. Immunoassay-based detection of fentanyl analogs in forensic toxicology. *Forensic toxicology*. 2018, roč. 37, č. 1, s. 231–237. ISSN 1860-8965.
- [35] STRANO-ROSSI, Sabina; ÁLVAREZ, Iván; TABERNERO, María Jesús aj. Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS. *Journal of Applied Toxicology*. 2011, roč. 31, č. 7, s. 649–654.
- [36] DRUGS, United Nations Office on; CRIME. *Recommended Methods for The Identification and Analysis of Fentanyl and Its Analogues in Biological Specimens*. 2018.
- [37] VERSACE, François; SPORKERT, Frank; MANGIN, Patrice; STAUB, Christian. Rapid sample pre-treatment prior to GC–MS and GC–MS/MS urinary toxicological screening. *Talanta*. 2012, roč. 101, s. 299–306.
- [38] STRANO-ROSSI, Sabina; BERMEJO, Ana Maria; TORRE, Xavier de la; BOTRÈ, Francesco. Fast GC-MS method for the simultaneous screening of THC-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010, roč. 399, č. 4, s. 1623–1630.
- [39] MISAILIDI, Nektaria; ATHANASELIS, Sotiris; NIKOLAOU, Panagiota aj. A GC–MS method for the determination of furanylfentanyl and ocfentanil in whole blood with full validation. *Forensic toxicology*. 2018, roč. 37, č. 1, s. 238–244.
- [40] SACHS, Hans; UHL, Michael; HEGE-SCHEUING, G; SCHNEIDER, E. Analysis of fentanyl and sufentanil in hair by GC/MS/MS. *International Journal of Legal Medicine*. 2005, roč. 109, s. 213–215.
- [41] UHL, M. Determination of drugs in hair using GC/MS/MS. *Forensic Science International*. 1997, roč. 84, č. 1, s. 281–294. Proceedings of the 1st European Meeting on Hair Analysis. Clinical, Occupational and Forensic Application.
- [42] BRUIN-HOEGÉE, Mirjam de; KLEIWEG, Djarah; NOORT, Daan; ASTEN, Arian C van. Chemical attribution of fentanyl: The effect of human metabolism. *Forensic chemistry*. 2021, roč. 24, s. 100330. ISSN 2468-1709.
- [43] ROOY, H.H van; VERMEULEN, N.P.E; BOVILL, J.G. The assay of fentanyl and its metabolites in plasma of patients using gas chromatography with alkali flame ionisation detection and gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of chromatography. Biomedical applications*. 1981, roč. 223, č. 1, s. 85–93.
- [44] STRAYER, Kraig E; ANTONIDES, Heather M; JUHASCIK, Matthew P; DANIULAITYTE, Raminta; SIZEMORE, Ioana E. LC-MS/MS-Based Method for the Multiplex Detection of 24 Fentanyl Analogues and Metabolites in Whole Blood at Sub ng mL⁻¹ Concentrations. *ACS omega*. 2018, roč. 3, č. 1, s. 514–523. ISSN 2470-1343.

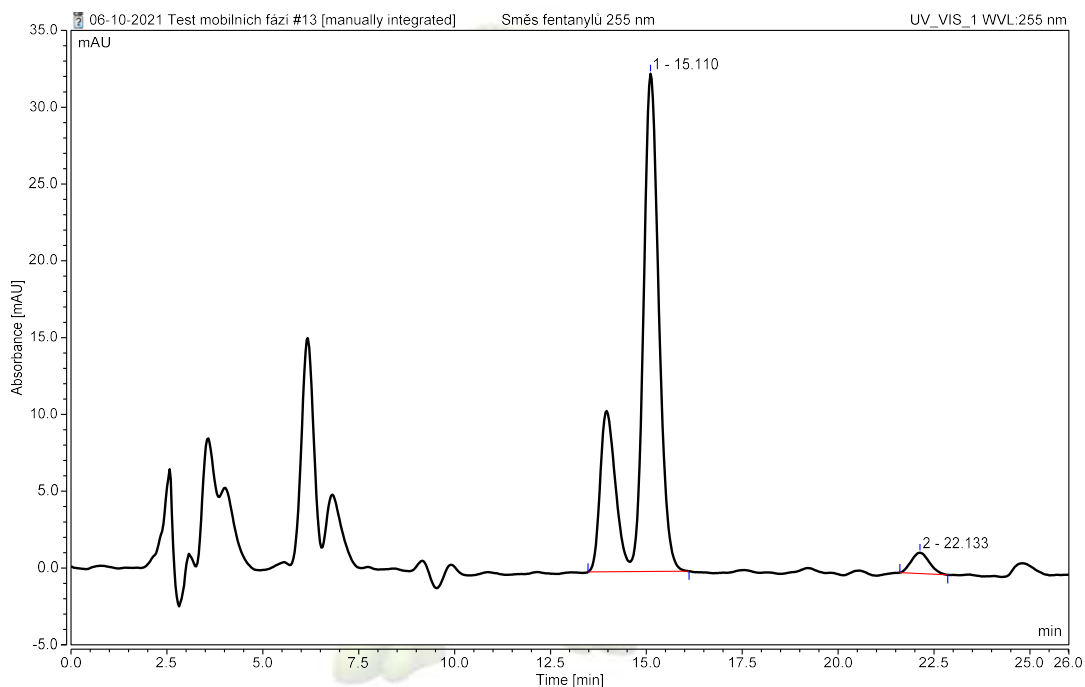
- [45] MARIN, Stephanie J.; HUGHES, John M.; LAWLOR, Bryan G.; CLARK, Chantry J.; MCMILLIN, Gwendolyn A. Rapid Screening for 67 Drugs and Metabolites in Serum or Plasma by Accurate-Mass LC–TOF-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2012, roč. 36, č. 7, s. 477–486.
- [46] FOGARTY, Melissa F; PAPSUN, Donna M; LOGAN, Barry K. Analysis of Fentanyl and 18 Novel Fentanyl Analogs and Metabolites by LC–MS-MS, and report of Fatalities Associated with Methoxyacetylfentanyl and Cyclopropylfentanyl. *Journal of Analytical Toxicology*. 2018, roč. 42, č. 9, s. 592–604.
- [47] MOODY, Marykathryn Tynon; DIAZ, Stephanie; SHAH, Parul; PAPSUN, Donna; LOGAN, Barry K. Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework. *Drug testing and analysis*. 2018, roč. 10, č. 9, s. 1358–1367.
- [48] BISTA, Sudeep R.; LOBB, Michael; HAYWOOD, Alison aj. Development, validation and application of an HPLC–MS/MS method for the determination of fentanyl and nor-fentanyl in human plasma and saliva. *Journal of Chromatography B*. 2014, roč. 960, s. 27–33.
- [49] SEYMOUR, Craig; SHANER, Rebecca L; FEYEREISEN, Melanie C aj. Determination of Fentanyl Analog Exposure Using Dried Blood Spots with LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2018, roč. 43, č. 4, s. 266–276.
- [50] GOODCHILD, Sarah A; HUBBLE, Lee J; MISHRA, Rupesh K aj. Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl. *Analytical chemistry (Washington)*. 2019, roč. 91, č. 5, s. 3747–3753. ISSN 0003-2700.
- [51] PENG, Li Juan; WEN, Meng Liang; YAO, Yun. Potentiometric determination of fentanyl in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, roč. 30, č. 3, s. 667–673.
- [52] GUO, Hong; HU, Naifei; LIN, Shuchang. Adsorptive stripping voltammetric properties of fentanyl at Hg electrode. *Talanta*. 1994, roč. 41, č. 11, s. 1929–1932.
- [53] GOODCHILD, Sarah A; HUBBLE, Lee J; MISHRA, Rupesh K aj. Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl. *Analytical chemistry (Washington)*. 2019, roč. 91, č. 5, s. 3747–3753.
- [54] BARFIDOKHT, Abbas; MISHRA, Rupesh K.; SEENIVASAN, Rajesh aj. Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, roč. 296, s. 126422.
- [55] SOHOULI, Esmail; KEIHAN, Amir Homayoun; SHAHDOST-FARD, Faezeh aj. A glassy carbon electrode modified with carbon nanoions for electrochemical determination of fentanyl. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, roč. 110, s. 110684.

- [56] HU, Naifei; GUO, Hong; LIN, Shuchang. Adsorptive stripping voltammetry of a fentanyl derivative at a mercury electrode. *Talanta*. 1994, roč. 41, č. 8, s. 1269–1274.
- [57] GUO, Hong; HU, Naifei; LIN, Shuchang. Adsorptive stripping voltammetric properties of fentanyl at Hg electrode. *Talanta*. 1994, roč. 41, č. 11, s. 1929–1932.
- [58] PENG, LJ; WEN, ML; YAO, Y. Fentanyl-selective polymeric membrane electrode. *Die Pharmazie*. 2001, roč. 56, č. 10, s. 780–782.
- [59] PENG, Li Juan; WEN, Meng Liang; YAO, Yun. Construction and Performance Characteristics of New Fentanyl-Selective Plastic Membrane Electrode. *Analytical Sciences*. 2001, roč. 17, č. 7, s. 815–818.
- [60] PENG, Li Juan; WEN, Meng Liang; YAO, Yun. Potentiometric determination of fentanyl in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, roč. 30, č. 3, s. 667–673.
- [61] DAI, Hong; XU, Huifeng; WU, Xiaoping; CHI, Yuwu; CHEN, Guonan. Fabrication of a new electrochemiluminescent sensor for fentanyl citrate based on glassy carbon microspheres and ionic liquid composite paste electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2009, roč. 647, č. 1, s. 60–65.
- [62] AHMAR, Hamid; FAKHARI, Ali Reza; TABANI, Hadi; SHAHSAVANI, Abolfath. Optimization of electromembrane extraction combined with differential pulse voltammetry using modified screen-printed electrode for the determination of sufentanil. *Electrochimica Acta*. 2013, roč. 96, s. 117–123.
- [63] BARFIDOKHT, Abbas; MISHRA, Rupesh K.; SEENIVASAN, Rajesh aj. Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, roč. 296, s. 126422.
- [64] GOODCHILD, Sarah A; HUBBLE, Lee J; MISHRA, Rupesh K aj. Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl. *Analytical chemistry (Washington)*. 2019, roč. 91, č. 5, s. 3747–3753.
- [65] WESTER, Niklas; MYNTTINEN, Elsi; ETULA, Jarkko aj. Single-Walled Carbon Nanotube Network Electrodes for the Detection of Fentanyl Citrate. *ACS applied nano materials*. 2020, roč. 3, č. 2, s. 1203–1212.
- [66] MISHRA, Rupesh K; GOUD, K. Yugender; LI, Zhanhong aj. Continuous Opioid Monitoring along with Nerve Agents on a Wearable Microneedle Sensor Array. *Journal of the American Chemical Society*. 2020, roč. 142, č. 13, s. 5991–5995.

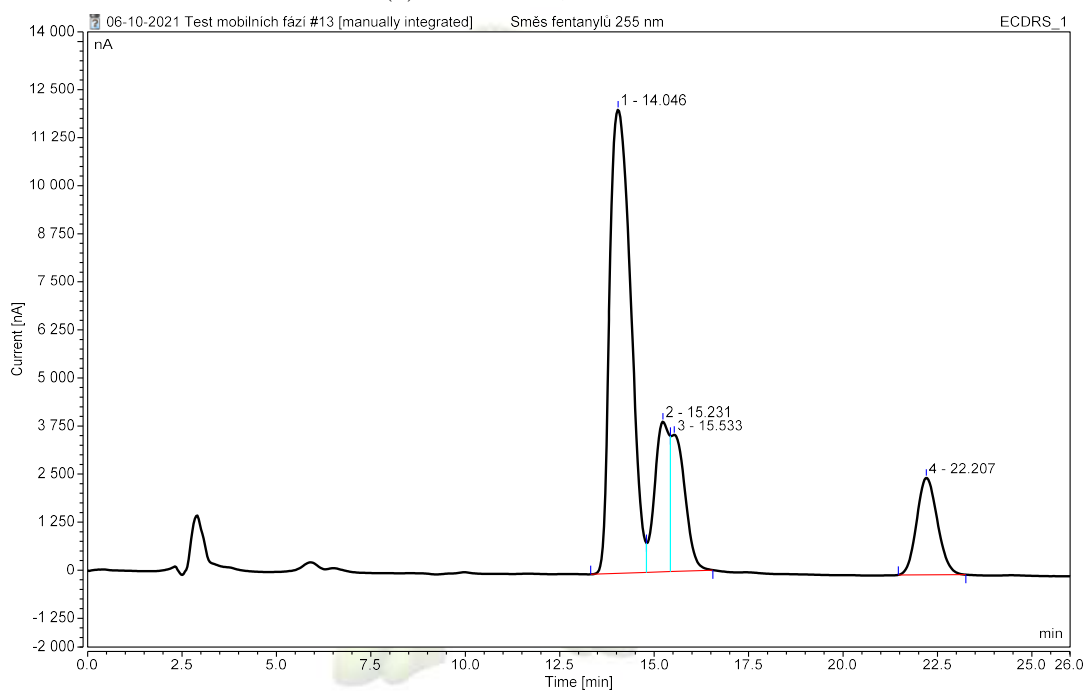
- [67] NAGHIAN, Ebrahim; MARZI KHOSROWSHAHI, Elnaz; SOHOULI, Esmail aj. A new electrochemical sensor for the detection of fentanyl lethal drug by a screen-printed carbon electrode modified with the open-ended channels of Zn()-MOF. *New journal of chemistry*. 2020, roč. 44, č. 22, s. 9271–9277.
- [68] WYSOCKI, Jędrzej; DONG, Michael. Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*. 2019, roč. 37, č. 10, s. 750–759.
- [69] LAMBROPOULOS, John; SPANOS, George A; LAZARIDIS, Nick V. Development and validation of an HPLC assay for fentanyl, alfentanil, and sufentanil in swab samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2000, roč. 23, č. 2, s. 421–428. ISSN 0731-7085.
- [70] SARAJI, Mohammad; KHALILI BOROUJENI, Malihe; HAJIALIAKBARI BIDGOLI, Ali Akbar. Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction for the determination of fentanyl, alfentanil, and sufentanil in water and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2011, roč. 400, č. 7, s. 2149–2158. ISSN 1618-2642.
- [71] SELINGER, Krzysztof; LANZO, Cheryl; SEKUT, Alicja. Determination of remifentanil in human and dog blood by HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1994, roč. 12, č. 2, s. 243–248. ISSN 0731-7085.
- [72] ALMOUSA, Ahmed A.; IKEDA, Rie; WADA, Mitsuhiro aj. HPLC-UV method development for fentanyl determination in rat plasma and its application to elucidate pharmacokinetic behavior after i.p. administration to rats. *Journal of Chromatography B*. 2011, roč. 879, č. 27, s. 2941–2944. ISSN 1570-0232.
- [73] NAITO, Takafumi; TAKASHINA, Yoshiaki; YAGI, Tatsuya; KAWAKAMI, Junichi. Simple and Rapid HPLC-UV Method Using an Ultrafine Particle Octadecylsilane for Determination of Residual Fentanyl in Applied Durotep® MT Transdermal Matrix Patches and Its Clinical Application. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2012, roč. 60, č. 1, s. 56–61.
- [74] GARG, Anuradha; SOLAS, Dennis W; TAKAHASHI, Lori H; CASSELLA, James V. Forced degradation of fentanyl: Identification and analysis of impurities and degradants. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010, roč. 53, č. 3, s. 325–334. ISSN 0731-7085.
- [75] SELAVKA, Carl M.; KRULL, Ira S.; LURIE, Ira S. Photolytic Derivatization for Improved LCEC Determinations of Pharmaceuticals in Biological Fluids. *Journal of Chromatographic Science*. 1985, roč. 23, č. 11, s. 499–508.
- [76] ELBARDISY, Hadil M.; FOSTER, Christopher W.; CUMBA, Loanda aj. Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection. *Analytical methods*. 2019, roč. 11, č. 8, s. 1053–1063. ISSN 1759-9660.

- [77] PENG, Li Juan; WEN, Meng Liang; YAO, Yun. Potentiometric determination of fentanyl in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2002, roč. 30, č. 3, s. 667–673. ISSN 0731-7085.
- [78] HUDSON, Robert J.; THOMSON, Ian R.; CANNON, John E.; FRIESEN, Robert M.; METHERALL, Robert C. Pharmacokinetics of Fentanyl in Patients Undergoing Abdominal Aortic Surgery. *Anesthesiology*. 1986, roč. 64, č. 3, s. 334–338. ISSN 0003-3022.
- [79] ZUWAY, Khaled Y; SMITH, Jamie P; FOSTER, Christopher W aj. Detection and quantification of new psychoactive substances (NPSs) within the evolved "legal high" product, NRG-2, using high performance liquid chromatography-amperometric detection (HPLC-AD). *Analyst (London)*. 2015, roč. 14, č. 18, s. 6283–6294. ISSN 0003-2654.
- [80] SCHULZ, Martin; SCHMOLDT, Achim; ANDRESEN-STREICHERT, Hilke; IWERSEN-BERGMANN, Stefanie. Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. *Critical care (London, England)*. 2020, roč. 24, č. 1, s. 195–4. ISSN 1364-8535.
- [81] ALMOUSA, Ahmed A; IKEDA, Rie; WADA, Mitsuhiro aj. HPLC-UV method development for fentanyl determination in rat plasma and its application to elucidate pharmacokinetic behavior after i.p. administration to rats. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2011, roč. 879, č. 27, s. 2941–2944. ISSN 1570-0232.
- [82] TISCIONE, Nicholas B.; WEGNER, Kristin. Validation of the Neogen® Fentanyl ELISA Kit for Blood and Urine. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017, roč. 41, č. 4, s. 313–317.
- [83] WISHART, David S; FEUNANG, Yannick D; GUO, An C aj. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*. 2018, roč. 46, č. D1, s. D1074–D1082.

Příloha A



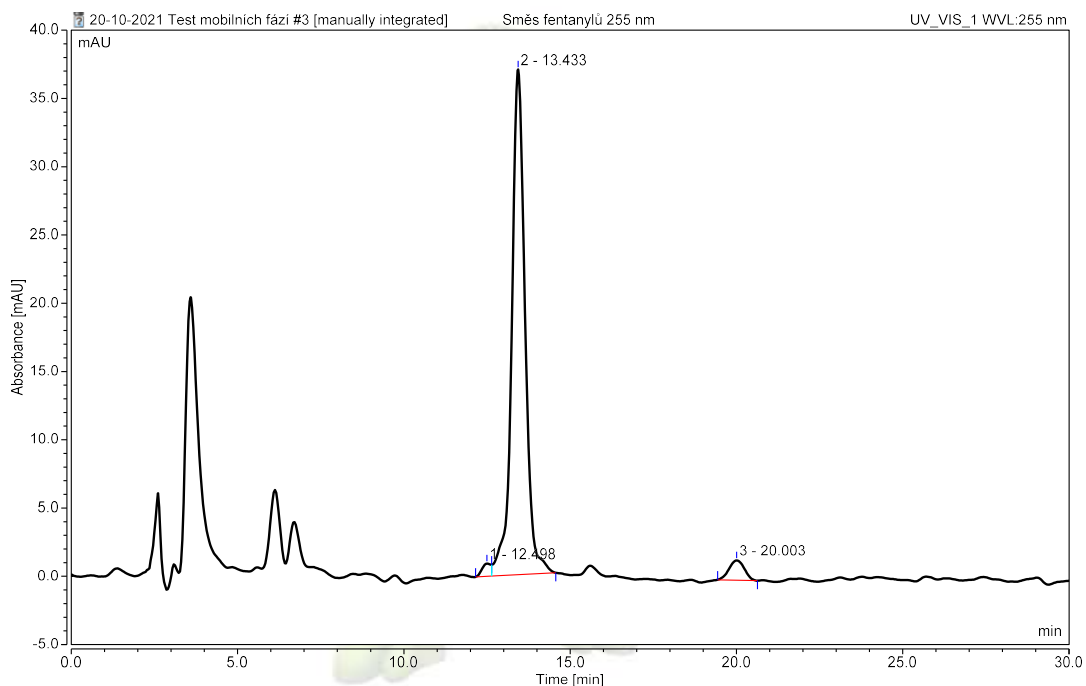
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



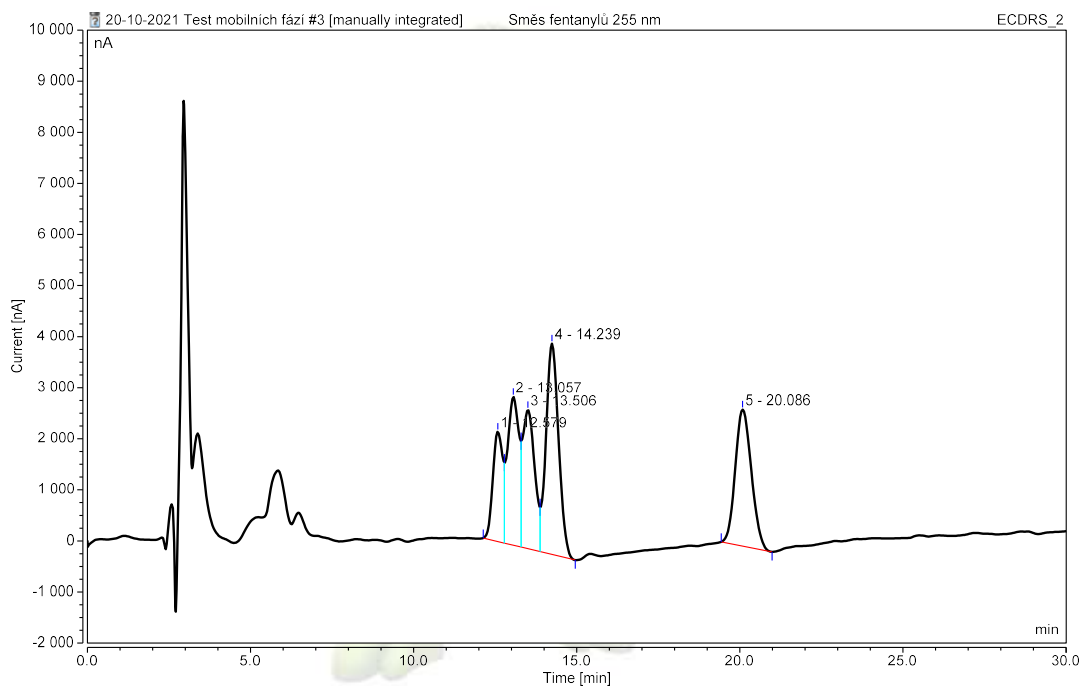
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek A.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 9 : ACN (52 : 48), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha B



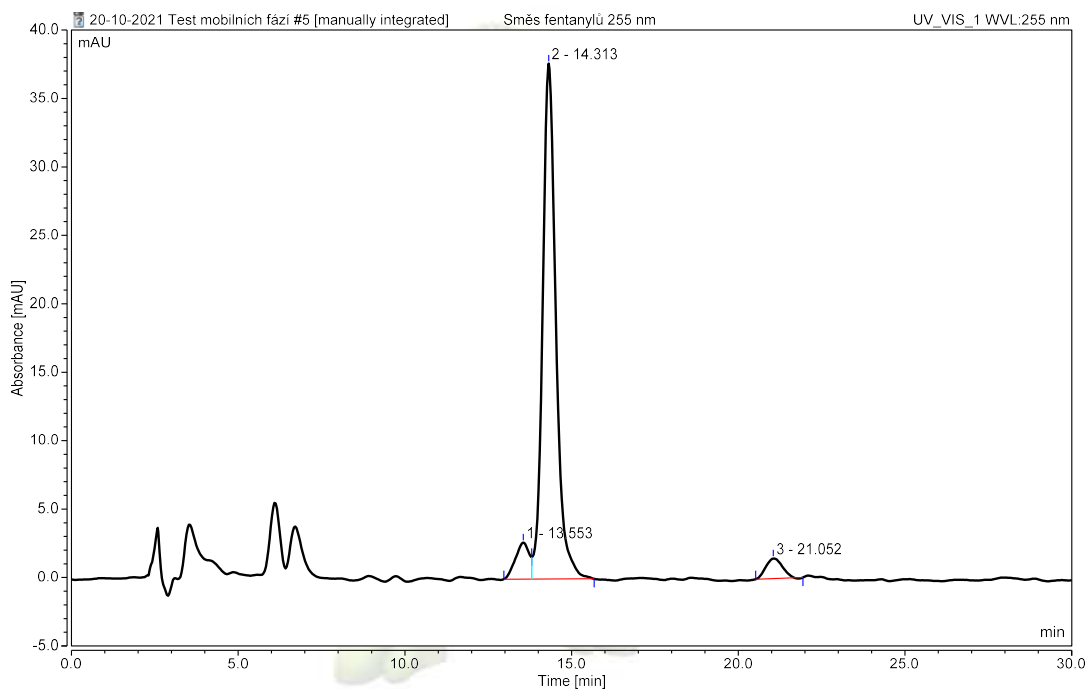
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



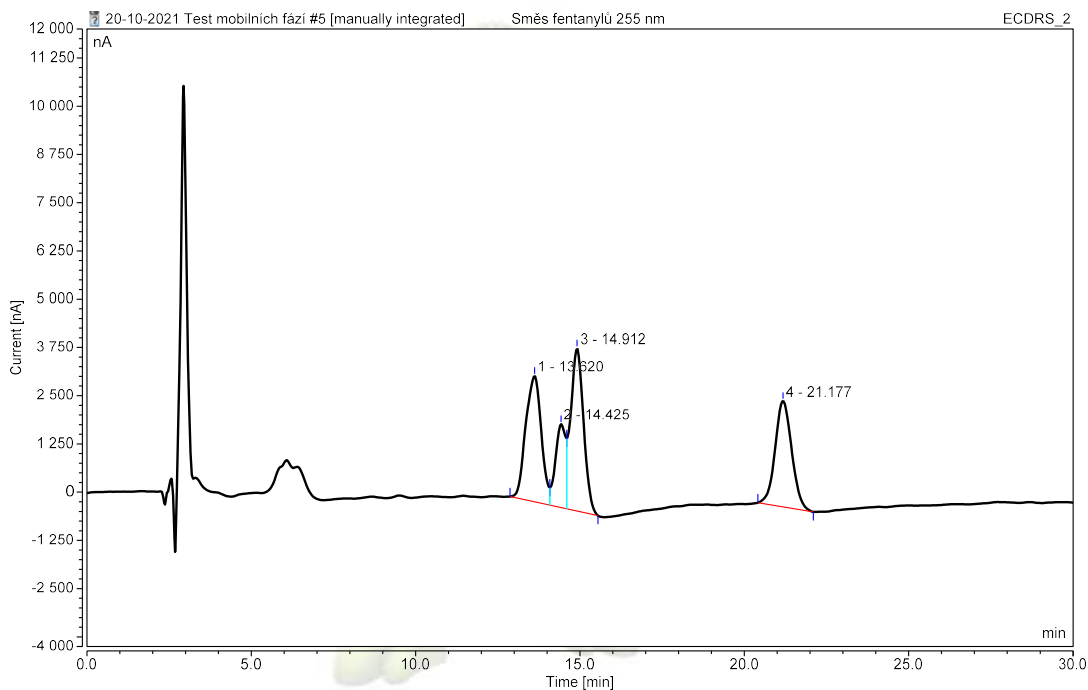
(b) Elektrochemická detekce, $E = +1,1V$

Obrázek B.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: $0,05M$ CH_3COONH_4 + $0,05M$ ClO_4^- , pH = 9 : ACN (52 : 48), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha C



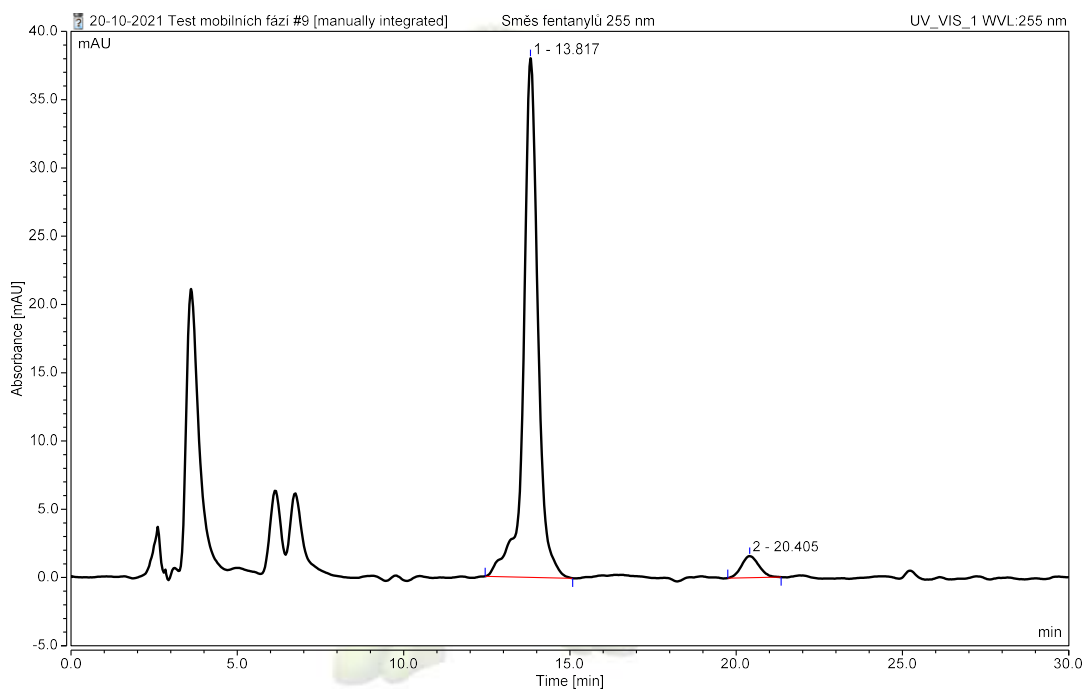
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



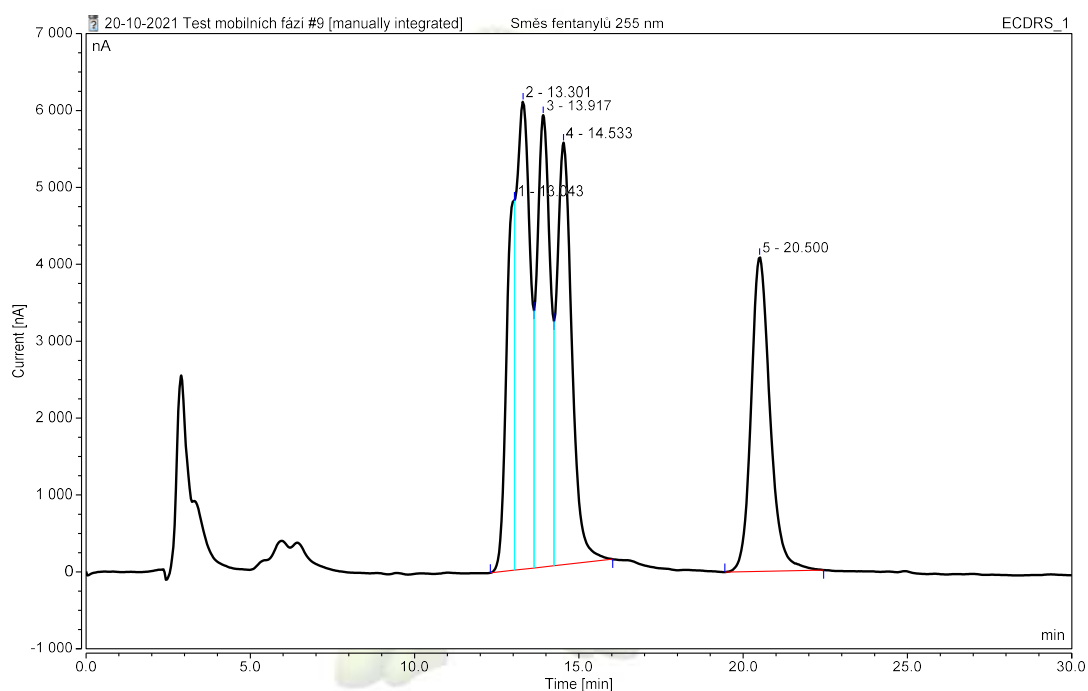
(b) Elektrochemická detekce, $E = +1,1$ V

Obrázek C.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: $0,05\text{M CH}_3\text{COONH}_4 + 0,05\text{M ClO}_4^-$, pH = 9 : ACN (52 : 48), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha D



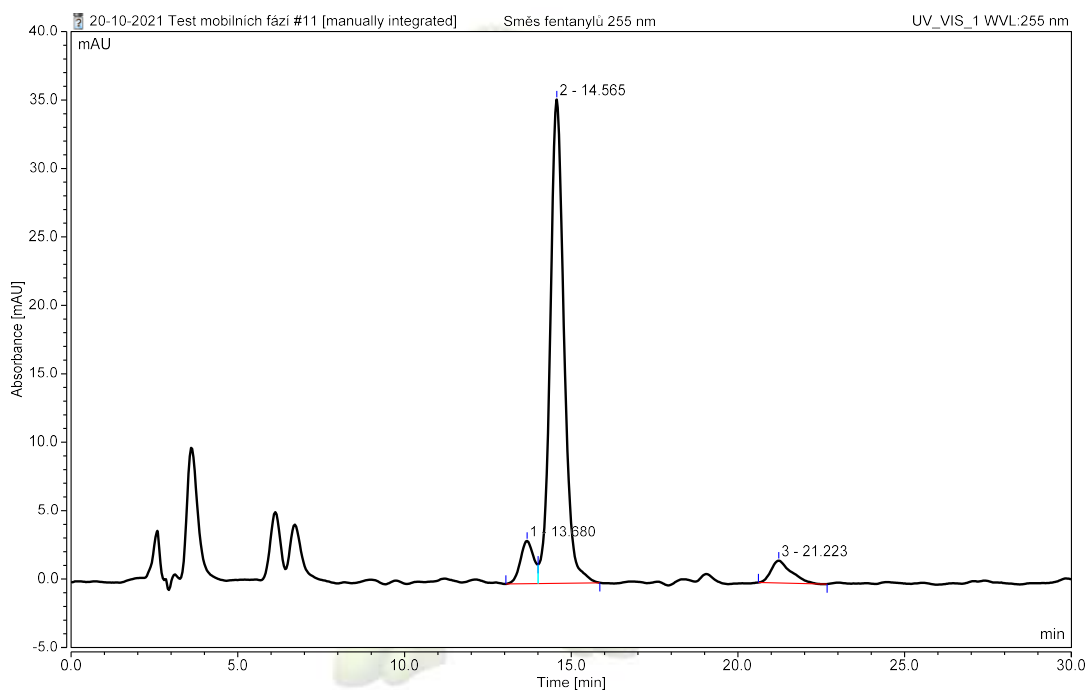
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



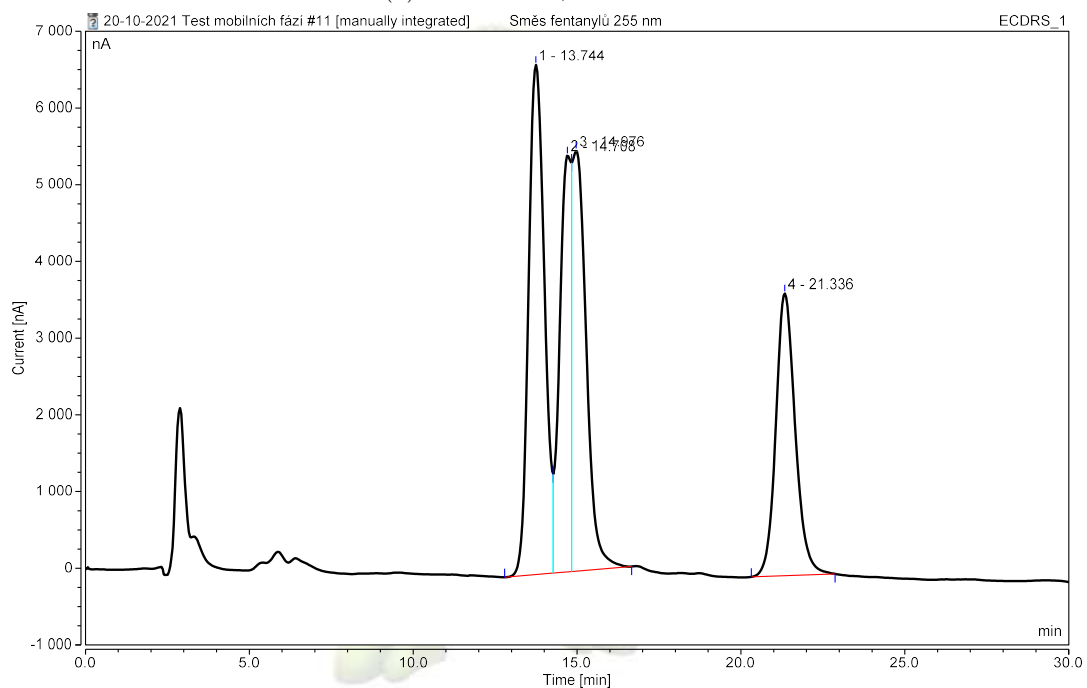
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek D.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 9 : ACN (52 : 48), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha E



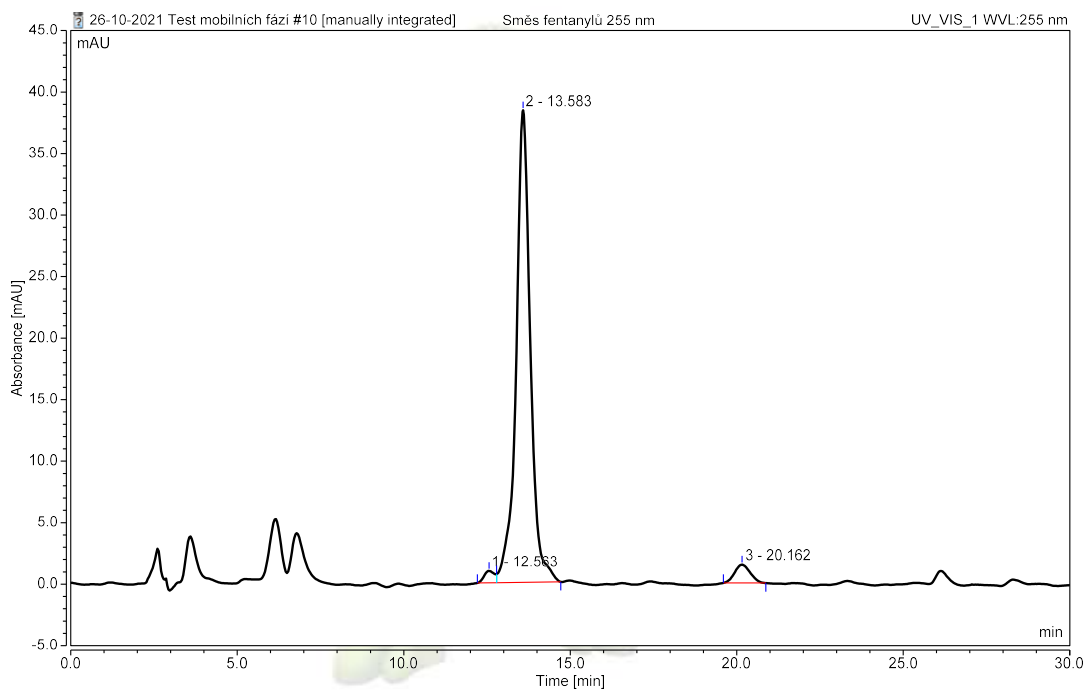
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



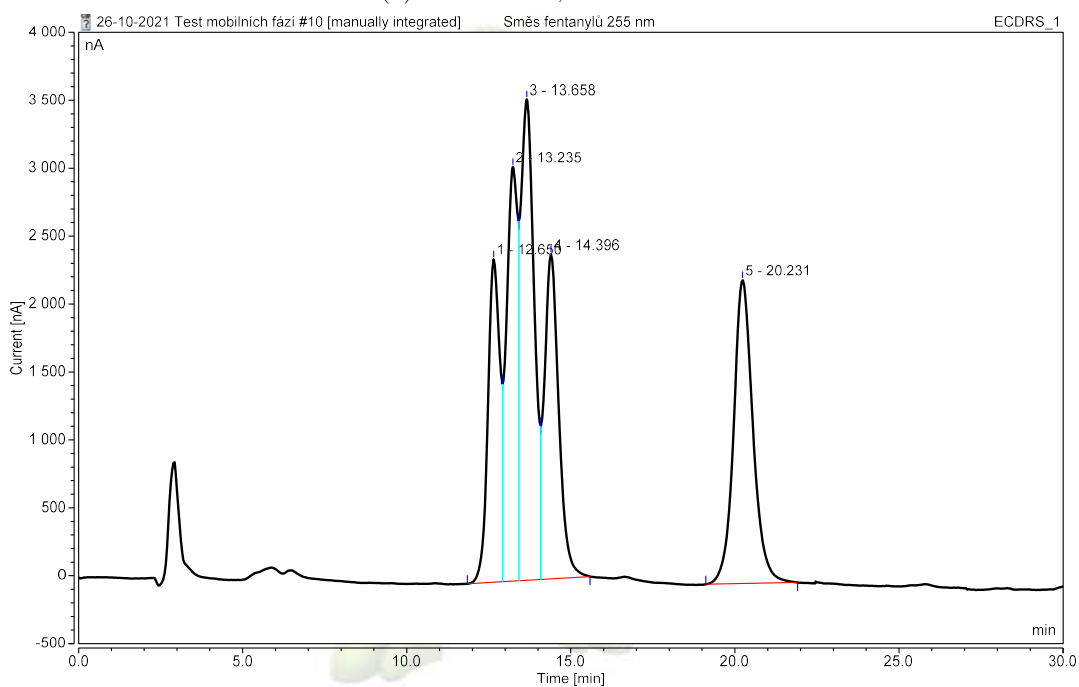
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek E.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C18, mobilní fáze: $0,05\text{M CH}_3\text{COONH}_4 : \text{ACN}$ (celková směs upravena na $\text{pH} = 9$ (52 : 48), průtok: $0,5 \text{ ml/min}$).

Příloha F



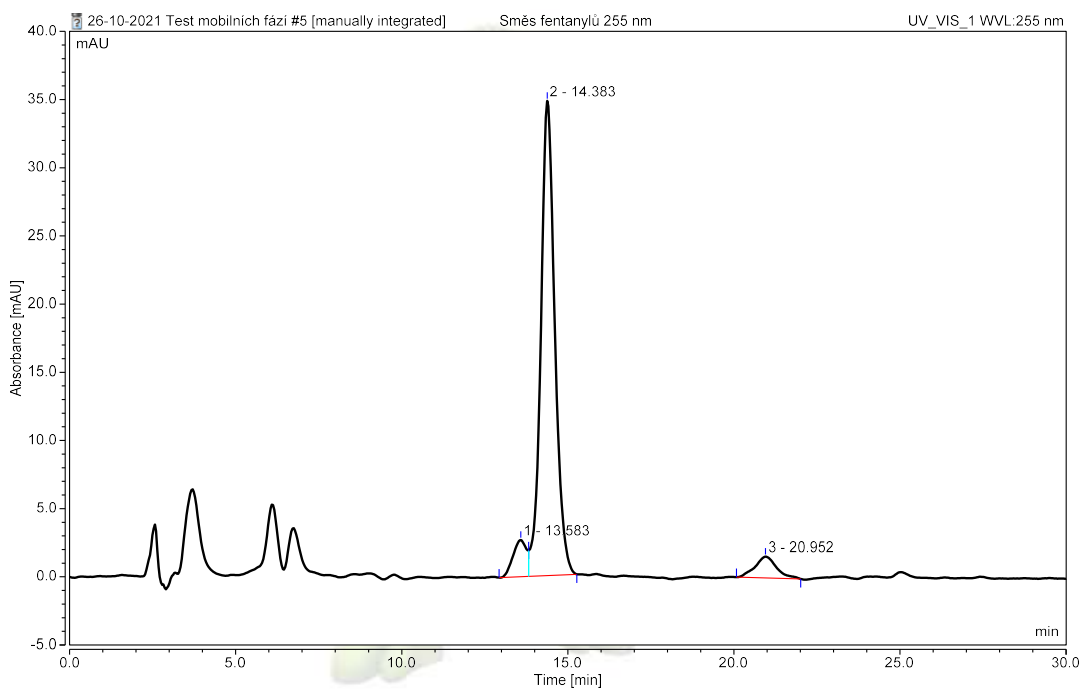
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



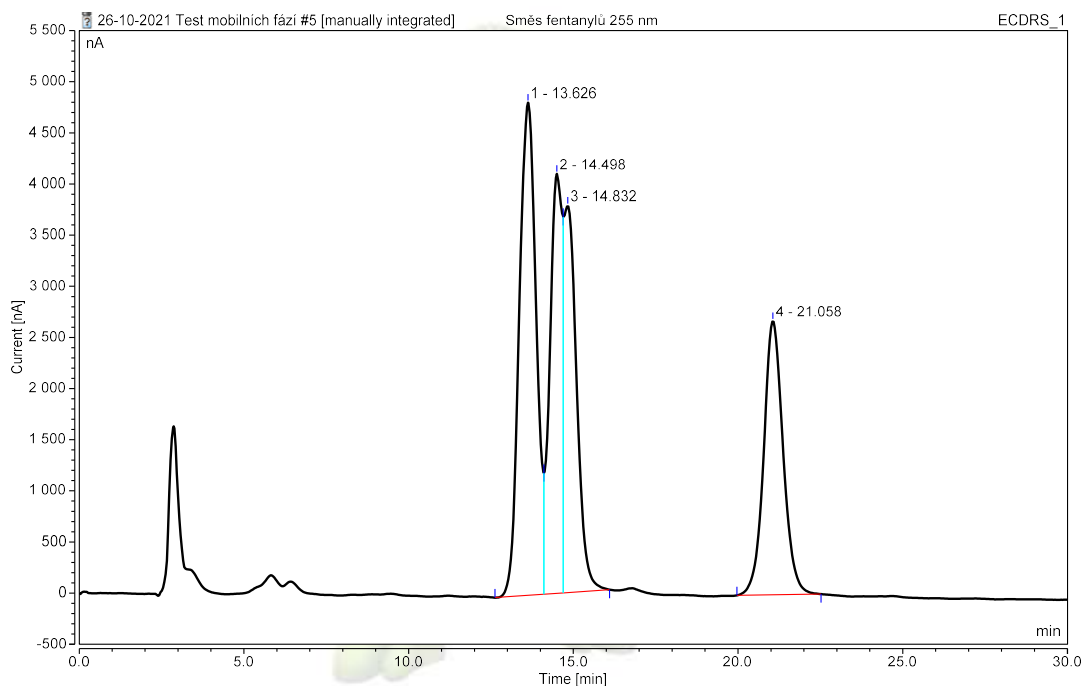
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek F.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (52 : 48), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha G



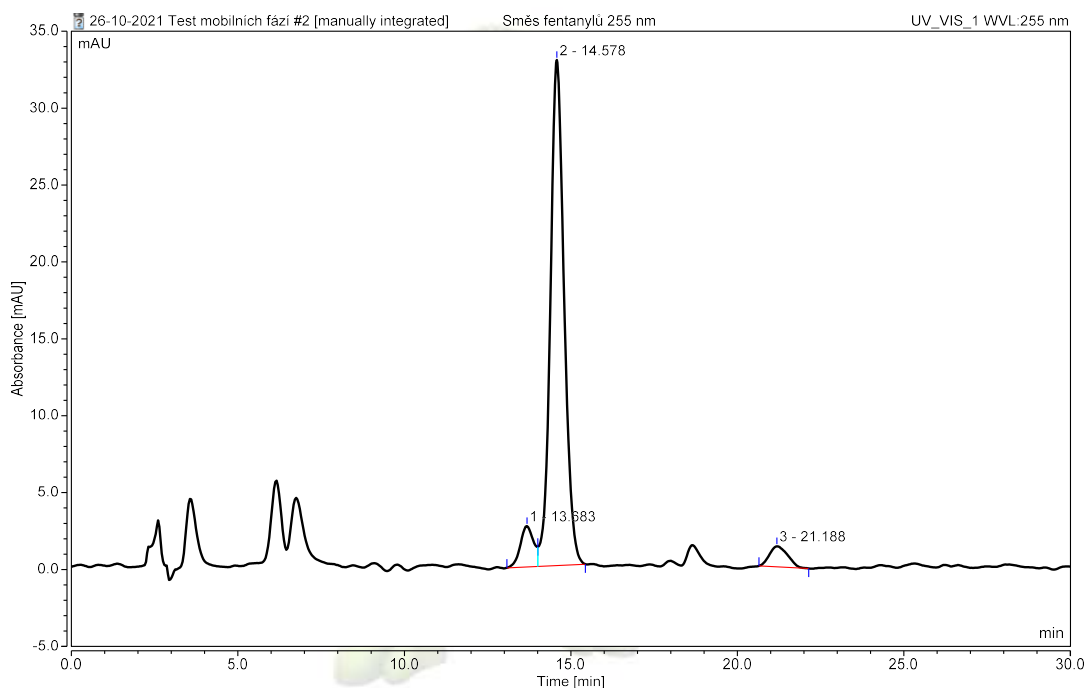
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



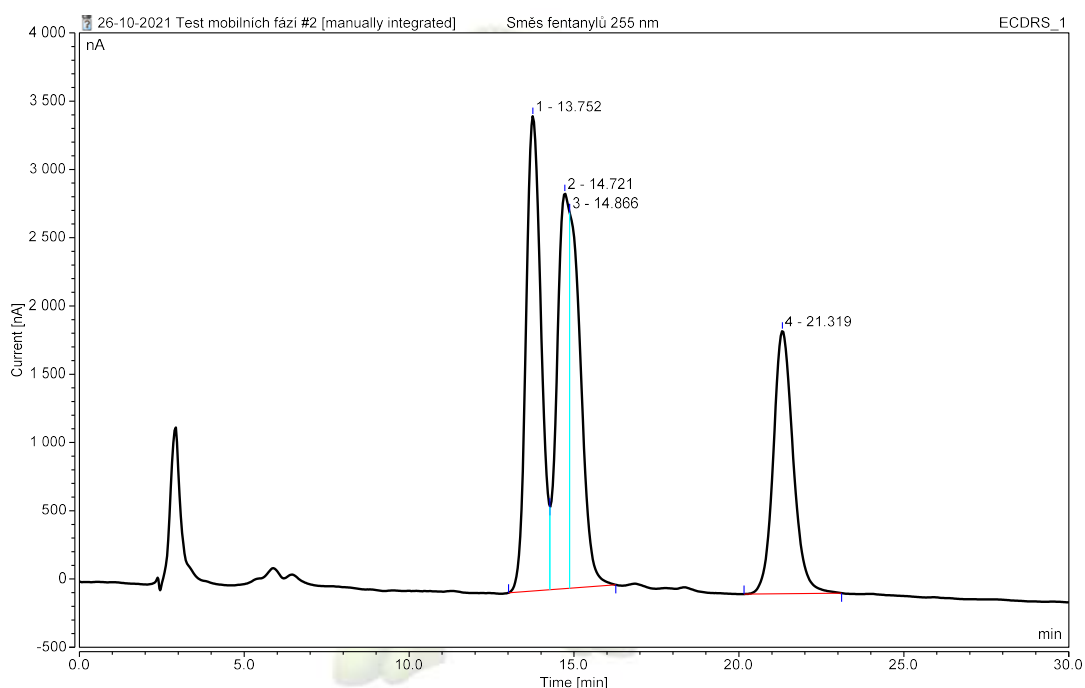
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek G.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C18, mobilní fáze: $0,05\text{M HCOONH}_4 + 0,05\text{M KCl} : \text{ACN}$ (celková směs upravena na $\text{pH} = 9$) (52 : 48), průtok: $0,5 \text{ ml/min}$.

Příloha H



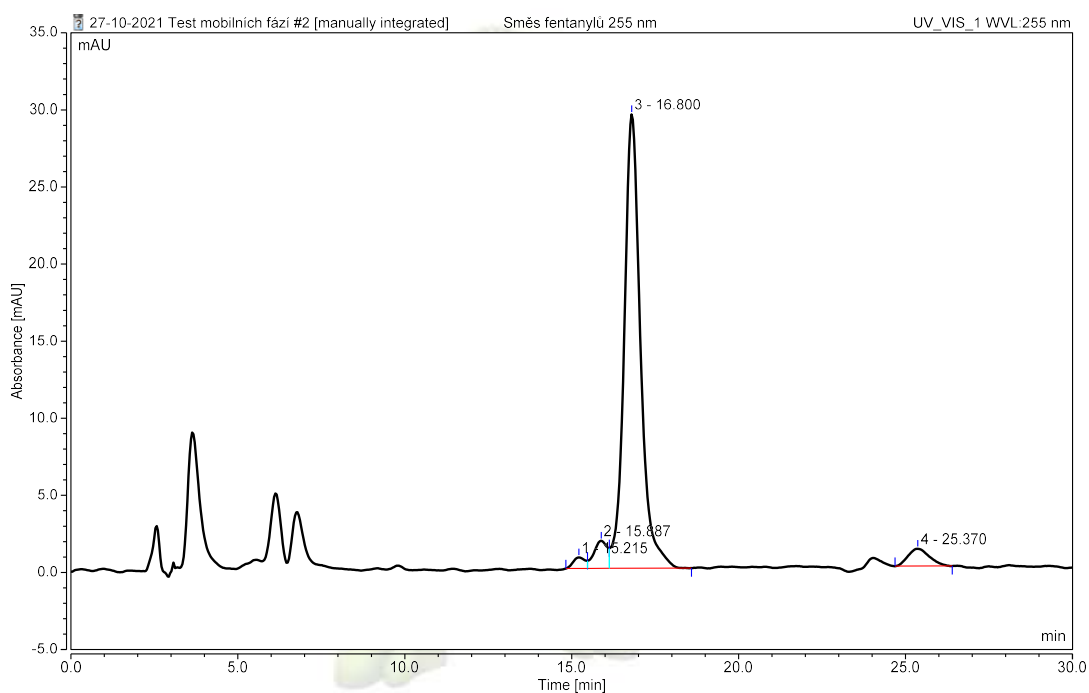
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



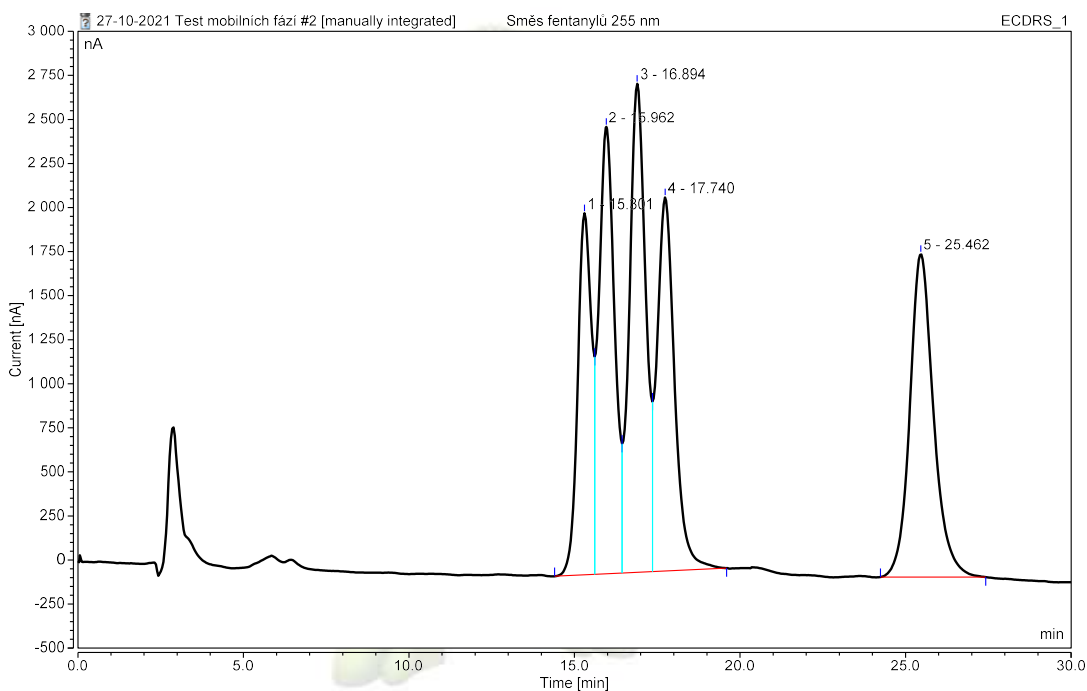
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek H.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ : ACN (celková směs upravena na pH = 9) (52 : 48), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha I



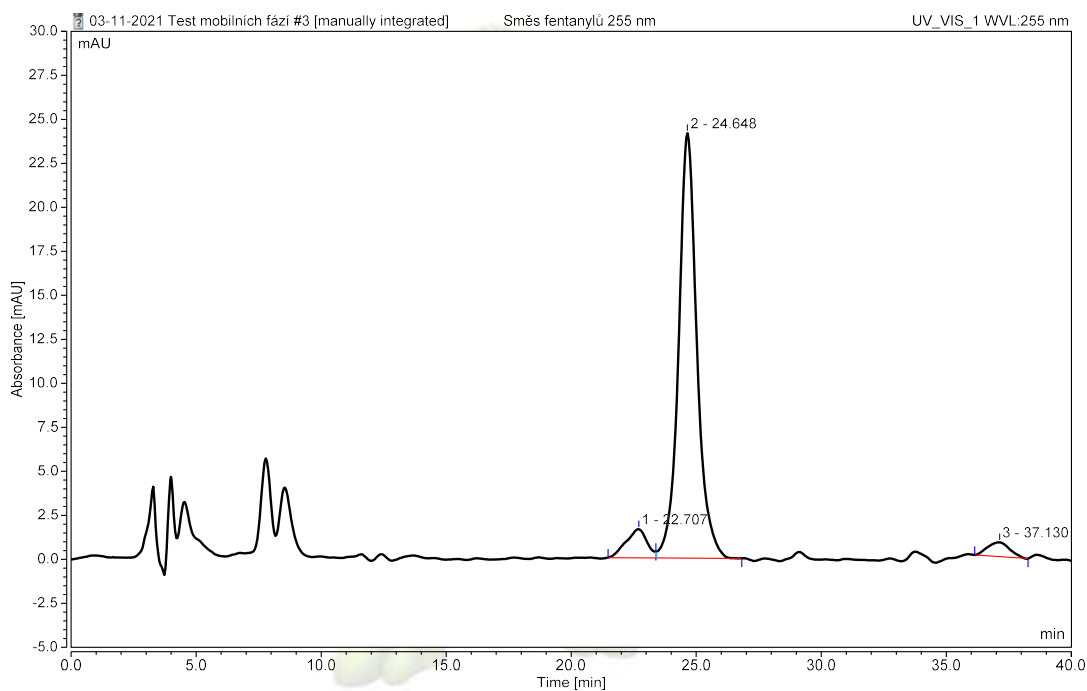
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



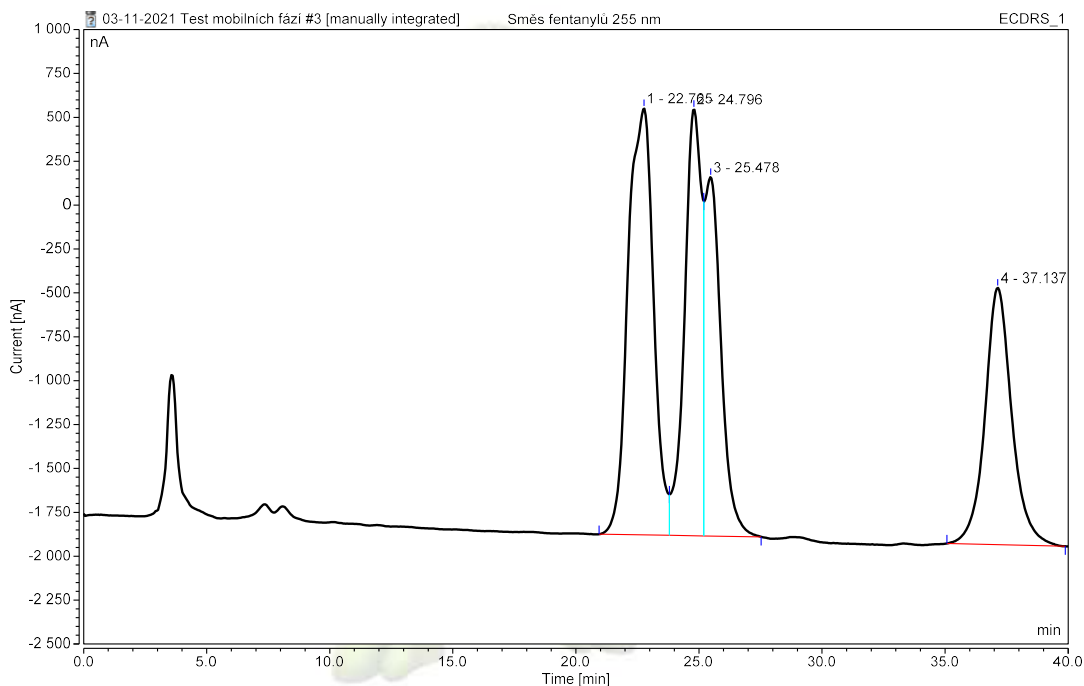
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek I.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (54 : 46), průtok: 0,5 ml/min.

Příloha J



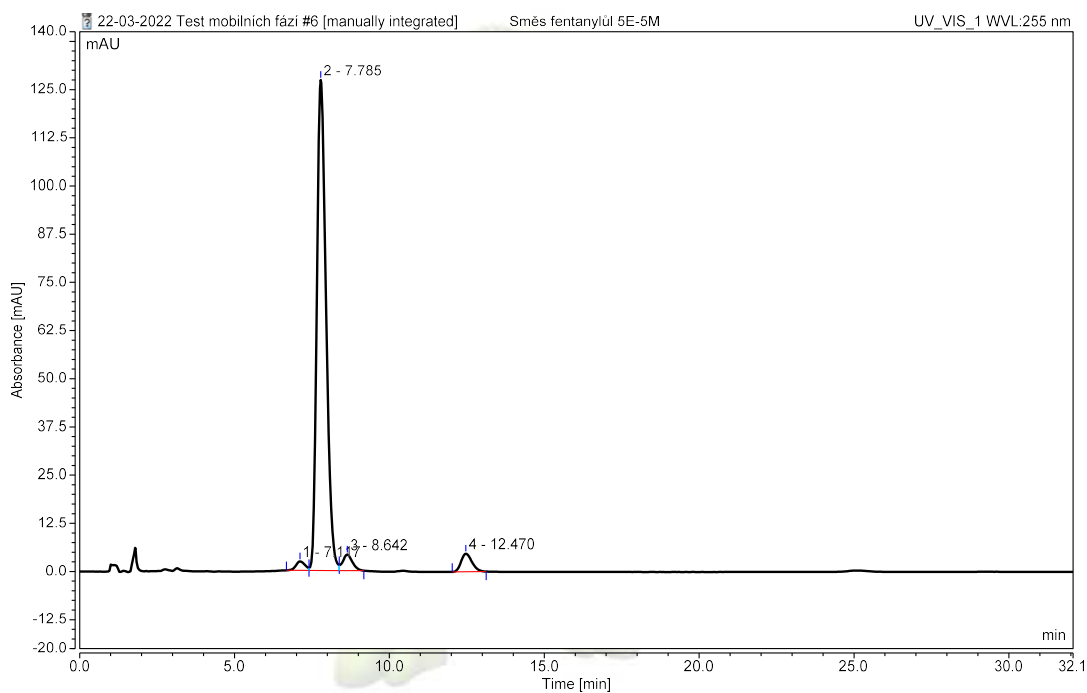
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



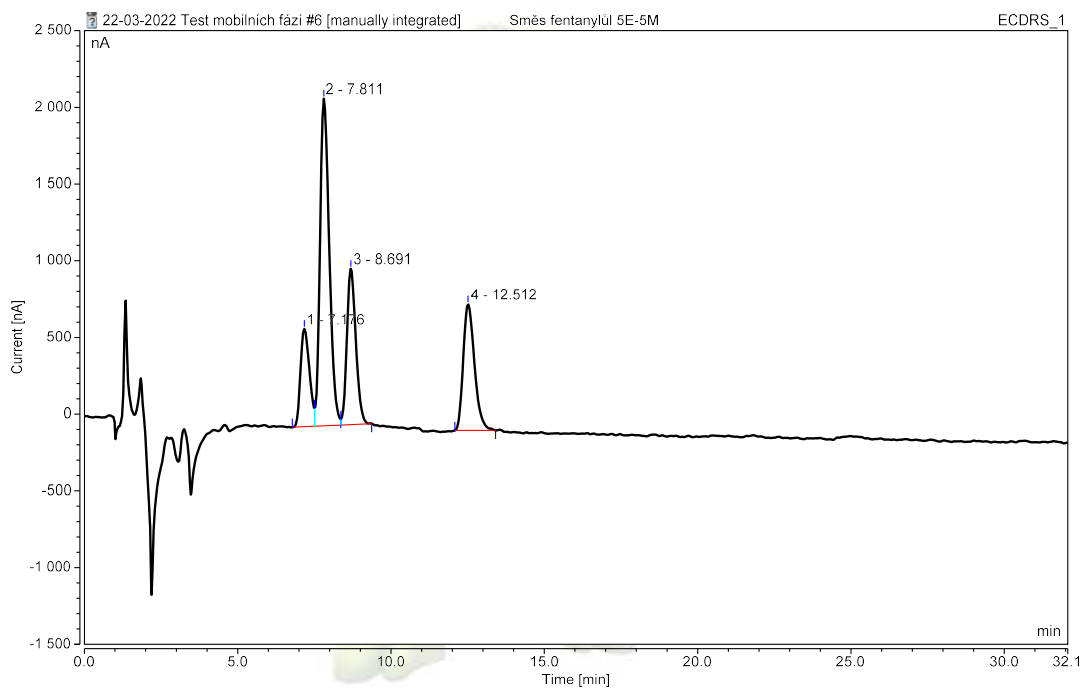
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek J.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C18, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (56 : 44), průtok: 0,4 ml/min.

Příloha K



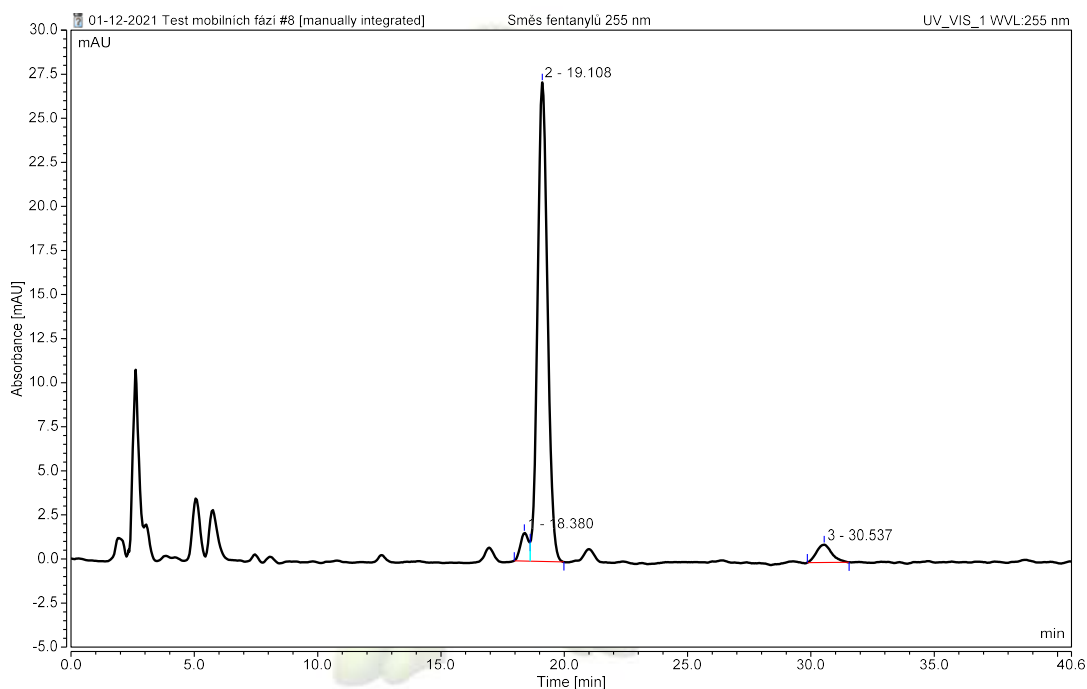
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



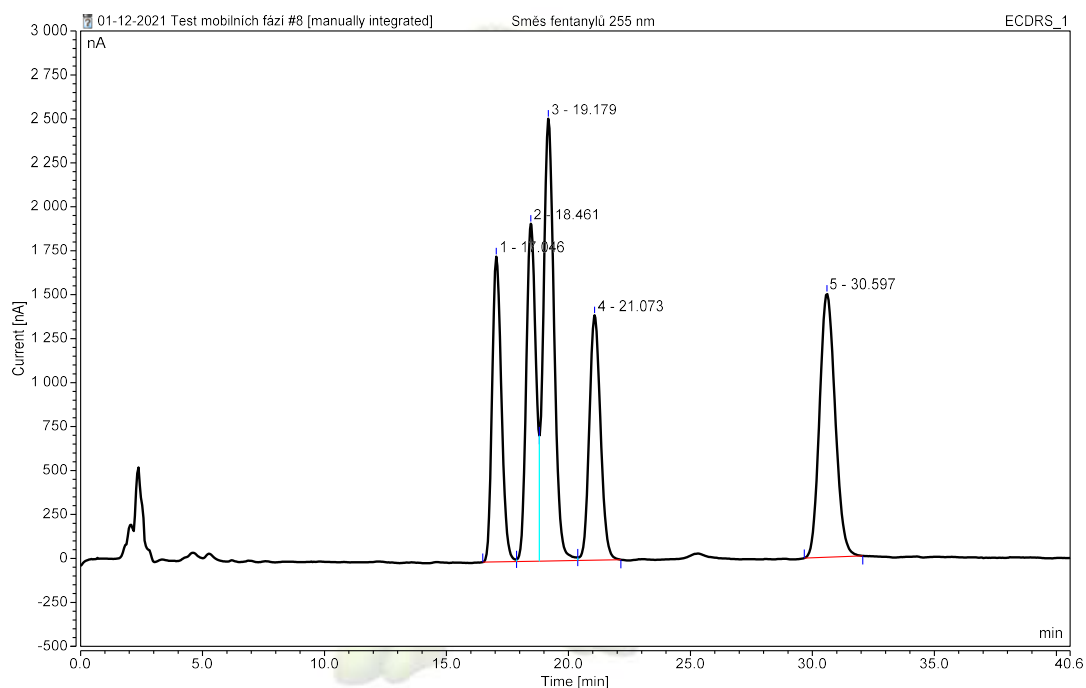
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek K.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (52 : 48), průtok: 1,2 ml/min.

Příloha L



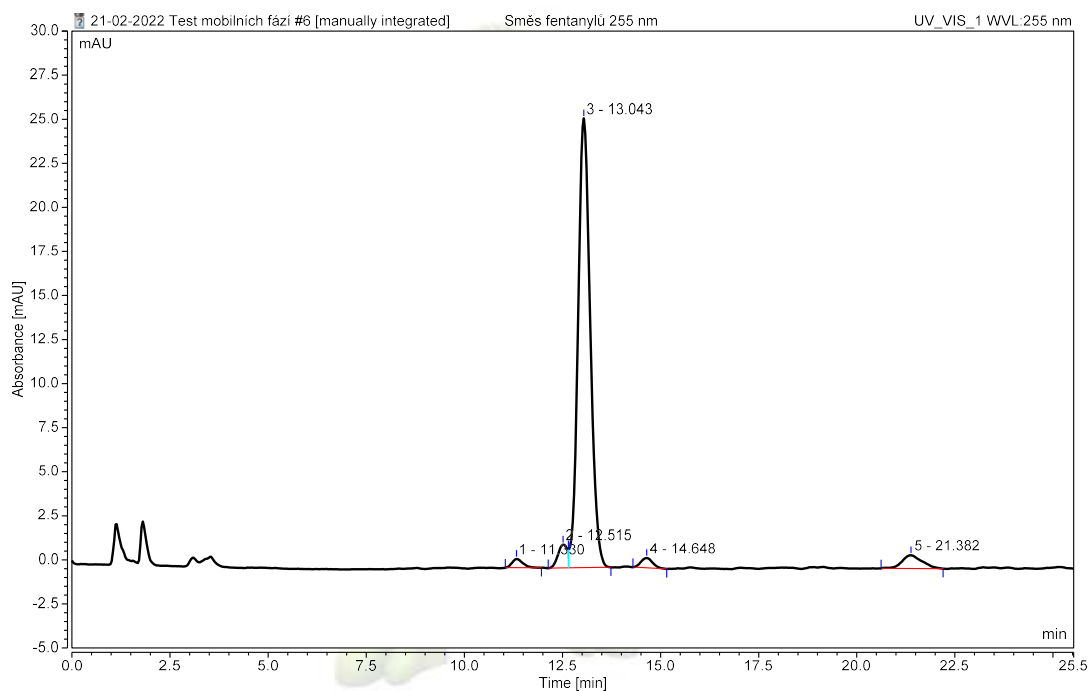
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



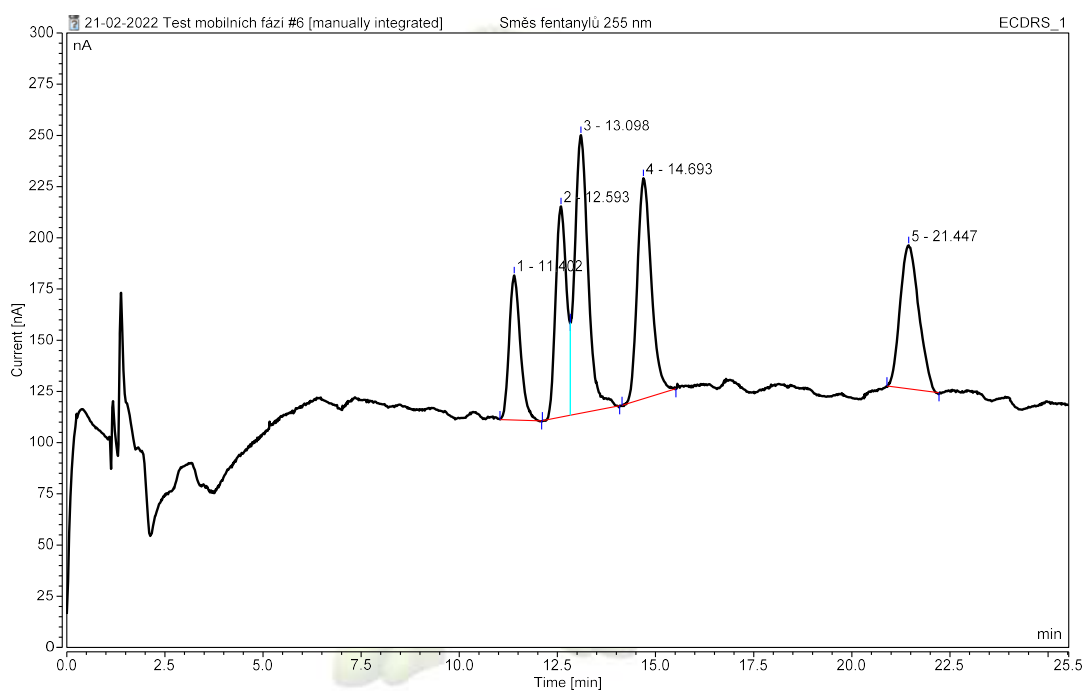
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek L.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (54 : 46), průtok: 0,7 ml/min.

Příloha M



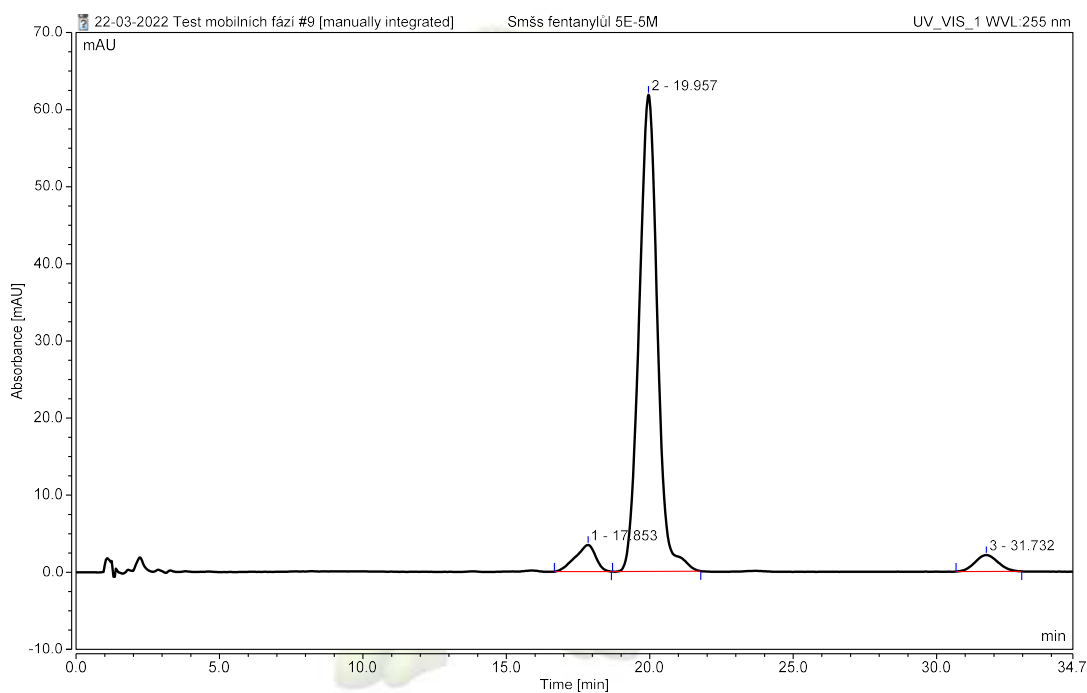
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



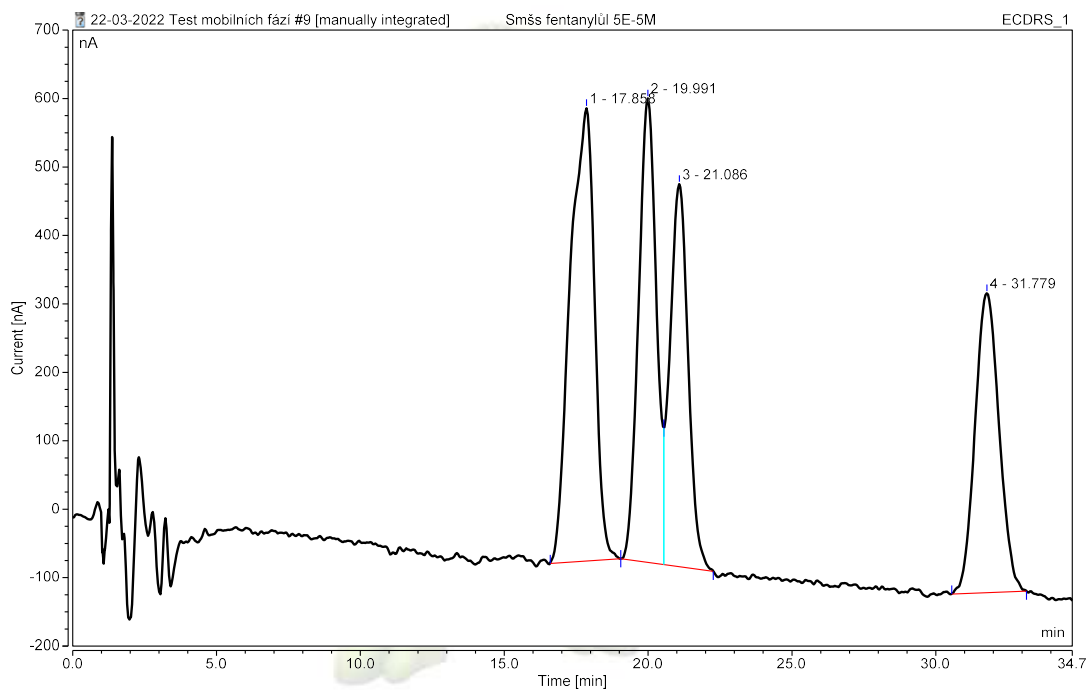
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek M.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (56 : 44), průtok: 1,2 ml/min.

Příloha N



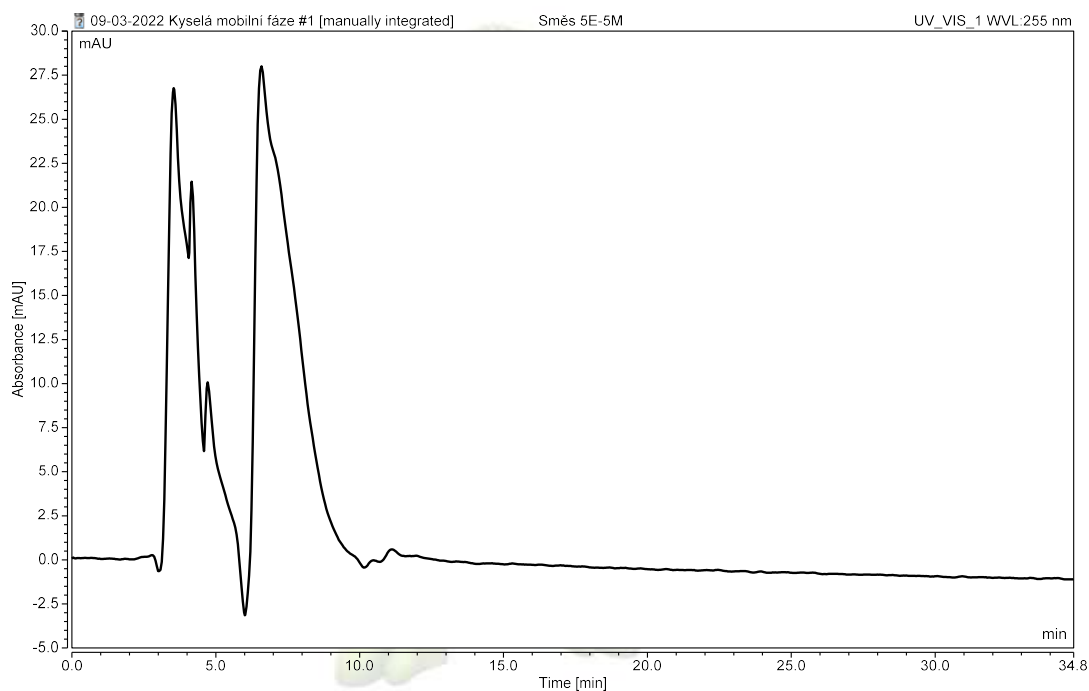
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



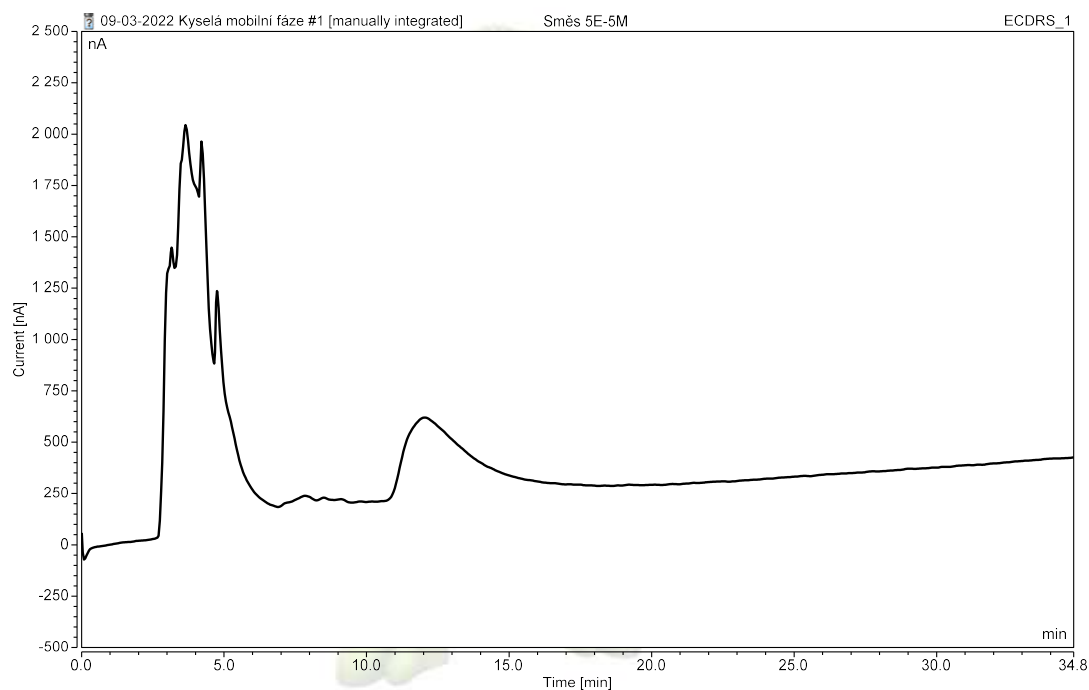
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek N.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C8, mobilní fáze: $0,05\text{M HCOONH}_4 + 0,05\text{M KCl}$, $\text{pH} = 9$: ACN (58 : 42), průtok: 1,2 ml/min.

Příloha O



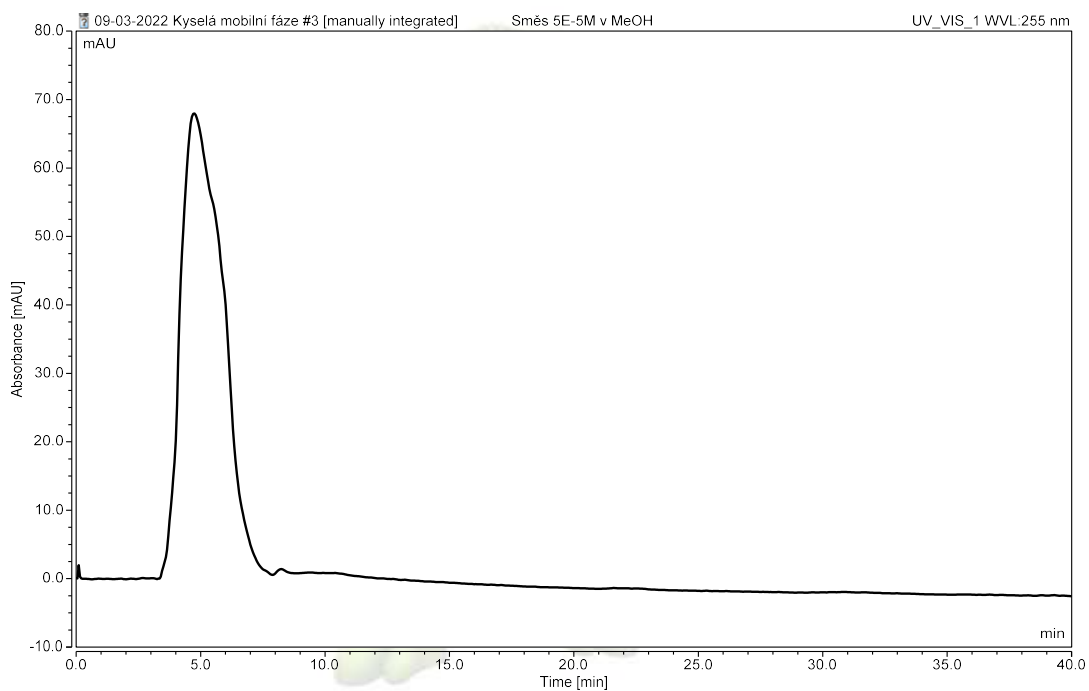
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



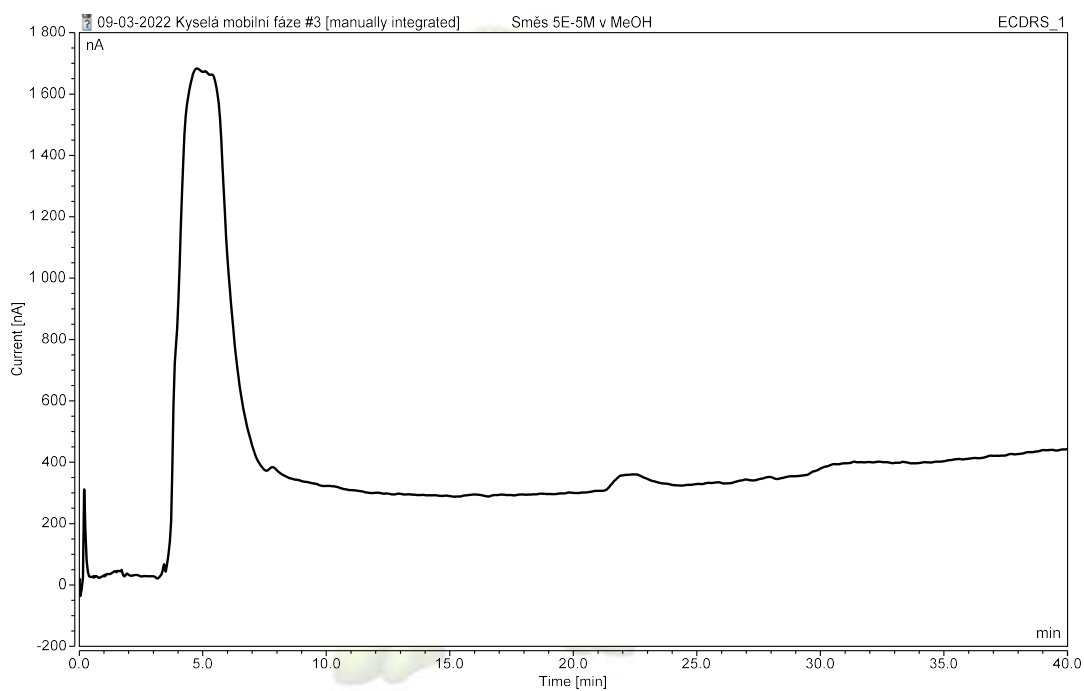
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek O.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: C8, mobilní fáze: MeOH : H₂O : CH₃COOH; 10 : 89 : 1, průtok: 0,5 ml/min.

Příloha P



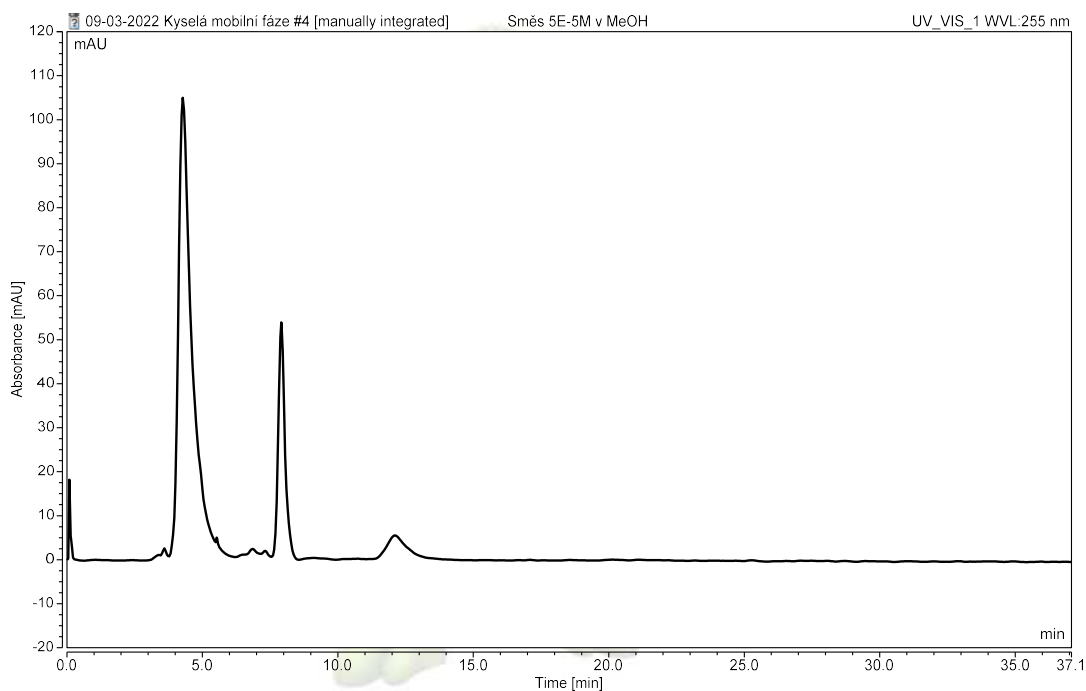
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



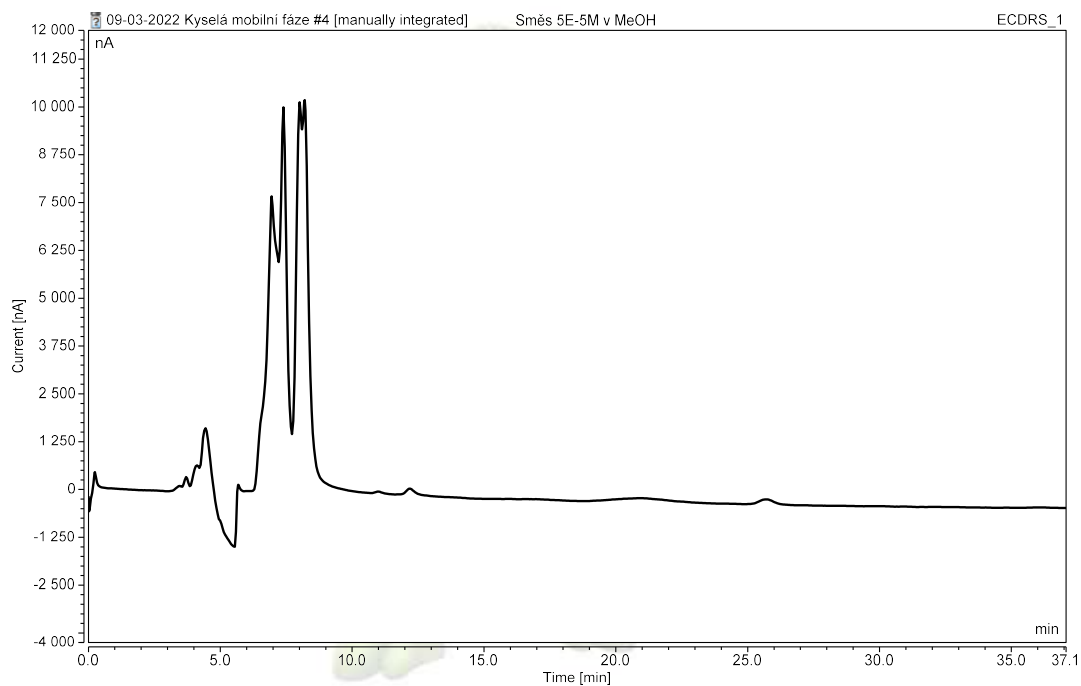
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek P.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: CN^- , mobilní fáze: $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$; 10 : 89 : 1, průtok: 0,5 ml/min.

Příloha Q



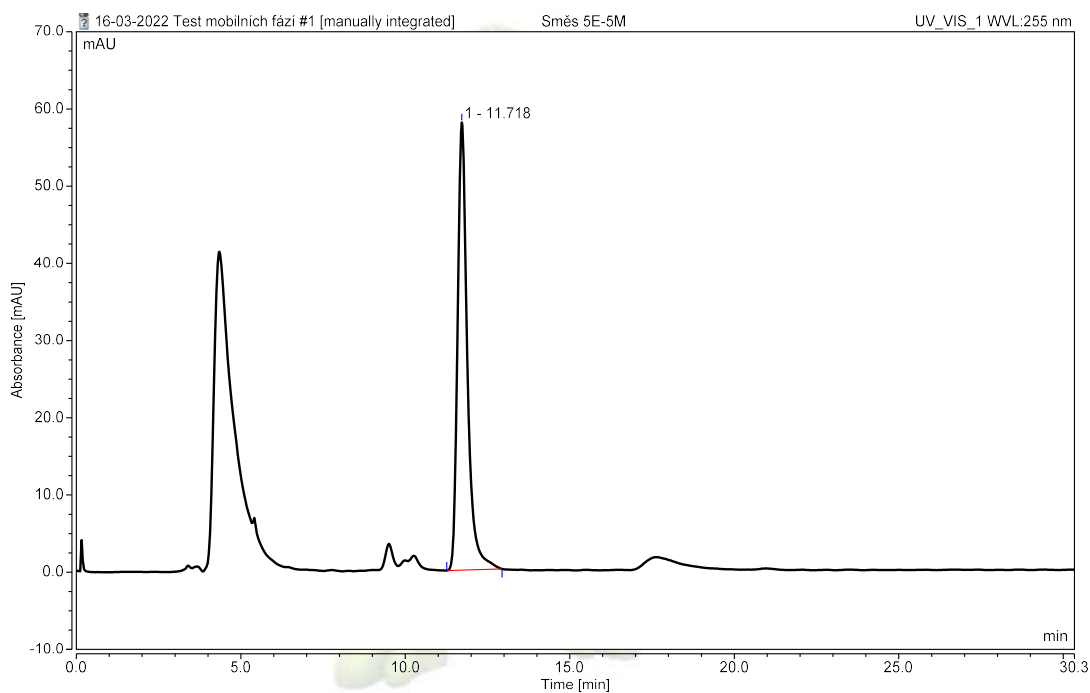
(a) UV detekce, $\lambda = 255 \text{ nm}$



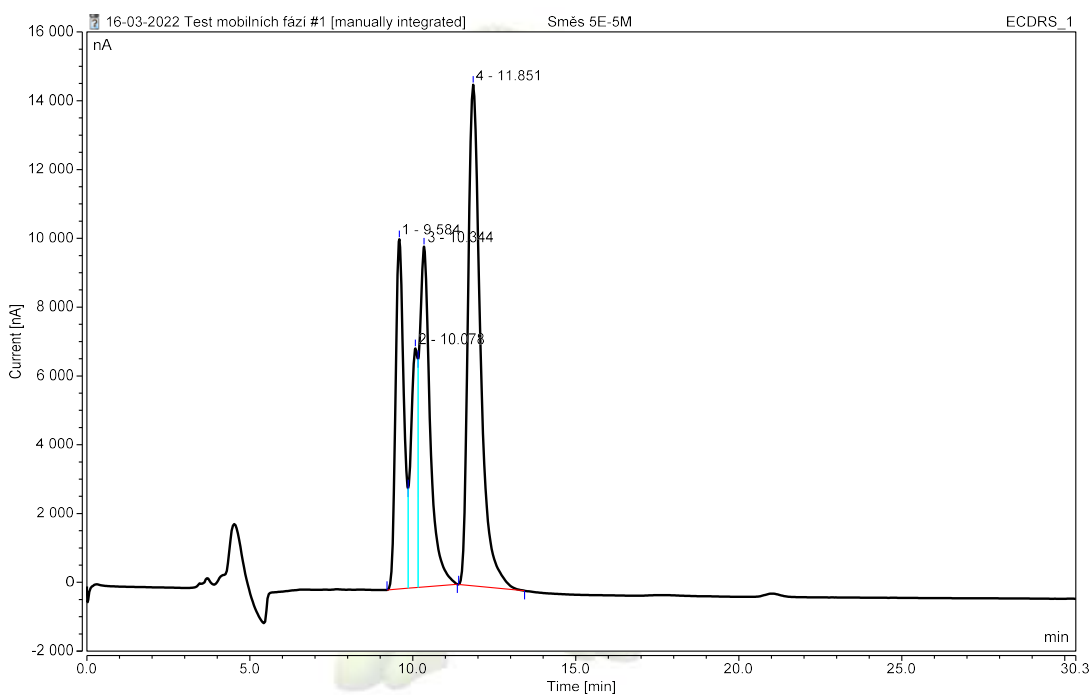
(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95 \text{ V}$

Obrázek Q.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$). Kolona: CN^- , mobilní fáze: $0,05\text{M HCOONH}_4 + 0,05\text{M KCl}$, $\text{pH} = 9$: ACN (58 : 42), průtok: $0,5 \text{ ml/min}$.

Příloha R



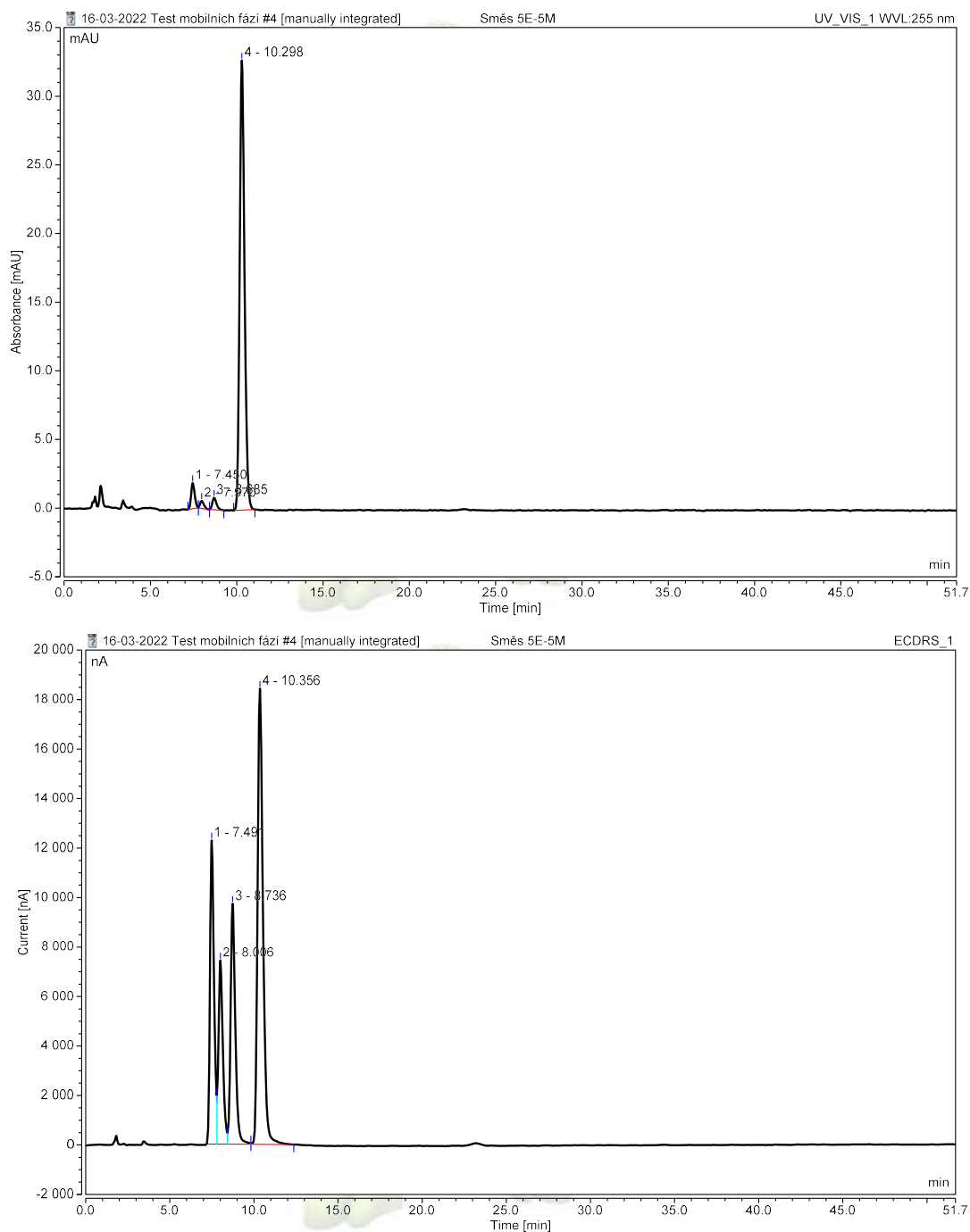
(a) UV detekce, $\lambda = 255$ nm



(b) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek R.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: CN^- , mobilní fáze: 0,05M HCOONH_4 + 0,05M KCl , pH = 9 : ACN (64 : 36), průtok: 1,2 ml/min.

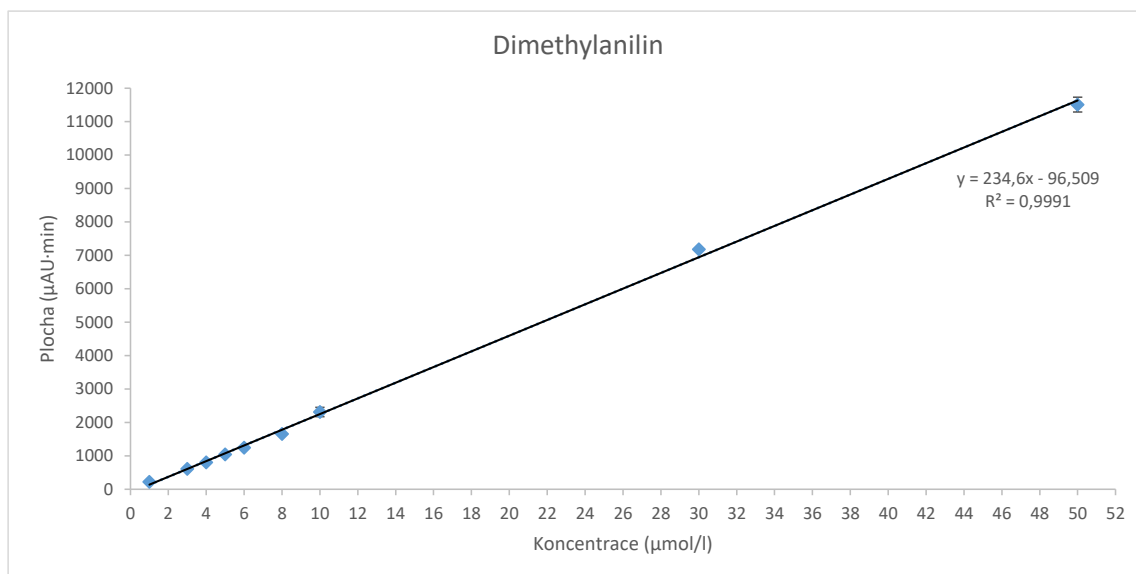
Příloha S



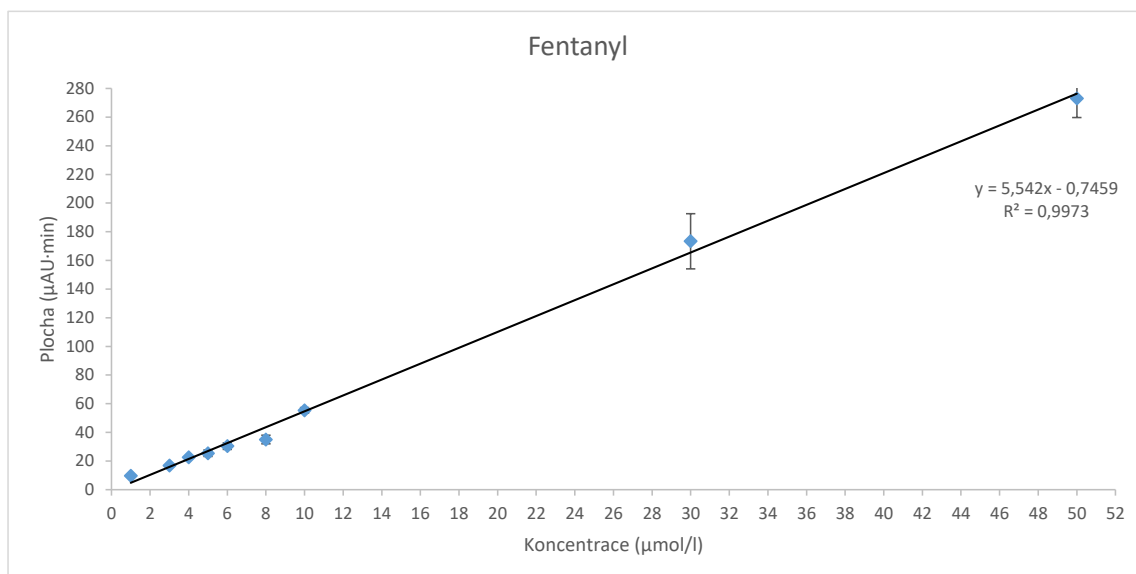
(a) Elektrochemická detekce, $E = +0,95$ V

Obrázek S.1: Chromatogram směsi norfentanylu, fentanylu, thiofentanylu, furanylfentanylu, carfentanylu a sufentanylu (koncentrace každého $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kolona: CN^- , mobilní fáze: 0,05M HCOONH_4 + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (70 : 30), průtok: 1,0 ml/min.

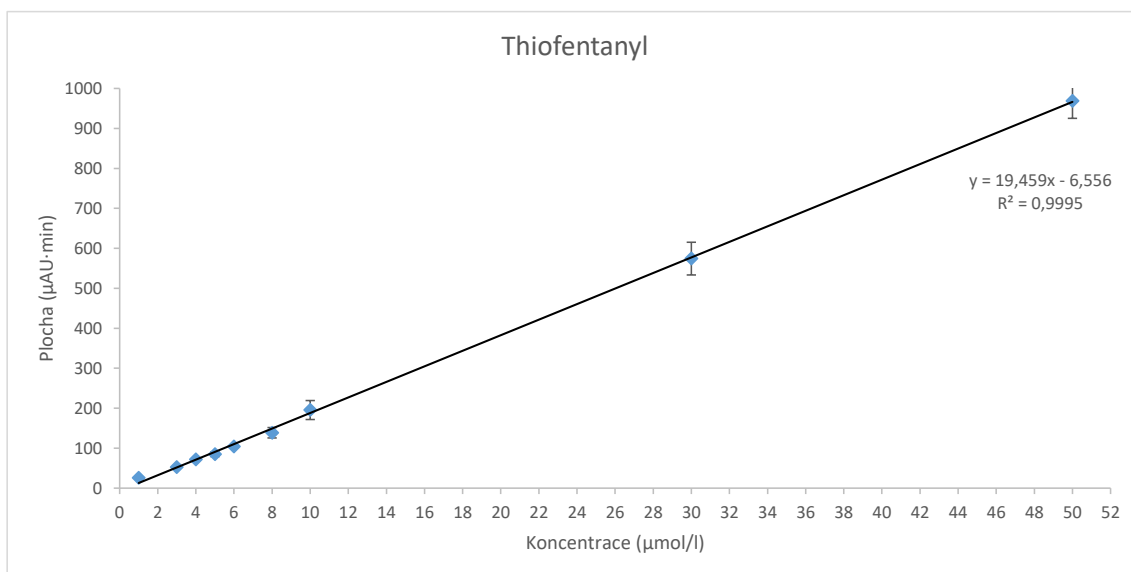
Příloha T



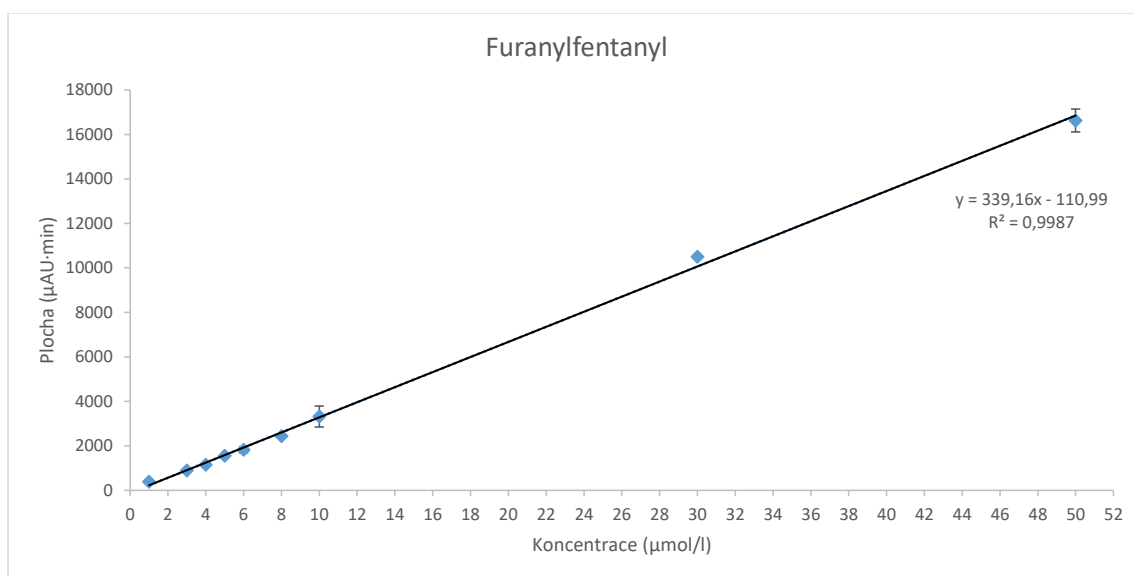
Obrázek T.1: Závislost plochy píku na koncentraci pro DMA při UV detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



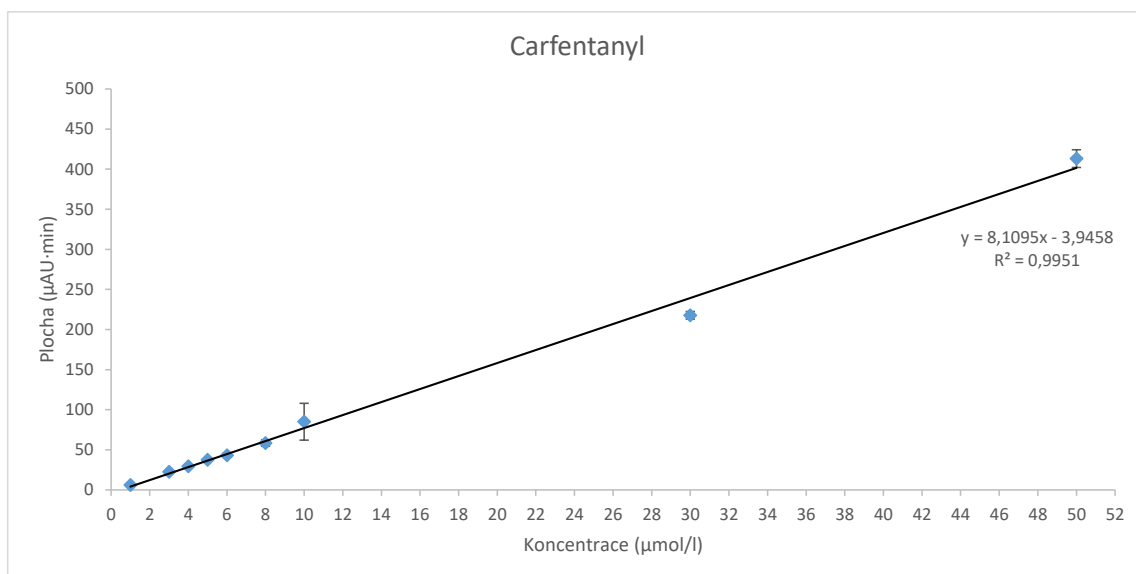
Obrázek T.2: Závislost plochy píku na koncentraci pro fentanyl při UV detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



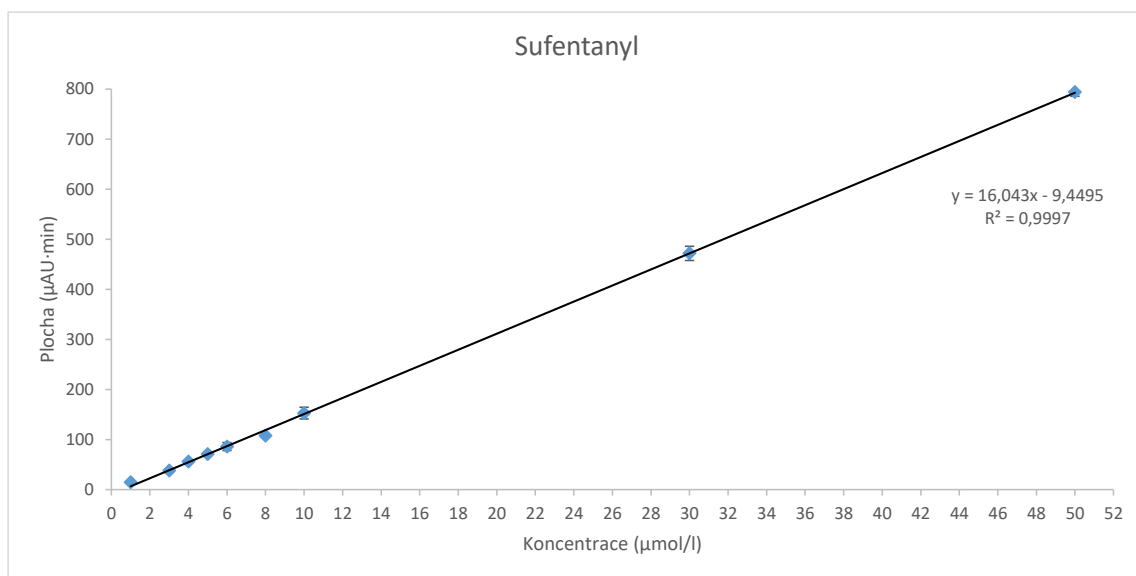
Obrázek T.3: Závislost plochy píku na koncentraci pro thiofentanyl při UV detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



Obrázek T.4: Závislost plochy píku na koncentraci pro furanylfentanyl při UV detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.

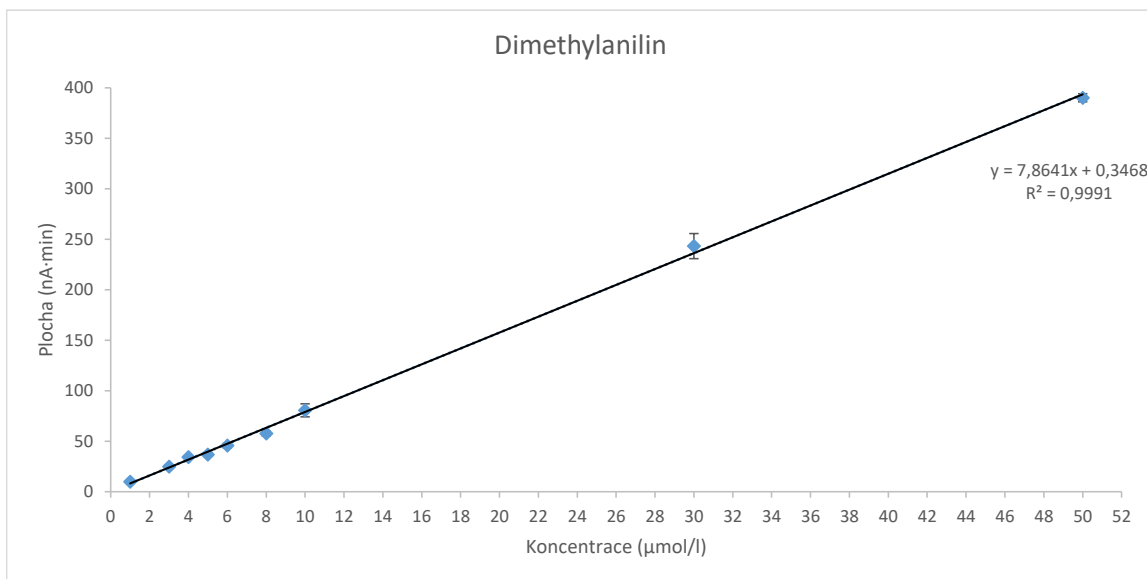


Obrázek T.5: Závislost plochy píku na koncentraci pro carfentanyl při UV detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.

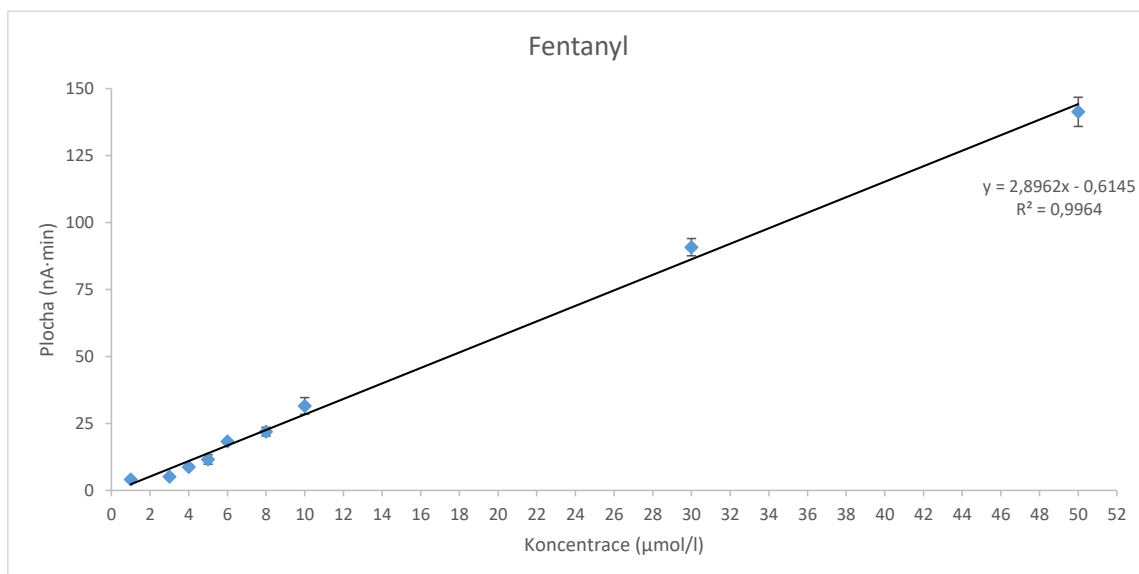


Obrázek T.6: Závislost plochy píku na koncentraci pro sufentanyl při UV detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.

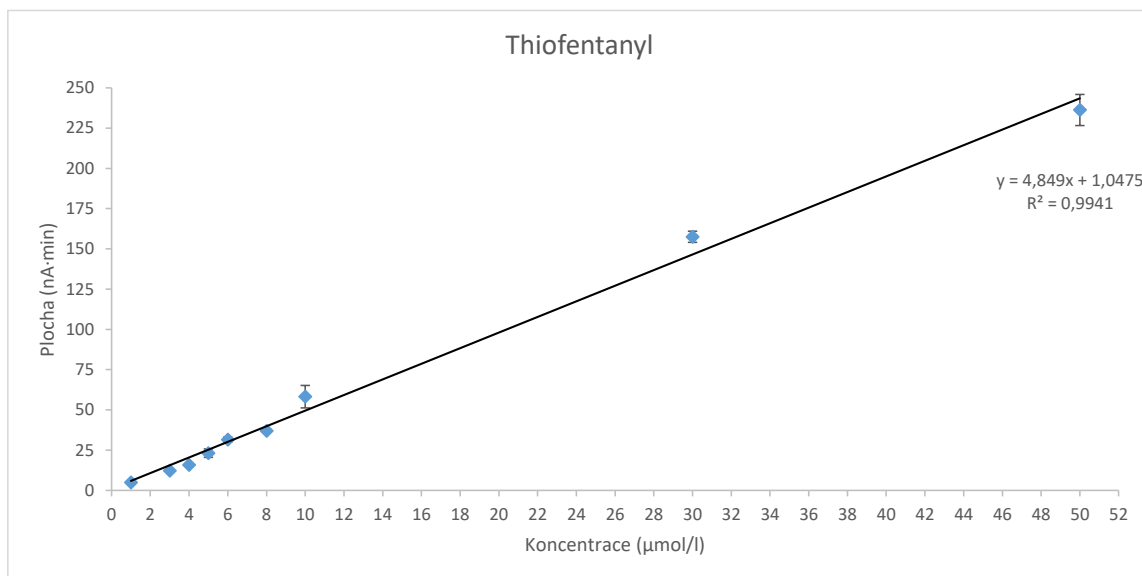
Příloha U



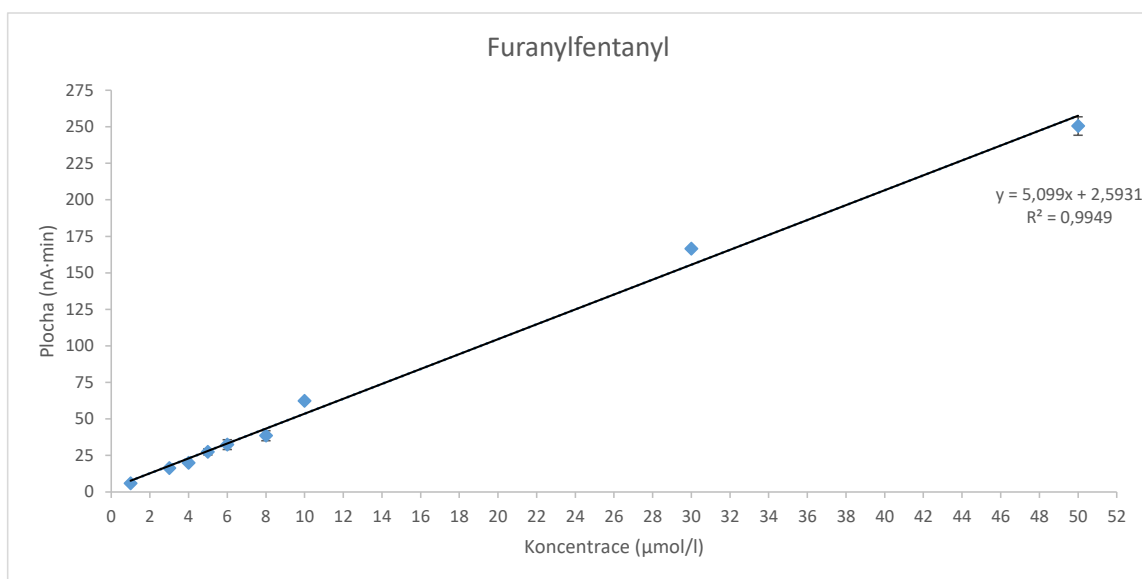
Obrázek U.1: Závislost plochy píku na koncentraci pro DMA při ECD detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



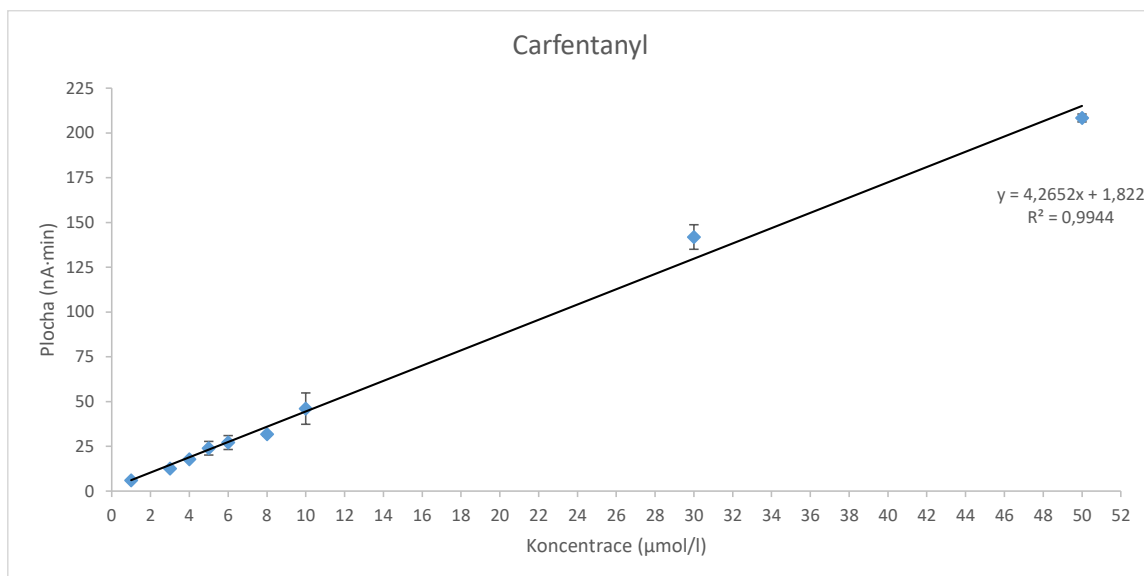
Obrázek U.2: Závislost plochy píku na koncentraci pro fentanyl při ECD detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



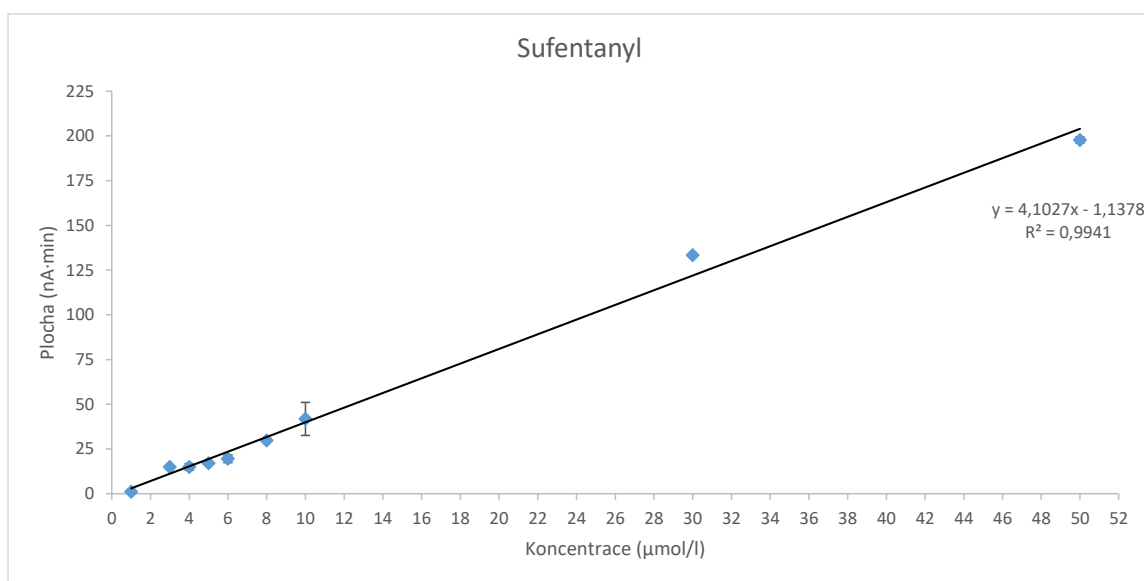
Obrázek U.3: Závislost plochy píku na koncentraci pro thiofentanyl při ECD detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



Obrázek U.4: Závislost plochy píku na koncentraci pro furanylfentanyl při ECD detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



Obrázek U.5: Závislost plochy píku na koncentraci pro carfentanyl při ECD detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.



Obrázek U.6: Závislost plochy píku na koncentraci pro sufentanyl při ECD detekci. Kolona: C8, mobilní fáze: 0,05M HCOONH₄ + 0,05M KCl, pH = 9 : ACN (57 : 43), průtok: 1,2 ml/min.