

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Studium elektrochemických přeměn nových
syntetických drog**

Diplomová práce

Jméno autora: Bc. Jan Albrecht
Studijní obor: Analytická chemie
Vedoucí práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok: 2018/2019

Olomouc 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Jany Skopalové, Ph.D., a použil pouze podklady uvedené v příloženém seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne

.

Vlastnoruční podpis autora

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí své diplomové práce, paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D., za její věcné a odborné rady a zároveň i čas, který mi při vypracování této práce věnovala, a především za její velkou trpělivost.

Velký dík patří i doc. RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D., za proměření produktů elektrolýzy pomocí HPLC-MS.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení:	Bc. Jan Albrecht
Název práce:	Studium elektrochemických přeměn nových syntetických drog
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí Práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Anotace

Práce pojednává o problematice analýzy nových, velmi nebezpečných psychotropních látek ze skupiny fentanylů. Teoretická část je zaměřena na farmakologii a metody chemické analýzy těchto látek. Cílem předložené diplomové práce bylo vyvinout metodu pro separaci a kvantifikaci fentanylu a jeho derivátů furanylfentanylu a sufentanilu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS a elektrochemickou detekcí (HPLC-UV/VIS-ECD). Součástí vývoje metody bylo testování meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Hodnoty LOD byly pro fentanyl a jeho deriváty v řádu desítek ng/ml pro ECD detekci, zatímco pro UV/VIS detekci byla LOD v řádu stovek ng/ml. Dále se práce zabývá studiem elektrochemických přeměn vybraných psychotropních látek při jejich anodické oxidaci. Produkty elektrolýzy byly analyzovány jednak kapalinovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC-MS), jednak pomocí on-line spojení elektrochemie a hmotnostní spektrometrie (EC-MS). Na základě analýzy kolizních spekter byly navrženy struktury oxidačních produktů. Hlavními produkty elektrochemických přeměn všech vybraných derivátů fentanylu byly jejich N-dealkylované analogy.

Klíčové slova: HPLC-UV/VIS-ECD, HPLC-MS, EC-MS, psychotropní látky

Bibliographical identification

First name and surname:	Bc. Jan Albrecht
Title:	Study of Electrochemical Transformations of New Designer Drugs
Type of thesis:	Master's
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Anotation

The Thesis deals with the issue of new and dangerous psychotropic drugs from the group of fentanyl and their analysis. The theoretical section is focused on pharmacology and methods of chemical analysis of the new psychotropic substances. The goal of this thesis was to develop a method providing separation and quantification of fentanyl and its derivatives furanylfentanyl and sufentanil with the aid of high-performance liquid chromatography with UV/VIS and electrochemical detection (HPLC-UV/VIS-ECD). The development of the method included determination of the detection limit (LOD) and the limit of quantification (LOQ). LOD values were in the order of tens of ng/ml for fentanyl and its derivatives for ECD detection. For UV/VIS detection, LOD values were in the order of hundreds of ng/ml. The Thesis also deals with the study of electrochemical transformation of selected psychotropic drugs during anodic oxidation. The electrolysis products were analysed by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection (HPLC-MS) and on-line coupling of electrochemistry with mass spectrometry (EC-MS). Based on collision spectra analysis, structures of oxidation products were proposed. The main products of the electrochemical transformations of all studied fentanyl derivatives were their N-dealkylated analogs.

Key words: HPLC-UV/VIS-ECD, HPLC-MS, EC-MS, psychotropic drugs

Obsah

1	Teoretická část.....	1
1.1	Úvod.....	1
1.2	Farmakologie	1
1.2.1	Farmakokinetika.....	2
1.2.2	Farmakodynamika.....	4
1.3	Opioidy	6
1.3.1	Fentanyl.....	6
1.3.2	Furanylfentanyl	9
1.3.3	Sufentanil	11
1.4	Analytické stanovení fentanylu a jeho derivátů.....	12
1.4.1	Extrakce.....	12
1.4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	13
1.4.3	Hmotnostní spektrometrie	16
1.4.4	Voltametrie.....	19
2	Experimentální část.....	21
2.1	Materiály a chemikálie.....	21
2.1.1	Chemikálie	21
2.1.2	Materiál a přístroje	21
2.1.3	Příprava roztoků.....	22
2.1.4	Příprava elektrody	22
2.1.5	Voltametrie 2-[(furan-2-karbonyl)(methyl)amino]benzoové kyseliny a fentanylů	23
2.1.6	Měření závislosti na rychlosti skenu	23
2.1.7	Elektrolýza fentanylu a jeho analogů.....	24
2.1.8	Optimalizace ESI-MS v závislosti na teplotě.....	24
2.1.9	Identifikace produktů po elektrolýze pomocí HPLC-MS	24

2.1.10	Metoda stanovení pomoci HPLC-UV-ECD.....	25
2.1.11	On-line spojení EC-MS pro vybrané deriváty fentanylu	25
3	Výsledky a diskuze.....	26
3.1	Furanylfentanyl	30
3.2	Výsledky fentanylu	32
3.3	Sufentanil	35
4	Závěr.....	40
5	Seznam zkratk	42
6	Literatura	44
7	Přílohy	47

1 Teoretická část

1.1 Úvod

Návykové, též psychotropní, látky, jsou substance, které cíleně ovlivňují fyziologické chování organismu tím, že působí v drtivé většině na receptory, případně na iontové kanálky, a vyvolávají tak změny kognitivních a behaviorálních funkcí mozku. Ve většině případů navozují zvýšení počtu daných receptorů nebo alterace jejich funkcí, čímž rozvíjí toleranci pro danou látku nebo i abúzus a závislost na dané noxe. Návykovost látek je schopnost chemických látek způsobovat v organismu změny, jež se projevují zvýšením nebo snížením počtu receptorů, popř. jejich změnou nebo změnou metabolických drah. V neposlední řadě se návykovost projevuje změnou psychického vnímání daného člověka [1].

Deriváty návykových látek jsou ale nedílnou součástí léčebného arzenálu řady medicínských oborů s využitím především v léčbě chronických bolestí nebo jako součást analgosedace a v neposlední řadě recentně, a to v terapii řady neurologických a psychiatrických onemocnění. Nejčastěji se návykové látky rozdělují z pohledu legálnosti, stupně afinity k rozvoji závislosti a taktéž na látky přírodního nebo syntetického původu. Mezi psychotropní látky s relativně nízkou návykovostí jsou zařazovány např. kanabinoidy. Do skupiny vysoce návykových látek, schopných vyvolat závislost již po první dávce, se řadí například heroin, kokain nebo nově pozorované kombinace s cenově podstatně levnějším furanylfentanylem, jehož smísení s heroinem vede ke zvýšení omamného účinku drogy a zároveň zvýšení zisků daného distributora. Dále lze třídit xenobiotika podle toho, zda jsou dané látky přírodního nebo syntetického původu [1].

1.2 Farmakologie

Předmětem zkoumání vědního oboru farmakologie je strukturální charakteristika a metabolismus látek s účinkem na živé organismy a jejich exkrece. Obor se obecně rozděluje na farmakokinetiku, která popisuje reakce organismu na dané xenobiotikum, a na farmakodynamiku, která naopak popisuje působení xenobiotik na organismus [2, 3].

1.2.1 Farmakokinetika

Farmakologie popisuje a zkoumá biologicky aktivní látky z hlediska dynamických dějů, a to od jejich podání, působení až k exkreci z organismu. Průnik xenobiotik do organismu a jejich následná farmakologická aktivita závisí především na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, místě jejich absorpce do organismu a na charakteristice kontaktu s cílovou strukturou, který nejčastěji probíhá skrze příslušný receptor podané látky. Změny biologické aktivity organismu jsou podmíněny vektorovým ovlivněním příslušných metabolických kaskád, jež jsou spouštěny modulací aktivity takto aktivovaného receptoru. Poté následuje postupné vymizení aktivity podané látky a její exkrece z organismu [1, 3, 4].

Vstřebávání xenobiotika do organismu – efektivita a rychlost působení – jsou určeny zejména místy průniku z místa podání do krevního oběhu směrem k cílové struktuře v organismu. Rychlost absorpce závisí na způsobu a místě podání. Čím je dané místo prokrvenější, tím rychleji se daná látka dostává do oběhu. Způsoby vstupu látky do organismu jsou perorální, inhalační, per rektální a injekční – subkutánní nebo intravenózní [4, 5].

Distribuce daného xenobiotika v organismu závisí na struktuře, molární hmotnosti a rozdělovacím koeficientu mezi lipofilní a lipofóbní fázi. Tyto vlastnosti ovlivňují způsoby průniku xenobiotika spontánním transmembránovým průnikem nebo některým z transportních mechanismů. Buňky jsou ohraničeny lipidovou dvojrůstvou, do níž jsou vsazeny membránové bílkoviny, které vytváří specifické struktury zajišťující selektivní průchod pouze látkám určitého typu anebo vytvářejí komplikované kanalikulární struktury pro transport podané molekuly intracelulárně. S tím souvisí biologická dostupnost neboli vztah udávající procentové zastoupení z celkové podané dávky, které se dostane do organismu a vyvolá efekt [6, 7].

K základním mechanismům pronikání xenobiotik do organismu patří pasivní difuze, usnadněná difuze, způsoby aktivního transportu biologickou membránou a endocytóza. Endocytóza je proces vchlípení větších molekul přes biomembrány – tento transport je určen zejména pro distribuci cílených léčiv [8, 9].

Pasivní difuze, která k transportu nevyžaduje energii, umožňuje průnik molekul membránou do nitra buněk dle koncentračního gradientu. Uplatňuje se u neionizovaných forem xenobiotik, jež mají dostatečně vysokou lipofilní charakteristiku a molární hmotnost do 150 Da. Látky s větší molární hmotností mohou membránami pronikat pouze za předpokladu, že jsou dostatečně lipofilní. Takto mohou difundovat látky jako kyslík, voda, oxid uhličitý, báze, popř. kyseliny, u nichž je postup značně omezen s ohledem na jejich

disociační stupeň. Látky kyselejšího charakteru se vstřebávají zpravidla v žaludku, bazické látky naopak ve střevech [5, 10].

Usnadněná difuze umožňuje přenášet látky s nízkým rozdělovacím koeficientem a dobrou rozpustností ve vodě. Tento druh transportu je zprostředkován tzv. přenašeči – „carriers“. Vzniklý komplex carrier–xenobiotikum tak snadno proniká buněčnou membránou a po následné disociaci komplexu vyvolává podaná látka příslušný účinek [4, 5, 10].

Aktivní transport se podobá usnadněné difuzi, ale prostup semipermeabilní buněčnou membránou probíhá proti koncentračnímu gradientu a elektrochemickému potenciálu. Stává se energeticky náročným a je nutné dodávat energii štěpením ATP [4, 10, 11].

Předposledními a posledními fázemi přítomnosti xenobiotik v organismu jsou eliminace a exkrece. Eliminací jsou xenobiotika metabolizována metabolickými dráhami na biologicky neaktivní produkty, a tak je ukončeno jejich biologické působení, jež vede ke změnám kognitivního a behaviorálního chování v rámci organismu. Zavádí se tzv. poločas eliminace – veličina poukazující na snížení původní hodnoty koncentrace na její polovinu. Eliminace je prováděna tzv. biotransformací neboli dějem, při kterém organismus pozměňuje strukturu původně nepolárních látek na polární za účelem jejich lepší exkrece z těla. Biotransformace je ovlivněna fenotypem, zdravotním stavem a věkem daného jednatelce [4, 6, 12, 13].

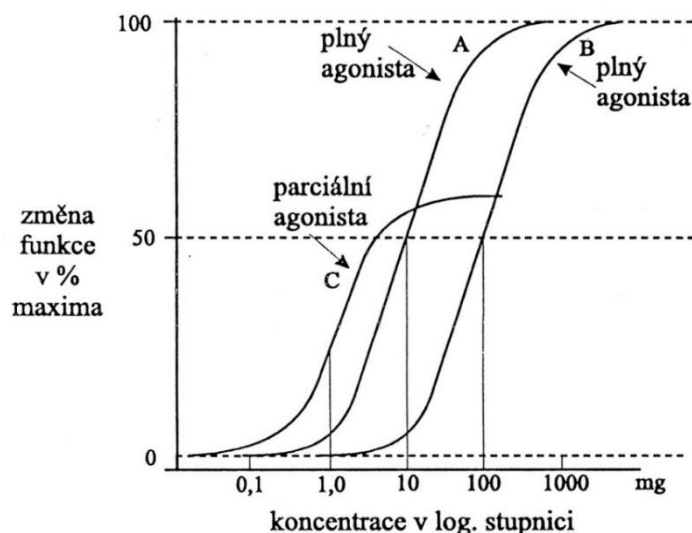
V některých případech dochází v těle po podání exogenních látek k tzv. first pass efektu, kdy je xenobiotikum před proniknutím do krevního systému částečně metabolizováno. Tento efekt probíhá zejména v játrech, plicích nebo střevech. U většiny xenobiotik dochází k biodegradaci, méně častý je výskyt případů, kdy se bioaktivita xenobiotika po metabolismu zvýší. Takové substance nazýváme proléčiva. Biotransformace zahrnuje dvě fáze, I. fáze biotransformace je proces, při kterém jsou xenobiotika redukována, hydrolyzovaná nebo oxidována za účelem zvýšení jejich polarity. V rámci této fáze dochází ke změně toxicity metabolizované látky, jež se obvykle snižuje; v drtivé většině jsou tyto látky enzymaticky katalyzovány jaterním enzymem CYP450 a jeho izoformami. Ve II. fázi biotransformace dochází ke konjugaci vzniklého metabolitu z biotransformace I. fáze. Nejčastějším konjugačním činidlem bývá kyselina glukuronová, jež vzniká z glukózy. Tato reakce je katalyzovaná UDP-glukuronosyltransferasou, kde se metabolit z I. fáze biotransformace váže přes etherovou nebo esterovou vazbu na kyselinu glukuronovou. Výsledný metabolit není schopný opětovného vstřebávání a je játry vyloučen z těla. Poslední fází přítomnosti xenobiotik v těle je exkrece, tedy vylučování vzniklých produktů metabolismu z organismu. Probíhá

na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Hlavní podíl exkrece probíhá v ledvinách, minoritně probíhá za pomoci plic, kdy jsou látky vydechovány, dále pak slinami a potem. Játra jsou při exkreci ovlivněna hepatocyty, zejména jejich enzymovou výbavou, která bývá nejčastěji geneticky předána, dále je určující prokrvení jater, stáří a pohlaví dané osoby [14-16].

1.2.2 Farmakodynamika

Vědní obor farmakodynamika zkoumá působení aktivních farmaceutických substancí na organismus. Mechanismy osudu léčiva a jím vyvolané změny jsou specifické nebo nespecifické. Nespecifický účinek xenobiotik se zakládá na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, především na acidobazických, osmotických a oxidačně-redukčních rovnováhách. Specifický účinek je, dle teorie „zámku a klíče“, vyvoláván jedinečnou vazbou xenobiotika a receptoru. Xenobiotikum musí mít k dosažení biologického účinku adekvátní molekulární strukturu, jež odpovídá konfiguraci daného receptoru. Taková vazba následně mění iontový tok kanalikulárního oddílu vazebného místa anebo aktivuje příslušnou enzymatickou kaskádu přímým či nepřímým způsobem, a to cestou tzv. druhých posílů. Bílkovinné molekuly cytoplazmatické membrány nebo buněčného jádra slouží jako receptory. Interakce specifické molekuly s vazebným oddílem receptoru může vyvolat i účinky nežádoucí, jež jsou definovány jako škodlivé, nebo nezamýšlené reakce normované dávky xenobiotika. Mezi nejdůležitější vlastnosti rozhodující o účinnosti xenobiotika patří schopnost vazby molekuly a daného receptoru, tzv. afinita molekuly a vnitřní aktivita [4, 5, 17, 18].

Obecně bývá uváděno, že antagonisté mají výrazně vyšší afinitu než agonisté. Vnitřní aktivita označuje kvantitativní a přímo úměrnou schopnost dané molekuly pro vyvolání receptorových změn s následnou biologickou odezvou. Podle vnitřních aktivit rozdělujeme xenobiotika na úplné nebo parciální antagonisty a agonisty. Parciální agonisté/antagonisté jsou xenobiotika vyvolávající v závislosti na vnitřní afinitě menší účinek než jejich varianty s plným účinkem (obrázek č. 1). K vyvolání shodného efektu, tedy k vyvolání shodného biologického účinku, je v případě parciálních forem xenobiotik nutno podat organismu mnohem větší dávku [19, 20].



Obrázek 1-Grafické znázornění rozdílů mezi plnými a parciálními agonisty [19]

Antagonisté – látky, které zpravidla nevyvolávají účinek, jelikož se jejich vnitřní aktivita přibližuje nulovým hodnotám – tedy pouze inhibují vazbu agonisty na daný receptor. Antagonisty dělíme na dva typy podle druhu kompetence na daném receptoru. Prvním typem je tzv. kompetitivní antagonist s reverzibilní vazbou na receptor a zpravidla nulovou vnitřní afinitou. Kompetence je v tomto případě závislá na koncentraci antagonistů a agonistů v daném systému. Jsou-li v systému zastoupeni i tito kompetitivní antagonisté, je pro dosažení adekvátního biologického účinku nutno zvýšit koncentraci agonistů v závislosti na afinitě daných xenobiotik. Druhým typem je tzv. nekompetitivní antagonist, jenž se váže na receptor ireverzibilně, přičemž způsobuje jeho nezvratnou blokáci [17, 20, 21].

V neposlední řadě je nutné dbát na terapeutický index. Jedná se o poměr dávky xenobiotika, který je schopný vyvolat intoxikaci organismu (TD_{50}) k minimální efektivní dávce (ED_{50}). Čím má dané xenobiotikum menší terapeutický index, tím se stává rizikovějším k předávkování. V minulosti byly právě např. barbituráty nahrazeny modernějšími benzodiazepiny, které mají větší terapeutický index, udává se, že diazepam má terapeutický index 100. Látky s velmi nízkým terapeutickým indexem, např. warfarin, je nutno monitorovat pro dosažení léčebné dávky a současné ochrany daného uživatele před intoxikací [1, 2, 4, 16, 22].

1.3 Opioidy

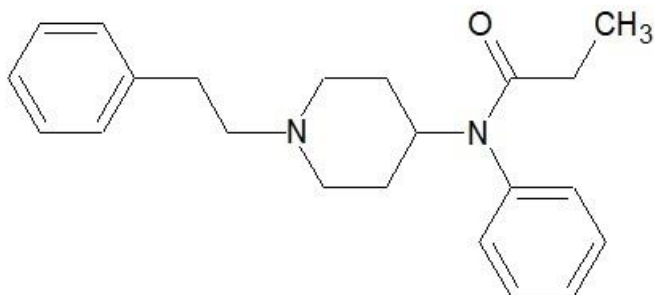
Opioidy jsou látky, jež se vážou na opioidní receptory. Jsou děleny na přírodní, k nimž se řadí např. morfin nebo kodein; semisyntetické a syntetické, kam spadají látky typu fentanylu a jeho deriváty, nebo např. tramadol aj. Obecnou vlastností těchto xenobiotik je, že s rostoucím časem taktéž narůstá tolerance s nutností navyšovat dávky pro vyvolání žádoucího účinku, ať už daná osoba zneužívá některý z opioidních derivátů v rámci abusu, nebo jsou tyto látky užívány pro analgetizaci nebo analgosedaci. Distribuce opioidů je zprostředkována vázáním na plasmatické proteiny, zejména albumin a γ -globulin. Opioidy jsou problematické tím, že přecházejí přes hematoencefalickou bariéru, která odděluje krev mozku od ostatního těla, a tím slouží jako ochranná bariéra mozku. Z důvodu vysoké lipofility jsou opioidy schopny proniknout do mozku, kde vyvolávají účinky. Následující podkapitoly přiblíží pouze vybrané opioidy, např. právě ty nejběžnější používané k terapii při odvykání, případně při předávkování, – inhibitory opioidních receptorů, např. naloxon. Naloxon, opioidní antagonist s nejvyšší afinitou na μ -receptory, však zároveň blokuje δ -receptory a κ -receptory. Látky níže uvedené spadají do kategorie „vysoce potentní návykové látky kategorie II.“ dle FDA [2, 7, 16].

Některé opioidy mohou vyvolat tzv. serotoninový syndrom. Jedná se o zvýšenou hladinu těchto neurotransmiterů v důsledku zvýšené syntézy a aktivace příslušných receptorů a následnou inhibici zpětné absorpce serotoninu, přestože opioidy nejsou klasifikovány jako SSRI. Tento syndrom se projevuje zvýšenou tělesnou teplotou, která může dosáhnout až 41 °C; dalšími příznaky jsou zrychlené reflexy, tremor, dilatované pupily, pocení a zvýšené agresivní chování. V současné době neexistuje specifický test na tento syndrom. Všechny látky studované této práci patří do druhé kategorie kontrolovaných látek [23].

1.3.1 Fentanyl

V případě fentanylu se jedná o opioid anilinového typu (obrázek č. 2), který se využívá především v medicíně jako analgetikum a jako součást anestezie, zejména při pokročilém nádorovém onemocnění, kdy samotný morfin není dostačující, např. při podávání cytostatik jako paclitaxel. V široké míře přibývá jeho zneužívání, a to jako potentního narkotického analgetika. Z důvodu své vysoké lipofility prochází snadno přes semipermeabilní buněčné membrány. Udává se, že jeho biologická dostupnost je 92 %. Vykazuje rychlý nárůst účinnosti,

ta má ale velmi krátkou dobu. Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností je shrnut v tabulce č. 1 [24-26].



Obrázek 2-Struktura fentanylu

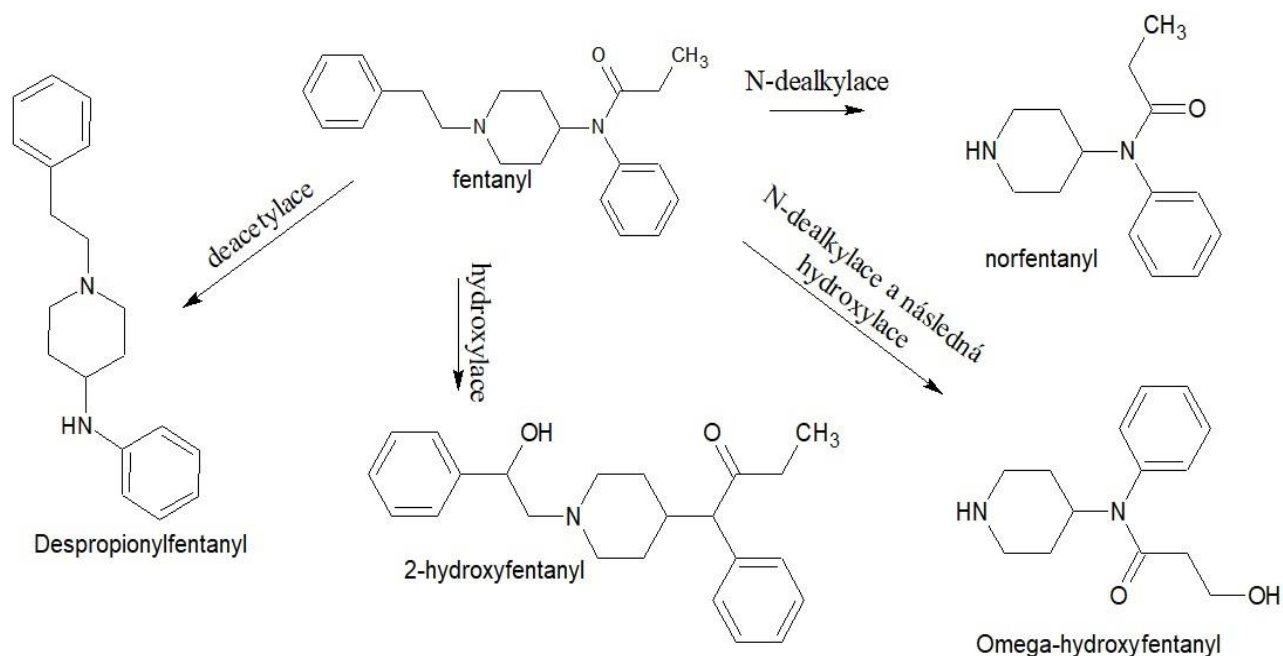
V medicíně se fentanyl využívá zejména k útlumu bolesti při chronických onemocněních a pooperačních bolestech. V České republice spadá do skupiny přísně kontrolovaných látek, jež se vydávají na recept s modrým pruhem. Opakované podávání fentanylu vede k rozvoji tolerance a rozvoji závislosti, kterou doprovází bolest kostí, průjem, úzkost a pocení. Typickým účinkem fentanylu je ospalost, pocit euforie a zúžení pupily. Pocit euforie je nicméně daleko menší než v případě heroínu nebo morfinu. Vedlejším účinkem fentanylu je nejčastěji nevolnost, pocit závratě, zvracení, únava, bolesti hlavy, zácpa a dušnost. Vysoké dávky způsobují smrt v důsledku zástavy dýchání a otoku plic. Další nevýhodou je částečná inhibice kvůli stimulaci μ -opioidních receptorů, přičemž fentanyl stimuluje výměnu GTP na GDP a inhibuje adenylátcyklázu, což má za následek snížení uvolňování neurotransmiterů, jakými jsou např. dopamin, acetylcholin nebo noradrenalin [24, 27, 28].

Tabulka č. 1 – Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností fentanylu [29-32]

Molekulová hmotnost	336,479 g/mol
Teplota tání	84,1 °C
Teplota varu	461,1 °C
Rozpustnost ve vodě	200 mg/dm ³
pKa (hydrochlorid)	8,77
pKa (citrát)	8,43
Log P	4,01
LD ₅₀	3,1 mg/kg

Fentanyl se nejčastěji syntetizuje jako hydrochlorid nebo jako citrát. Od toho se odvíjí různé fyzikálně-chemické vlastnosti, viz tabulka č. 1. Nověji se fentanyl a jeho deriváty zneužívají v kombinaci s heroinem, kokainem, alkoholem a jinými látkami tlumícími CNS, zejména benzodiazepiny. Udává se, že je až 50–100krát více potentní než samotný morfin [1, 4, 33].

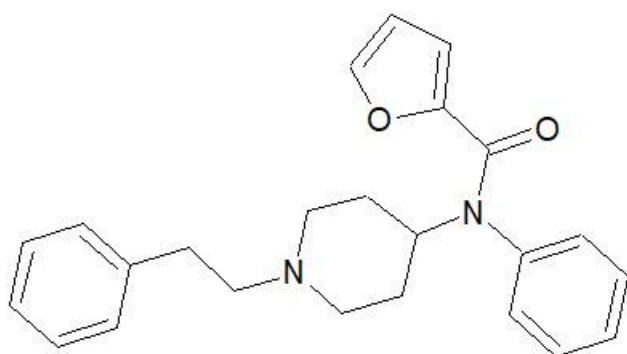
Fentanyl je polyfunkční molekula, jež má mnoho metabolických drah v důsledku toho, že obsahuje fenylový kruh a aromatický amin. Fentanyl se metabolizuje hlavně cytochromem CYP 450 3A4 v I. fázi biotransformace. Metabolická přeměna probíhá zejména v játrech [26, 34]. Fentanyl je majoritně metabolizován enzymem CYP 450 3A4 N-dealkylací na piperidinovém dusíku. Takto vzniká převážně norfentanyl, jenž je biologicky neaktivní a především netoxický. Minoritně – udává se množství menší než 1 % fentanylu – bývá metabolizován zejména na β -hydroxyfentanyl, který si, ač je polárnější než fentanyl, ponechává stejné farmakologické vlastnosti. Dalším minoritním produktem, který lze zachytit mezi metabolity, je např. despropionylfentanyl. Kompletní metabolická dráha je ukázána na obrázku č. 3. Udává se, že *in vitro* je fentanyl metabolizován ze 70 % N-dealkylací za vzniku norfentanylu [25, 34, 35].



Obrázek 3 – Metabolická dráha fentanylu [25, 26, 34]

1.3.2 Furanylfentanyl

Furanylfentanyl je derivát fentanylu (obrázek č. 4), který byl původně syntetizován a patentován roku 1986. Nikdy nebylo prostudován, jaké účinky má tento derivát na lidi. Při studiu vlivů, jež má tato látka na zvířata, se předpokládal podobný účinek, stejně jako v případě jeho analogického derivátu fentanylu, především z toho důvodu, že furanylfentanyl vykazuje obdobné vedlejší účinky. Efektivní dávka tohoto xenobiotika činí 0,02 mg/kg [11].



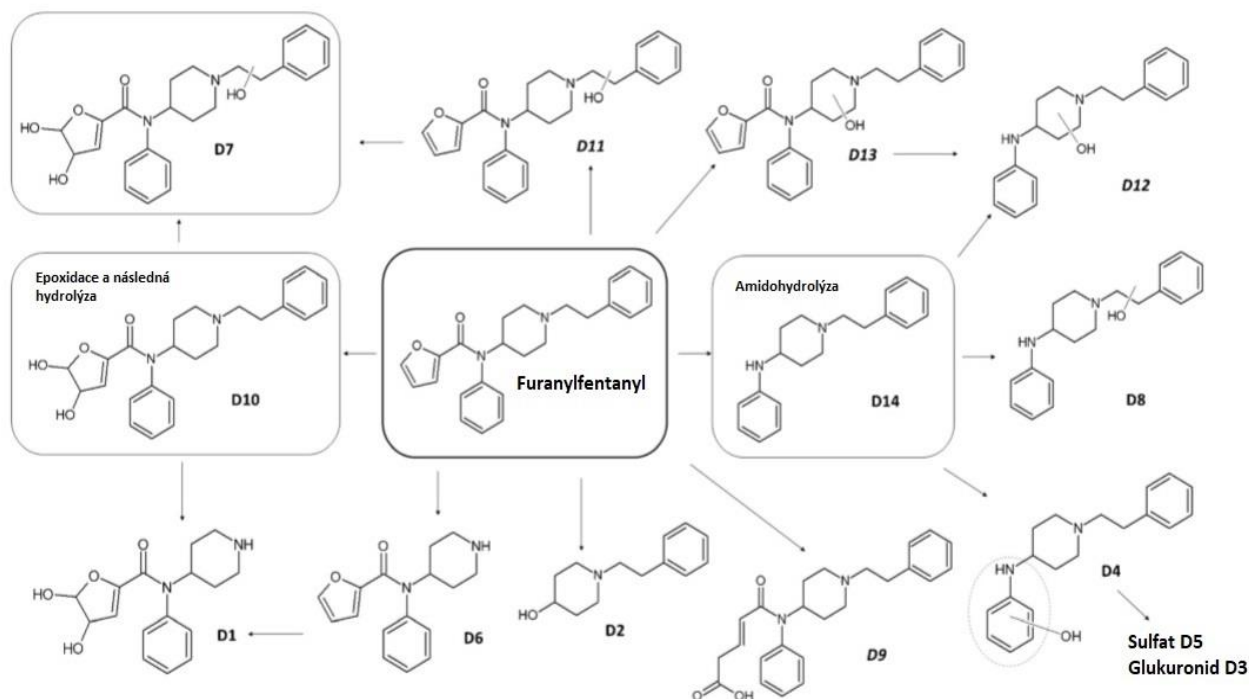
Obrázek 4 – Struktura furanylfentanylu [11]

Potentnost tohoto derivátu je vůči opioidním receptorům výrazně menší než v případě fentanylu a morfinu, nicméně jeho δ -receptorová potence je o něco větší než u morfinu. Současné poznatky ohledně nových xenobiotik poukazují na fakt, že látky, které obsahují furanový kruh, jsou řazeny mezi potenciální až prokázané toxické a karcinogenní látky. Furanylfentanyl se v posledních letech zneužívá při mísení s heroinem pro zvýšení zisku dealerů za cenu menších dávek čistého heroínu. Kombinace heroínu a furanylfentanylu dramaticky zvyšuje riziko předávkování, jež mívá ve většině případů za následek utlumení dýchací soustavy, otok plic a následné bezvědomí. V roce 2014 bylo zaznamenáno přes 47 000 případů předávkování touto látkou, přičemž se jedná o 60% nárůst v porovnání s heroinem a jinými opioidy [11, 36].

Tabulka č. 2 – Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností furanylfentanylu [29, 32, 37]

Molekulová hmotnost	374,48 g/mol
Teplota tání	145,3 °C
Teplota varu	517,2 °C
Log P	3,71

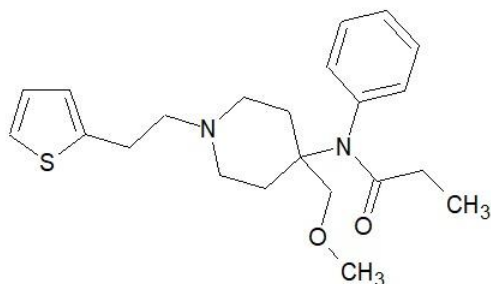
Z důvodu své vysoké lipofility je furanylfentanyl snadno absorbován, čímž téměř okamžitě vyvolává účinek. Konkrétní letální dávka není prozatím známa, avšak můžeme usuzovat, že bude daleko nižší, zejména z důvodu větší afinity k opioidním receptorům. Stejně jako LD50, tak i rozpustnost ve vodě není zatím určena ani predikována. Furanylfentanyl je stejně jako fentanyl oxidován v játrech enzymem CYP 3A4. Na rozdíl od sufentanilu nebo fentanylu se furanylfentanyl převážně metabolizuje amido-hydrolyzou (produkt označen na obrázku č. 5 jako D14). Další centrum biotransformace představuje aromatický furanový cyklus. Furan je znám pro své charakteristické bioaktivační reakce, jako jsou např. epoxidace nebo otevření heterocyklického kruhu. Epoxidace nebo otevření kruhu na α , β -nenasycený karbonylový intermediát může vést k reaktivním metabolitům, které mohou způsobovat nekrózu jater nebo ledvin. Tyto reakce umožňují vznik metabolických produktů furanylfentanylu, které se výrazně liší od ostatních analogů fentanylu. Jako další nejčastější biotransformační reakce se udává epoxidace furanového kruhu a jeho následná hydrolyza za vzniku metabolitu obsahujícího diolovou skupinu (na obrázku č. 5 metabolit D10). V biotransformační II. fázi je další meziproduct D4 konjugován s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem [38, 39].



Obrázek 5 – Metabolická dráha furanylfentanylu [38]

1.3.3 Sufentanil

Další z mnoha derivátů fentanylu, sufentanil (obrázek č. 6), byl syntetizován jako nové opioidní analgetikum potenciálně použitelné v medicíně. Svou strukturou je sufentanil velmi podobný fentanylu. Přítomná methoxy skupina bývá popisována jako nejčastější důvod, proč má sufentanil tak krátkodobé účinky. Další změnou ve struktuře je nahrazení fenylového kruhu thiofenovým kruhem [35].



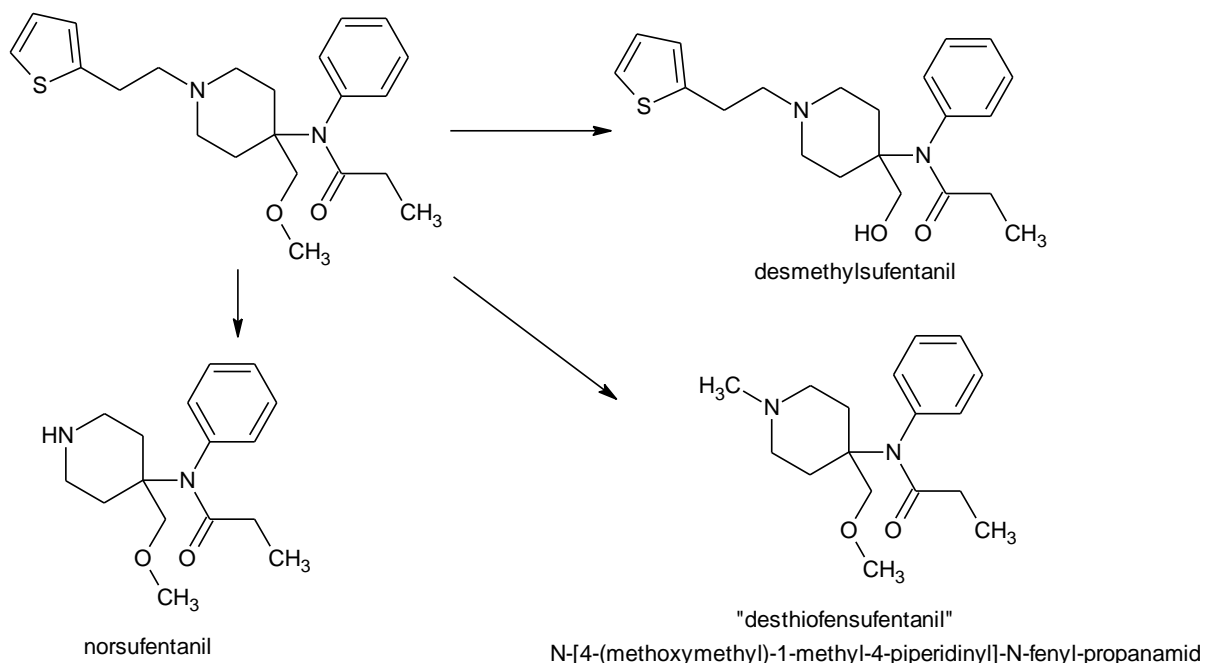
Obrázek 6 - Struktura sufentanilu [33]

Toto syntetické xenobiotikum se používá zejména v medicíně jako součást náplastí pro velmi vážné úrazy, především pro úrazy spojené s těžkými chronickými bolestmi, kdy je třeba podat dostatečně silnou látku s krátkým účinkem. Udává se, že sufentanil je nejsilnější lék proti bolesti dostupný pro člověka, v literatuře se uvádí jako 5–7krát potentnější. Jeho krátkodobé účinky lze odvodit například z faktu, že k vyvolání stejného terapeutického účinku lze podat 5–10krát menší dávku než v případě fentanylu. Dalším faktem sufentanilu, jakožto krátkodobé psychotropní látky, je jeho poločas eliminace, který vykazuje rychlejší metabolismus než v případě fentanylu. Silnější deriváty se používají pouze ve veterinářství. Mezi vedlejší účinky sufentanilu patří zejména vysoké riziko předávkování, nevolnost a dušnost, která může vést až k zástavě dýchání [27, 40].

Tabulka č. 3 – Základní fyzikálně chemické vlastnosti [29, 32, 41]

Molekulová hmotnost	386,554 g/mol
Teplota tání	96,6 °C
Teplota varu	493,1 °C
Rozpustnost ve vodě	76 mg/dm ³
pKa	8,01
Log P	3,95
LD ₅₀	18,7 mg/kg

Díky své potentnosti bývá sufentanil zneužíván zejména narkomany. Oproti fentanyl má výrazně vyšší hodnotu $LD_{50} = 18,7 \text{ mg/kg}$, která byla zjištěna na myších. Z toho lze usuzovat, že je „bezpečnější“ než jeho předchůdce. Stejně jako jiné deriváty patří mezi vysoce návykové látky. Sufentanil je metabolizován enzymem CYP 450 3A4 v játrech stejně jako jiné deriváty. Vzhledem k podobné struktuře je jeho oxidace velmi podobná fentanyl. Udává se, že nejčastějším krokem při biotransformační fázi I. je demethylace methoxy skupiny na 4-hydroxy derivát sufentanilu. Stejně jako je tomu u fentanyl, v případě *in vitro* převažovala N-alkylace. Přehled vzniklých produktů je možné shlédnout na obrázku č. 7 [27].



Obrázek 7 – Metabolismus sufentanilu [26]

1.4 Analytické stanovení fentanylu a jeho derivátů

1.4.1 Extrakce

Pro biologické vzorky (krev, moč, plasma, popř. tkáně) se stanovuje koncentrace xenobiotika. Před samotnou extrakcí jsou biologické vzorky centrifugovány k odstranění červených krvinek, popř. jiných nerozpustných částic. Následně se vybírá rozpouštědlo s vysokou rozpouštěcí schopností pro daná xenobiotika – methanol nebo acetonitril [39, 42-44].

Fentanyl a jeho analogy se nejčastěji extrahují pomocí extrakce kapalina–kapalina (L–L), kdy je potřeba upravit pH tak, aby látka byla zcela neionizovaná, pH by mělo být 2 jednotky vyšší než příslušná hodnota pKa. Neionizovaná forma látky přechází do organického rozpouštědla, nejčastěji se využívá ethylacetát. Jinou možností je využití SPE extrakce, kdy se nejčastěji využívá stacionární fáze C18 a jednotlivé látky jsou odděleny právě z důvodu rozdílných hodnot poté, co je stacionární fáze promývána rozpouštědly o různém pH. K odstranění potenciálně interferujících nepolárních hydrofobních látek se následně vzorek okyselí a provede se L–L nebo SPE extrakce, přičemž fentanyl a jeho analogy přecházejí do vodné fáze. SPE vykazuje obvykle menší ztráty analytu při separaci než výše zmíněná L–L extrakce. Udává se, že fentanyl je stabilní v plasmě při pokojové teplotě po dobu šesti hodin, při –20 °C po dobu až šesti měsíců. Furanylfentanyl, sufentanil a jiné analogy jsou stabilní po dobu 30 dní ve štavelanu draselném, a to jak při pokojové teplotě, tak v lednici či mrazáku [39, 43].

1.4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v dnešní době jednou z nejpoužívanějších separačních technik. Základní instrumentace této techniky se skládá ze zásobníku mobilní fáze (MF), vysokotlakého čerpadla, dávkovacího systému, kolony a detektoru. Dnešní HPLC systémy operují zejména na systému tzv. reverzních fází, kdy MF (voda s přidavkem polárního organického rozpouštědla) je polárnější než stacionární fáze (SF). Stacionární fáze bývá nejčastěji silikagel s kovalentně navázanými alkylovými řetězci (C₄ – C₁₈), popř. jinak modifikovaná méně polární SF. Pokud se složení MF v průběhu separačního procesu nemění, jde o tzv. isokratickou eluci, ta se využívá např. pro refraktometrický detektor. Hojněji je využívána gradientová eluce, kdy se mění složení a tím i eluční síla MF s rostoucím časem. Gradientová eluce se realizuje binárním mícháním roztoků. Po separaci jsou analyty dopraveny v MF na detektor. HPLC analýza poskytuje jak kvalitativní (retenční čas), tak kvantitativní (obsah plochy pod křivkou) údaje. V knihovnách tedy můžeme nalézt shodu mezi retenčními časy, nicméně je nutno dát si pozor na to, aby byla použita stejná MF, popř. stejné nastavení gradientové eluce. Detektory používané v HPLC se dělí na hmotnostní a koncentrační. Detektory mohou být taktéž univerzální, např. UV/VIS, pro látky obsahující chromofor, anebo selektivní, např. fluorescenční [45].

Pro tuto práci byl vybrán elektrochemický detektor, který využívá redoxní děje analytů na rozhraní fází elektroda/roztok (mobilní fáze). Je tedy využitelný selektivně k detekci elektroaktivních látek. Selektivitu lze dále zvýšit nastavením vhodného potenciálu na pracovní elektrodu. Tento detektor může vykazovat v závislosti na elektrochemických vlastnostech analytu velmi nízké hodnoty LOD, je kompatibilní s gradientovou i isokratickou elucí. Pro elektrochemickou detekci se používá jako MF roztok elektrolytu, který musí být dostatečně čistý a pro detekci v katodické oblasti potenciálů dokonale odvdzušněn [45, 46].

Byly vyvinuty HPLC-MS/MS metody pro detekci 24 analogů fentanylu a jejich metabolitů v krvi. Pro práci byla využita kolona Raptor Biphenyl LC (150 mm × 3 mm, 2,7 μm), která byla termostatována na 40 °C. Jako druhá kolona byla testována C18. Mobilní fázi pro gradientovou eluci tvořily vodné roztoky 10 mM mravenčanu amonného a 0,1 % mravenčí kyseliny – složka A a 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu – složka B. První dvě minuty analýzy byl poměr složek MF 9:1 (A:B), následně byl poměr MF obrácen během 6 minut a po dobu 0,5 min držen 1:9 (A:B). Nakonec byla MF vrácena na původní poměr 9:1 a celková analýza trvala celkem 13,5 minut. Průtoková rychlost během celé separace byla nastavena na 0,4 ml/min. Výsledky z analýzy prokázaly, že C18 reverzní SF neposkytuje dostatečnou separaci pro všechny analogy fentanylu. Jako instrumentální koncovku byl využit trojitý kvadrupól. Ionizační technika ESI byla nastavena do pozitivního módu. Průtoková rychlost plynu – N₂, který byl temperován na 350 °C byla 12,0 l/min. Na kapiláru bylo vkládáno napětí 4000 V. Jako software, který zaznamenával průběh pokusu, byl použit MassHunter Qualitative and quantitative analysis. Díky trojitému kvadrupólu bylo možné zaznamenávat MRM [47].

Byla vyvinuta i jiná metoda separace a následné identifikace fentanylu a jeho analogů. MF byla tvořena ze dvou složek. První složka byla tvořena 0,1 % kyseliny mravenčí o pH = 2,2 a druhou složkou byl methanol. Jako separační kolonu využili Acquity BEH C18 kolonu (150 mm × 2,1 mm, 130 Å, 1,7 μm). Byla využívána binární gradientovou eluci, kdy na počátku byl poměr složek ve směsi 68:32. Po 4 minutách separace byl gradient změněn na 63,3:36:7. Jako instrumentální koncovku pro stanovení využili Q-TOF umožňující měření přesné hmoty. Napětí vkládané na kapiláru bylo 3500 V. Jako kolizní plyn využili argon, jehož tlak odpovídal asi 5,9·10⁻³ mbar, MRM přechody byly zkoumány v pozitivním módu. Pro fentanyl bylo zkoumáno MRM přechody 337>188 *m/z* a 337>105 *m/z* [48].

Jiná metoda byla vyvinuta pro forenzní stanovení heroinu, kokainu, fentanylu a jeho analogu pomocí HPLC-DAD-AD Agilent HP Series 1100 Liquid Chromatography Instrument

(Agilent Technologies, Wokingham, UK), kde jako mobilní fáze byla využita směs 20 mM mravenčanu amonného a 100 mM chloridu draselného, který byl následně smíchán s acetonitrilem 30:70 (v/v) pro isokratickou eluci, pH bylo upraveno na 7 pomocí 0,1 M NaOH. Při amperometrické detekci byla využita referentní argentchloridová elektroda. Jako kolonu využili Eclipse XDB-C8 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm). Avšak byly testovány i jiné kolony, např. Hyperclone C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm), která však zadržovala vybrané drogy déle než kolona Eclipse a bylo nutné použít až 40 % poměr k vymytí ze SF. Pro optimalizaci elektrochemického detektoru využili data z cyklické voltametrie, kde je anodický pík při 0,9 V. Pomocí DAD detektoru bylo možné fentanyl a jeho analogy detekovat až po koncentraci 10⁻³ μg/ml. Mez kvantifikace byla v řádech 10⁻¹ až 10⁻² μg/ml. Z výsledku práce vyplývá, že DAD detektor vykazoval větší LOD než AD [49].

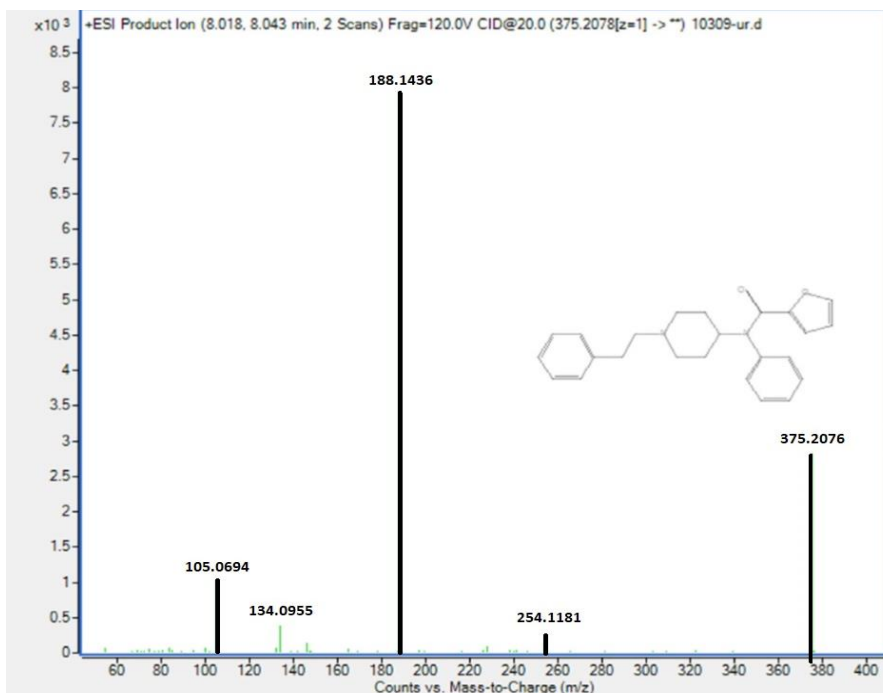
Vedle HPLC metod lze využít GC ke stanovení THC, kokainu a opiátu jako morfin, fentanyl a jejich metabolity. Pro tyto účely byla vyvinuta GC/MS metoda využívající kapilární kolonu s nepolární stacionární fází tvořenou z 95 % dimethylarylsiloxanem a 5 % fenylu (DB-5MS, 10 m, 0,18 mm, tloušťka filmu 0,18 μm) a helium jako nosný plyn (s průtokovou rychlostí 0,7 ml/min). Teplotní program byl nastaven tak, že počáteční teplota na koloně byla 140 °C po dobu 0,4 minuty, následně docházelo ke zvyšování teploty o 35 °C/min, až na konečných 280 °C. Po dosažení 280 °C byla teplota zvýšena na 320 °C rychlostí 118 °C/min a udržována po dobu 1,5 minuty. Nástříková část GC byla temperována na 280 °C ve splitless módu. Celková doba separace trvala 6 minut. MS detekce byla provedena s využitím ionizace elektronem (EI), kde vkládali 70 eV se skenovacím rozsahem 51–550 *m/z*. Za těchto podmínek byla mez detekce 30 ng/ml a mez stanovitelnosti 100 ng/ml. Metoda může být použita na screening mnohých toxikologických vyšetření, jako je např. kvantifikace a stanovení metabolitů [50].

Další možnou metodou, jak detekovat fentanyl a sufentanil a jejich metabolity, je využití GC-MS s možnou derivatizací pomocí anhydridu kyseliny pentafluoropropionové, kdy díky této derivatizaci se zvýšila selektivita zejména pro norfentanyl a norsufentanil. Pomocí této metody bylo možno dosáhnout LOD až 0,08 ng/ml. Po L-L extrakci methyl-terc-buthyl etherem byl přidán anhydrid kyseliny pentafluoropropionové a ethylacetát. Směs byla ponechána k inkubovat při 70 °C po dobu 20 minut. Následně byl derivatizovaný extrakt odpařen do sucha proudem dusíku při 40 °C a rekonstituován v ethylacetátu. Analýza byla provedena na Agilent 6890 GC spojený s Agilent 5973 MS s kvadrupólovým analyzátozem. Nástříková část byla temperována na 270 °C ve splitless módu. Kapilární kolona byla tvořena

z 95 % dimethylarylsiloxanem a z 5 % fenylmethylsiloxanem (DB-5ms, 30 m, 0,25 mm, 0,5 μm tloušťka filmu). Teplotní program byl nastaven tak, že počáteční teplota na koloně byla po dobu 1 minuty 100 °C. Následně docházelo ke zvyšování teploty o 42 °C/min do konečných 200 °C. Po dovršení 200 °C se následně navyšovala teplota o 15 °C/min do 280 °C, na této hodnotě udržována po dobu 12 minut. Jako nosný plyn bylo využito helium s průtokovou rychlostí 1 ml/ min. Celkový objem nástřiku byl 1 μl . MS detekce byla provedena s využitím EI (ionizační energie 70 eV) se skenovacím rozsahem 50-500 m/z [51].

1.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je technika, která bývá využívána v analytické chemii nejčastěji pro identifikaci látek na základě určení jejich molekulové hmotnosti a jejich fragmentace. Tato technika je poměrně nová a stále více se dostává do komerční zóny. Významné uplatnění má ve farmaceutické analýze pro identifikaci nových syntetických psychotropních látek. Hmotnostní spektroskopie bývá nejčastěji spojena se separační technikou, především s plynovou nebo kapalinovou chromatografií, případně s kapilární elektroforézou. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. Princip metody je založen na převedení molekul nebo atomů na ionty v plynné fázi a následné separaci a detekci vzniklých iontů a nabitých fragmentů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrum (viz obrázek č. 8) je pak závislost intenzity iontů (absolutní nebo relativní) na jejich m/z . Iontové zdroje se dají rozčlenit na zdroje, které pracují za atmosférického tlaku a zdroje, které vyžadují vakuum. Další členění iontových zdrojů spočívá v množství vnitřní energie, kterou molekuly při procesu ionizace získávají, dělíme je tedy na tvrdé a měkké. Nejtvrděší ionizační technikou je elektronová ionizace, při níž molekula získá velký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu někdy v takovém rozsahu, že molekulární iont ve spektru zcela chybí. Mezi měkké, šetrnější ionizační techniky se řadí např. ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace (APCI) a fotoionizace (APPI), které pracují za atmosférického tlaku a jsou vhodné pro spojení s HPLC [39, 52].



Obrázek 8 – MS spektrum furanylfentanylu ESI v pozitivním módu a analyzátoru Q-TOF [39]

Tabulka č. 4 – Přehled intenzivních fragmentů fentanylu a jeho derivátů zaznamenaných ionizační technikou ESI + a analyzátoru Q-TOF [39]

Zkoumaná látka	kolizní energie [eV]	Nejčastější fragmenty [m/z]
Sufentanil	40 eV	238, 206, 111, 69
Furanylfentanyl	20 eV	375, 188, 134, 105
Fentanyl	20 eV	337, 188, 105

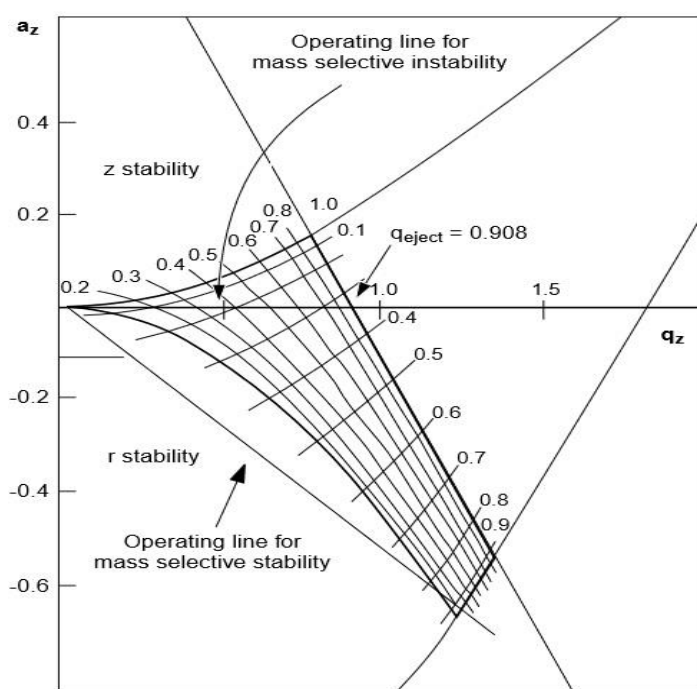
1.4.3.1 Elektrosprejová ionizace

Elektrosprejová ionizace je měkkou ionizační technikou, která bývá v praxi stále více používána, zejména v oblasti analýzy biologických vzorků, např. pro analýzu bílkovin, cukrů a jiných makromolekul. Na kovovou sprejovací kapiláru je vkládáno vysoké napětí, které bývá v rozmezí 3–5 kV, společnost Waters na svých stránkách udává rozmezí 2–4 kV [53]. Z analytu a pomocné kapaliny – rozpouštědla – se na konci kapiláry vytvoří kladně nebo záporně nabitě kapičky v závislosti na polaritě napětí na sprejovací kapiláře. Tyto kapičky jsou za pomoci zamlžujícího plynu dispergovány na aerosol. Odpařováním rozpouštědla se zvyšuje hustota povrchového náboje na kapičce do doby, než je dosažena kritická hodnota (Rayleighův limit), při které jsou vyrovnány repulzní síly mezi náboji s povrchovým napětím kapičky, jež ji udržuje pohromadě. Po překročení Rayleighova limitu nastane tzv. coulombická exploze, tedy rozpad

na ještě menší kapičky s rozděleným původním nábojem. Tento proces se opakuje až do uvolnění iontů. Nevýhodou může být, že ESI nelze použít pro nepolární sloučeniny a nepolární mobilní fáze. Pro ESI je typický vznik protonovaných molekul $[M+H]^+$ v kladném módu, resp. deprotonovaných molekul $[M-H]^-$ v módu záporném, a také tvorba aduktových iontů se sodným, popř. draselným kationtem, které je nutné vzít v potaz při vyhodnocování spekter a určování molekulové hmotnosti analytů. ESI bývá nejčastěji využívána pro spojení MS se separačními technikami, především s HPLC [45].

1.4.3.2 Iontová past

Iontová past je hmotnostní analyzátor, který obsahuje vstupní, prstencovou a výstupní elektrodu. Považuje se za jeden z mála analyzátorů schopný izolovat ionty na určitou dobu. Díky tomu lze provádět tzv. kolizní experimenty MS^n a fragmentovat izolované ionty. Ionty jsou přiváděny do tohoto analyzátoru krátkým napěťovým pulzem přes vstupní elektrodu. Vhodnými poměry napětí vkládaného na všechny tři elektrody (prstencovou, vstupní a výstupní) se ionty zadrží uvnitř pasti. Postupnou změnou napětí jsou ionty vypuzeny podle m/z výstupním otvorem na detektor. Stabilita iontů oscilujících v iontové pasti je znázorněna Mathieuovým stabilitním diagramem (obrázek č. 9) [52].



Obrázek 9 – Mathieu diagram stability iontů v iontové pasti [52]

Trojrozměrný diagram (obrázek č. 9) popisuje oblast, kdy je daný iont ještě stabilní. Jestliže daný iont překročí hodnotu $q_z = 0,908$, stává se nestabilním a je vypuzen na detektor. Udává se, že iontová past je schopna analyzovat poměr m/z až do 10^4 . Tento analyzátor využívá helium jako pomocný plyn, který snižuje kinetickou energii iontů, bývá taktéž označován jako tlumící plyn, což zvyšuje citlivost, selektivitu, napomáhá udržet ionty ve středu iontové pasti a slouží jako kolizní plyn při MSⁿ experimentech [54].

1.4.4 Voltametrie

Voltametrie je elektrochemická metoda používaná v analytické chemii zejména v průmyslových laboratořích. Vedle využití v kvantitativní analýze může být voltametrie nápomocná při identifikaci neznámých elektrochemicky aktivních psychotropních látek, a to poskytnutím informací o jejich oxidačně-redukčních vlastnostech. Dále může po provedení elektrolýzy napomoci predikovat případné vznikající metabolické produkty a zároveň určit jejich redoxní potenciály. Udává se, že pro elektrochemické studie syntetických drog je nejvhodnější skelný uhlík. V případě AdSV lze využít rtuťové elektrody, zejména HDME, SDME nebo MFE. Mezi hlavní přednosti této metody patří zejména nízká pořizovací cena, možnost miniaturizace, nízké meze detekce a stanovitelnosti. Nevýhodou může být nutnost pracovat s velmi čistými roztoky, a především paměťové efekty pracovní elektrody, které zhoršují opakovatelnost voltametričeských měření. Jednou z nejpoužívanějších voltametričeských technik je cyklická voltametrie, jež bývá využívána pro počáteční charakterizaci elektrochemicky aktivních systémů.

Fentanyl a jeho analogy, stejně jako kokain a heroin, vykazují z elektrochemického pohledu pravděpodobnou nevratnou oxidaci jejich terciálních aminoskupin. U fentanylu a jeho derivátů je proces pravděpodobně komplikovaný hydroxylací a následnou oxidací na chinoniminové skupiny. Mechanismus elektrochemické oxidace fentanylu a jeho derivátů není zatím objasněn. Dále bylo zjištěno, že fentanyl a jeho analogy, společně s heroinem a kokainem a jinými látkami, vykazují podobné elektrochemické oxidační potenciály, a proto se voltametričeské metody nehodí pro analýzu tzv. „street drugs“, kdy jsou čisté látky míseny s jinou látkou – „nařezávány“ za účelem vyššího výtěžku dealera. V uvedené studii využívali jako pracovní elektrodu SPCE a referentní elektroda byla argentičloridová [49].

Další vlastností, kterou fentanyl a jeho analogy vykazují při využití voltametričeských technik, je schopnost adsorbovat se na povrch elektrod. Této vlastnosti lze využít v případě

AdSV metody s Hg elektrodou (SMDE). Cyklický voltamogram pořízený v roztoku alkalického hydroxidu ($0,05 \text{ mol/dm}^3$) vykazoval dvojici kapacitních proudových píků s potenciály $E_{pc} = -1,47 \text{ V}$ a $E_{pa} = -1,44 \text{ V}$ (proti Ag/AgCl, nasycený KCl). Bylo prokázáno, že na povrchu elektrody se adsorbuje neutrální forma fentanylu. Adsorpce lze tedy využít k prekoncentraci fentanylu a pro následné stanovení metodou AdSV. Při použití 60 s akumulace při $-1,1 \text{ V}$ a polarizační rychlosti 200 mV/s byla získána lineární závislost proudu na koncentraci fentanylu v rozsahu $0,1\text{--}1 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$. Mez detekce pro tuto metodu byla $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol/dm}^3$ při akumulaci 10 min [55].

Pro rychlou analýzu fentanylu a jeho analogů přímo v terénu byl vyvinut elektrochemický sensor s jednorázovými uhlíkovými elektrodami na bázi SPCE modifikované 1-butyl-1-methyl-pyrrolidinium bis-(trifluoromethylsulfonyl)-imidem. Jako analytická koncovka tohoto senzoru byla využita cyklická square wave voltametrie – CSWV. Detekce je založena na záznamu elektrochemického „otisku prstu“ fentanylu, který vykazuje první anodický pík při $0,556 \text{ V}$ (proti Ag/AgCl, nasycený KCl) a dvojici píků odpovídající reverzibilní redukci při potenciálu ($-0,235 \text{ V}$) a oxidaci ($-0,227 \text{ V}$). Tento typický voltametrický profil umožňuje rychlou (do minuty) identifikaci fentanylu v mikromolárních koncentracích v přítomnosti dalších látek, které se obvykle přimíchávají do nelegálních drogových formulací [56].

Pro fentanyl citrát byl vyroben elektrochemiluminiscenční sensor. Tento sensor je založen na kompozitní pastové elektrodě připravené smícháním mikrokuliček ze skelného uhlíku s iontovou kapalinou (N-oktylpyridium tetrafluoroborát), ponořené do roztoku $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$. Přítomnost citrátu fentanylu zesiluje chemiluminiscenční signál $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ při 610 nm . Během experimentu bylo zjištěno, že signál narůstá s rostoucím pH od 7 do 8,5. Při hodnotách vyšších než $\text{pH}=8,5$ klesá. Největší intenzita elektrochemiluminiscenčního signálu byla zaznamenána při cyklické voltametii. Bylo zjištěno, že elektrochemiluminiscenční intenzita rapidně roste při zvyšující se rychlosti scanu v rozmezí $25\text{--}75 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, kdežto v rozmezí $75\text{--}125 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ roste intenzita daleko pomaleji. Aplikovaný potenciál při CV byl od 0 do $+1,6 \text{ V}$. Při optimálních podmínkách vykazoval tento sensor linearitu pro fentanyl citrát od 10^{-4} do 10^{-8} mol/dm^3 . Limit detekce byl stanoven na $8,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/dm}^3$ [57].

2 Experimentální část

2.1 Materiály a chemikálie

2.1.1 Chemikálie

Kyselina boritá (Lachema, Brno, Česká Republika, 99,5 %)

Kyselina ortho-fosforečná 85 % *w/v* (Fluka® Analytical, Švýcarsko, p. a.)

Kyselina octová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 99,7 %, *w/v*)

2-[(furan-2-karbonyl)(methyl)amino]-benzoová kyselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Acetonitril (HPLC grade, VWR Interantional, USA)

Octan amonný (Lachema a. s. Brno, Česká Republika, p. a.)

Amoniak (Lach-Ner s. r. o, 25 %, p. a.)

Methanol (Lachema a. s. Brno, Česká Republika, p. a.)

Oxid hlinitý (Sigma – Aldrich, St. Loius, USA, 99,9 %, velikost částic <50 nm, nanoprášek)

Hydroxid sodný (Chemapol, Praha, p. a.,)

Sufentanil citrát (roztok 0,1 mg/ml – uvedena jako volná báze v 1 ml CH₃OH, Sigma – Aldrich. St. Louis, USA)

Furanylfentanil citrát (roztok 1 mg/ml v CH₃OH)

Fentanil citrát (roztok 0,1 mg/ml v CH₃OH)

Furanylfentanil a fentanil citrát byl laskavě poskytnut Ústavem soudního lékařství a medicinského práva Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

2.1.2 Materiál a přístroje

Na úpravu pH Britton-Robinsonova pufru byl použit pH metr InoLab pH 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (WTW, Německo).

Voltametrické experimenty byly prováděny na přístroji Autolab PGSTAT128N (Metrohm, Autolab, Utrecht, Nizozemsko) v tříelektrodovém uspořádání s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE MF-2012, BASi, West Lafayette, USA), referentní kalomelovou

a pomocnou platinovou elektrodou. Měření byla prováděna ve dvoudílné elektrochemické nádobce pro měření v malých objemech (BASi) s vnitřní nádobkou zakončenou fritou z Vycoru. Měřený roztok vzorku s pracovní a pomocnou elektrodou byly umístěny ve vnitřní nádobce, elektrolyt ($0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$) s referentní elektrodou ve vnější nádobce.

Laboratorní pomůcky – vialky skleněné, o objemu 2 ml (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), mikropipety (Eppendorf Research PLUS, Hamburg, Německo) s nastavitelným objemem v rozsahu 20–200 a 100–2000 μl .

Odebraná moč byla filtrována přes Labicom – LUT Syringe Filters Nylon – 30 mm, 0,22 μm .

Deionizovaná voda ($18 \text{ M}\Omega$) byla připravena pomocí purifikačního systému DirectQ 3 UV (Merck Millipore).

2.1.3 Příprava roztoků

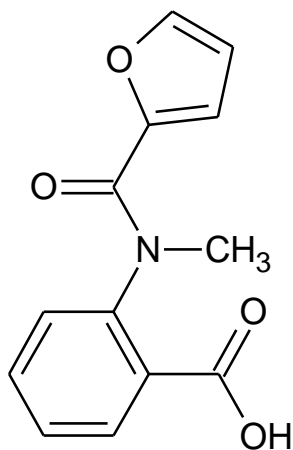
Byla připravena sada roztoků Britton-Robinsonova pufru o pH 3, 7, a 10. Základní Britton-Robinsonův roztok obsahující kyselinu boritou, fosforečnou a octovou – koncentrace každé kyseliny byla $0,04 \text{ mol/dm}^3$ – byl upravován 0,2 M NaOH pomocí pH metru, který byl před samotným upravováním kalibrován sadou standardních pufrů. Dále byl připraven zásobní roztok octanu amonného o koncentraci 20 mM a 50 mM, jenž byl upraven 50 mM kyselinou octovou a 25 % amoniakem na pufrы s výsledným pH 4, 7 a 10.

2.1.4 Příprava elektrody

Před každým měřením byla pracovní elektroda opláchnuta destilovanou vodou a následně vyčištěna pomocí vodné suspenze aluminy, jež byly nanoseny na leštící tkaninu. Takto vyleštěná elektroda byla vložena do zkumavky s destilovanou vodou a ponechána v sonické ultrazvukové lázni po dobu jedné minuty a následně opláchnuta destilovanou vodou.

2.1.5 Voltametrie 2-[(furan-2-karbonyl)(methyl)amino]benzoové kyseliny a fentanylů

Bylo připraveno 0,5 ml roztoku, který obsahoval 0,4 ml deionizované vody a 0,1 ml vzorku 2-[(furan-2-karbonyl)(methyl)amino]benzoové kyseliny – FBA (viz obrázek č. 10) o koncentraci 1 mg/ml a 0,4 ml Britton-Robinsonova pufru o pH 4, 7 a 10. Parametry DPV byly obdobné jako v tabulce č. 5 s tím rozdílem, že potenciál kroku byl nastaven na 0,05 V, modulační amplituda byla 0,05 V, doba trvání pulzu 50 ms a interval mezi pulzy 500 ms. Obdobně byly proměřeny i vybrané látky.



Obrázek 10 – Struktura FBA

2.1.6 Měření závislosti na rychlosti skenu

Měření závislosti proudu na rychlosti polarizace elektrod bylo provedeno metodou cyklické voltametrie (CV) v tříelektrodovém zapojení, kdy pracovní elektroda byla ze skelného uhlíku, referenční elektroda byla Ag/AgCl, 1 M KCl a platinový drátek byl využit jako pomocná elektroda. Při měření byla vnější část dvoudílné voltametrické nádoby naplněna z 1/3 0,1 M KCl. Do ní byla ponořena vnitřní nádoba s vycorovou fritou, do níž bylo následně přidáno 0,480 ml pufru z octanu amonného o příslušném pH. Po záznamu cyklického voltamogramu základního elektrolytu bylo do téhož roztoku přidáno 20 μ l roztoku furanylfentanylu o základní koncentraci 1 mg/ml. Cyklické voltamogramy byly zaznamenány při parametrech uvedených v tabulce č. 5. Jako první byla použita rychlost polarizace 1,28 V/s.

Tabulka č. 5 – Přehled parametrů cyklické voltametrie

počáteční potenciál	0 V
maximální potenciál	1,4 V
minimální potenciál	-0,6 V
Potenciál kroku	0,02 V

2.1.7 Elektrolýza fentanylu a jeho analogů

Při elektrolýze se jako referenční elektroda využila elektroda kalomelová. Základní roztok byl tvořen 0,02 M octanem amonným, do něhož se přidala voda a methanol, aby měl vzniklý roztok podobné složení jako roztok zkoumaný. Zkoumaný vzorek obsahoval octan amonný, samotný vzorek o příslušné koncentraci, který byl rozpuštěný v methanolu a vodě. Jako pracovní elektroda byl použit platinový drátek, který byl předem očištěn v redukční části plamene. Potenciál vkládaný na elektrodu byl 1,1 V, v případě sufentanilu 1,15 V. Celá elektrolýza furanylfentanylu probíhala 60 minut za probublávání N₂. V případě fentanylu byl vzorek ponechán k elektrolýze 15 hodin, sufentanil byl elektrolyzován po dobu 2 hodin. Jako referenční elektroda byla využita elektroda kalomelová.

2.1.8 Optimalizace ESI-MS v závislosti na teplotě

Vzorky z měření cyklických voltamogramů při různých rychlostech polarizace byly následně odebrány do vialek o objemu 2 ml a ponechány po dobu jednoho dne v mrazáku. Následující den byla proměřena spektra v pozitivním i negativním módu ionizace. Při měření byla zvyšována teplota z 150 °C na 300 °C vždy po 25 °C. Měření bylo proměřeno za ustálení napětí vkládané na kapiláru a byl zaznamenán počet countů pro následnou analýzu. Napětí vložené na kapiláru bylo 3,5 kV pro oba módy.

2.1.9 Identifikace produktů po elektrolýze pomocí HPLC-MS

Roztoky fentanylu a furanylfentanylu po elektrolýze byly separovány na koloně XSelectR HSS T3 – C18 (75 × 2,1 mm, 3,5 μm, 100 Å) při teplotě 26,6 °C. Celkový nástřik vzorku byl 5 μl. Průtoková rychlost byla 0,600 ml/min při gradientové eluci. Mobilní fáze byla míchána ze dvou složek: 0,01 M octanu amonného (složka A) a směsi acetonitrilu s vodou v poměru 9:1 (složka B). Gradient byl nastaven na počátku tak, že obsahoval 78 % složky A, 22 % složky B.

Po 4,5 minutách se gradient změnil na 12 % složky A a 88 % složky B. Po 5,5 minutách se gradient vrátil k počátečnímu složení MF. Napětí vložené na ESI v kladném i záporném módu bylo 0,8 V. Teplota zdroje byla 120 °C, sonda měla teplotu 600 °C. Snímaný rozsah byl 60–500 *m/z*. Následně byly spektra vyhodnocena programem Mass Lynx 4,1 od společnosti Watters.

2.1.10 Metoda stanovení pomoci HPLC-UV-ECD

Jednotlivé vzorky byly analyzovány s využitím HPLC –Thermoscientific UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific, Česká republika) s UV/VIS detektorem – DioNex 3000 variable Wavelength detector, a elektrochemickým detektorem ECD-3000RS vybaveným analytickou coulometrickou celou 6011 RS s pracovní elektrodou z mikroporézního grafitu a referentní hydrogen paládiovou elektrodou. Separaci zajišťovala kolona Phenomenex Gemini 5U C18 (150 x 4,6 mm, 110 Å, 5 µm). Kvantifikace byla provedena metodou kalibrační křivky. Kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním zásobních roztoků fentanylů mobilní fázi. až do koncentrace 0,04 g/l pro furanylfentanyl a 0,02 g/l pro sufentanil a fentanyl.

Byla využita isokratická eluce. Mobilní fáze obsahovala 50 mmol/dm³ octan amonný (pH = 9) a CH₃CN (40:60, *v/v*). Objem dávkovaného vzorku byl vždy 10 µl. Každý bod kalibrační křivky byl v důsledku omezeného množství vzorku měřen ve dvou opakováních. Průtoková rychlost byla nastavená na 0,250 ml/min. UV detektor byl nastaven pro všechny látky na 260 nm. Potenciál obou pracovních elektrod v cele ECD detektoru byl při kvantifikaci nastaven na hodnotu +900 mV.

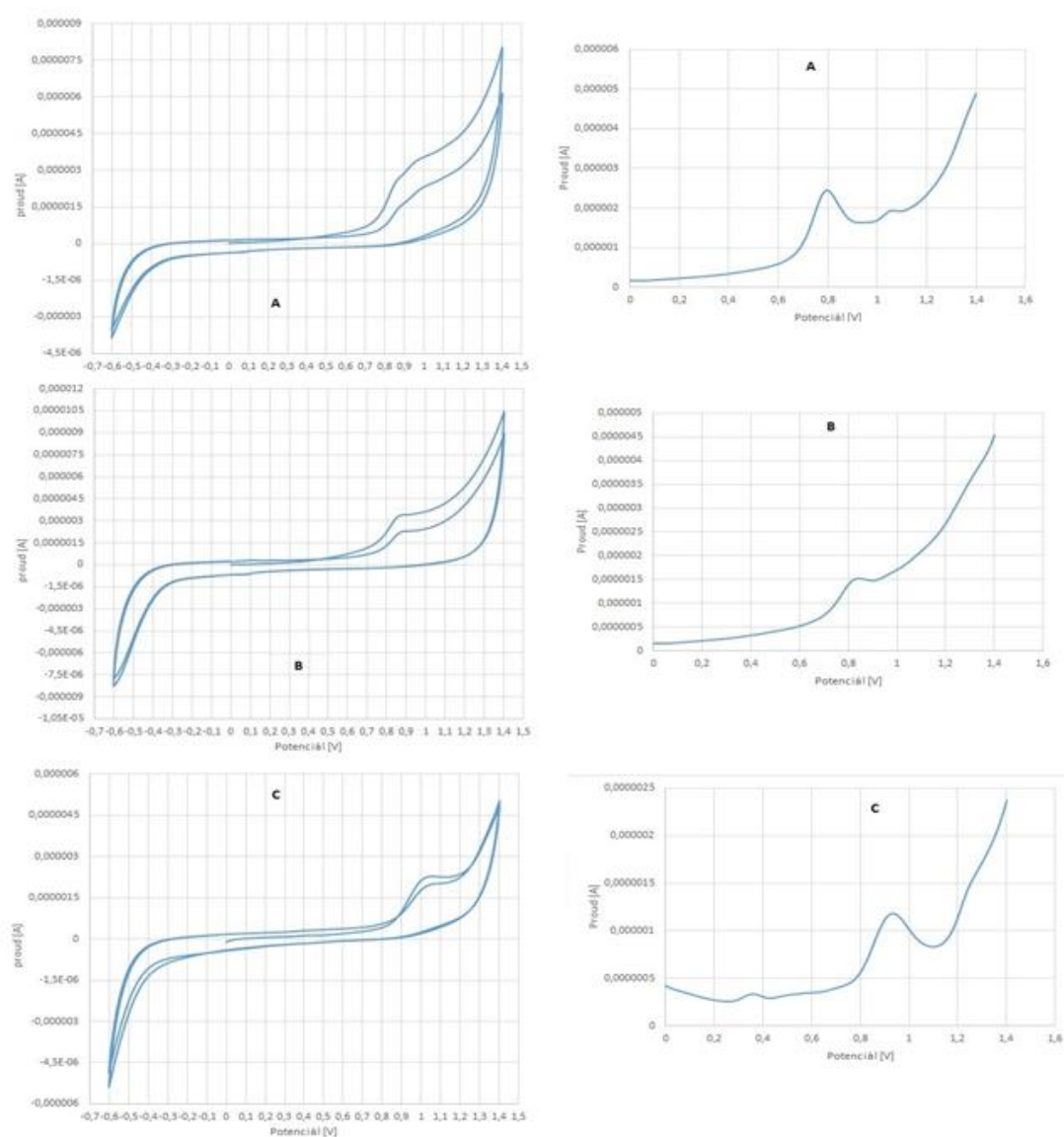
2.1.11 On-line spojení EC-MS pro vybrané deriváty fentanylu

K on-line EC-MS experimentům byl využit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) s ionizací elektrosprejem (ESI). Elektrochemická cela 5021A (ESA, Chelmsford USA) s grafitovou porézní pracovní elektrodou a hydrogen paládiovou referentní elektrodou byla připojená k potenciostatu ADLC1 (Laboratorní přístroje, Praha). Během experimentu byl vkládán potenciál na EC v rozsahu 0-1000 mV.

3 Výsledky a diskuze

Modelová látka – FBA, (viz obrázek č. 10), jež má podobný základní skelet jako fentanyl a jeho deriváty, se při CV a DPV neoxidovala. Je to pravděpodobně zapříčiněno přítomností karboxylové skupiny, která působí na elektrony záporným mezomerním efektem, tak silným, že FBA není schopna se oxidovat ani při +1,4 V.

Elektrolýza fentanylů byla provedena při potenciálech (viz kapitola 2.1.7), které byly určeny pomocí DPV a CV příslušných vybraných psychotropních látek (viz obrázek č. 11), jež byly následně příslušnou dobu ponechány elektrolýze.



Obrázek 11– Cyklické a diferenčně pulzní voltamogramy, „A“ – furanylfentanyl ($c = 0,1\text{mmol/dm}^3$), „B“ fentanyl ($c = 0,03\text{mmol/dm}^3$), „C“ sufentanil ($c = 0,03\text{mmol/dm}^3$). Levé straně obrázku jsou cyklické voltamogramy, a na pravé straně obrázku diferenčně pulzní voltamogramy.

Pro stanovení fentanylu a jeho derivátů pomocí HPLC-UV-ECD byla nejprve vyzkoušena mobilní fáze o složení 60:40 (v/v) methanol / voda. Při této mobilní fázi nedocházelo k účinné separaci furanylfentanylu a zároveň nebyla pozorovatelná odezva u ECD detektoru. Proto byla mobilní fáze pozměněna na 60:40 (v/v) methanol / 1% vodný roztok HCOOH. Separace při této mobilní fázi poskytla sice rychlou analýzu – retenční čas furanylfentanylu byl 2,21 min., avšak bylo zpozorováno rozmytí píku, sice menší než v případě methanol / voda, ale ani při tomto složení MF furanylfentanyl nebyl detekovatelný ECD detektorem. Zaměnil-li se 1% vodný roztok HCOOH za 50 mmol/dm³ octan amonný a upravili se poměr MF na 50:50 (v/v), ECD detektor vykazoval přijatelnou odezvu, avšak za cenu prodloužení separace, kdy furanylfentanyl měl retenční čas 11 minut. Proto byla vyzkoušena MF 60:40 (v/v) acetonitril a 50 mmol/dm³ octan amonný s pH upraveným na hodnotu 9 (pomocí 25% amoniaku). Retenční čas furanylfentanylu se zkrátil na 5,755 min. S touto mobilní fází došlo k účinnější separaci i ke zvýšení intenzity odezvy ECD detektoru. Proto byla tato MF vybrána pro následující práci. Retenční časy fentanylu a jeho derivátů jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6 – Přehled retenčních času při HPLC separaci při složení MF 60:40 acetonitril a 50 mmol/dm³ octan amonný pH = 9

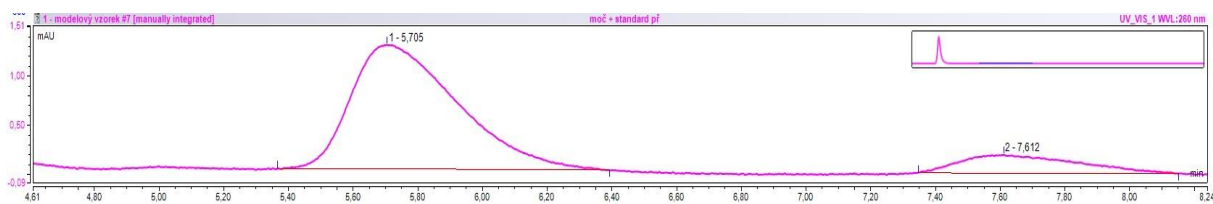
Látka	<i>t_R</i> [min]
Furanylfentanyl	5,755
Fentanyl	5,485
Sufentanil	7,608

Na rozdíl od FBA, fentanyl a jeho dva deriváty se anodicky oxidují v neutrálním prostředí při potenciálech kolem 0,8 V (fentanyl a furanylfentanyl) resp. 0,9 V (sufentanil) proti nasycené kalomelové elektrodě, jak je patrné z jejich cyklických a diferenčně pulzních voltamogramů (obrázek č. 11). Rozdvojený tvar anodického píku furanylfentanylu, resp. širší tvar píku u dalších dvou derivátů, naznačuje komplikovanější elektrodovou reakci zahrnující postupné odštěpování více než jednoho elektronu. Oxidace probíhá ireverzibilně, neboť ve zpětném skenu na CV nebyly patrné odpovídající katodické píky. Dvojice píků v potenciálové oblasti kolem 0,1 V svědčí o vzniku elektrochemicky aktivního oxidačního produktu. I přes malou intenzitu těchto proudových signálů se zde nabízí možnost elektrochemicky tento produkt detekovat v katodické oblasti potenciálu. Závislosti výšky píku

na odmocnině z rychlosti polarizace elektrody zaznamenané pro furanylfentanyl při pH 3, 7 a 10 byly lineární, což ukazuje na difúzi jako proces řídící rychlost elektrochemické reakce.

Byly stanoveny LOD, LOQ pro jednotlivé deriváty fentanylu pomocí HPLC-UV-ECD jako koncentrace odpovídající ploše píku do poměru 3:1 (signál/šum) pro LOD a 10:1 (signál/šum) LOQ. Spolu s nimi byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy. Všechny hydrodynamické voltamogramy byly měřeny při potenciálech od +300 do +1000 mV na 1. ECD pracovní elektrodě. Na 2. ECD pracovní elektrodě byly měřeny při potenciálu -500 mV do 0 mV, kdy na 1. ECD pracovní elektrodě byl ponechán potenciál +900 mV. V důsledku rozkladu rozpouštědel, resp. redukce kyslíku nebylo možné zvýšit hodnotu potenciálu nad +1000 mV, resp. ji snížit pod -500 mV. Zároveň byla změřena konverze na jednotlivých celách za předpokladu, že celková konverze z obou cel je 100 %, kdy na oba ECD detektory byl vkládán potenciál +900 mV.

Vyvinutá HPLC-UV/VIS-ECD metoda byla odzkoušena na vzorku s reálnou maticí. Byl připraven reálný vzorek moči s „naspikovaným“ sufentanilem a furanylfentanylem. Moč byla nejprve přefiltrována a následně zředěna mobilní fází v poměru 1:4 (v/v). Kvantifikace byla provedena metodou standardního přídatku. Výtěžnost furanylfentanylu pro UV/VIS detektor byla 85,91 %, pro ECD 73,56 %. V případě sufentanilu byla výtěžnost UV/VIS detektoru 88,86 %, a ECD 98,62 %. Chromatogram moči s naspikovaným sufentanilem a furanylfentanylem je ukázán na obrázku č. 12.



Obrázek 12 – Výřez chromatogramu analyzované moči, při složení MF 60:40, acetonitril:50 mmol/dm³ octan amonný pH = 9 a UV/VIS detektoru s píky furanylfentanylu a sufentanilu

Pro odhalení reakčních center ve struktuře zkoumaných fentanylů, která podléhají elektrochemickým přeměnám, byla provedena elektrolyza roztoků těchto látek a následná analýza vzniklých produktů. K tomu byly využity dvě metody: on-line spojení EC-MS a off-line kombinace potencistatické elektrolyzy a HPLC-MS analýzy elektrolyzátů. Před měřením on-line EC-MS byla sledována závislost mezi teplotou v iontovém zdroji a intenzitou signálu detektoru. Ionizace byla prováděna v pozitivním i negativním modu a výsledky jsou shrnuty

v tabulce č. 7. Vliv teploty v iontovém zdroji byl testován s roztokem furanylfentanylu o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, který byl zředěn deionizovanou vodou. Přestože se podařilo zachytit fragmentové ionty furanylfentanylu i v záporném modu ESI, vykazovala tato ionizace výrazně horší stabilitu signálu. Pro další experimenty EC-MS byla vybrána teplota iontového zdroje 200 °C, při níž byla odezva protonované molekuly furanylfentanylu nejvyšší.

Tabulka č. 7 – Intenzita signálu protonované molekuly (m/z 375) a deprotonované molekuly (m/z 373) furanylfentanylu v závislosti na teplotě v iontovém zdroji

Teplota iontového zdroje [°C]	Countů (+ mód)	Countů (– mód)
150	1 802 577	1 784 208
175	595 137	1 251 926
200	2 475 608	643 389
225	930 886	394 774
250	881 969	283 999
275	1 383 392	428 057
300	1 648 621	491 911

Hmotnostní voltamogramy byly zaznamenány pomocí on-line EC-MS, kdy teplota v iontovém zdroji byla 200 °C, průtoková rychlost byla nastavena na 8 µl/min, potenciál vkládaný na kapiláru byl nastaven pro oba módy na 3,5 kV, tlak dusíku ve zmlžovači byl 15 psi, průtoková rychlost sušícího plynu 5 l/min. Rozsah skenu byl nastaven na 50-800 m/z . Koncentrace zkoumaných látek v dávkovaném roztoku byla $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, kdy výchozí roztoky standardů (v methanolu) byly ředěny směsí 0,01 mol/l octanu amonného a methanolu v poměru 1:1. Během on-line EC-MS experimentů byla nejprve zaznamenána spektra samotného elektrolytu (methanol a 0,01 mol/l octan amonný, 1:1, v/v) při potenciálech pracovní porézní grafitové elektrody 0, 400 a 1000 mV. Následně byla zaznamenána spektra vybraných derivátů fentanylu v potenciálovém rozsahu od 0 až 1000 mV, přičemž od 0 do +300 mV byl zvyšován potenciál po 100 mV a od +300 mV do +1000 mV po 50 mV. Současně s celkovým iontovým proudem byla snímána i kolizní spektra produktů elektrochemických přeměn výchozích látek. Jednotlivá spektra byla následně analyzována pomocí softwaru DataAnalysis 4.2. Spektra získaná z on-line EC-MS a off-line LC-MS experimentů ukázala společné, ale i odlišné reakční produkty.

Výsledky výše uvedených experimentů získané pro jednotlivé fentanyly jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

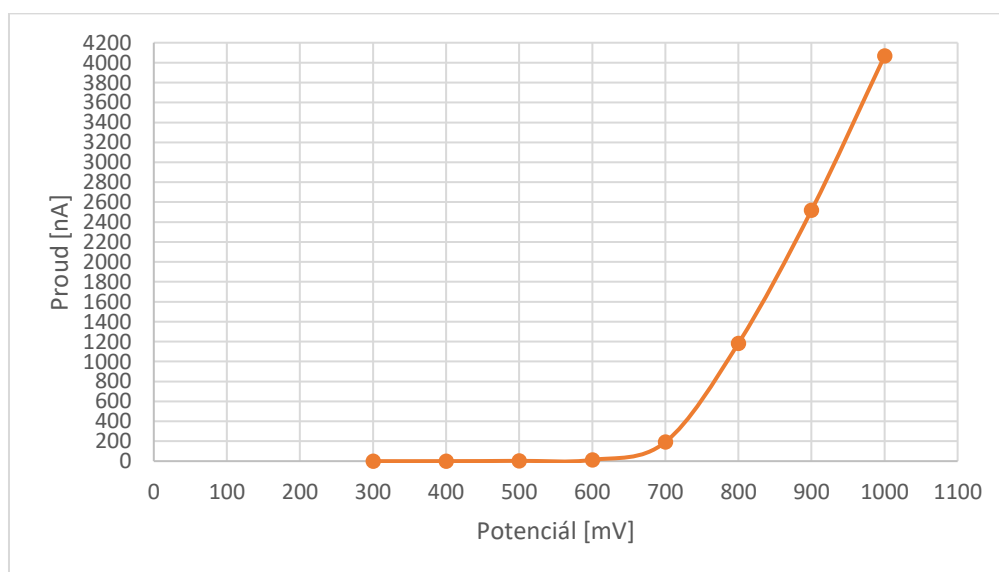
3.1 Furanylfentanyl

Analýza furanylfentanylu pomocí HPLC-UV-ECD poskytla mez detekce pro všechny detektory $1,51 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³ (5,6 ng/ml), která byla určena jako trojnásobek poměru signál/šum. Mez stanovitelnosti byla určena pro všechny detektory $5,22 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³ (19,5 ng/ml) a odpovídá prvnímu bodu kalibrační přímky (pro nejnižší stanovitelnou koncentraci). V tabulce č. 8 je přehled regresních parametrů kalibračních křivek s koeficienty determinace.

Tabulka č. 8 – Regresní parametry kalibračních křivek $y = a + bx$ furanylfentanylu pro HPLC-UV-ECD, n=počet kalibračních bodů

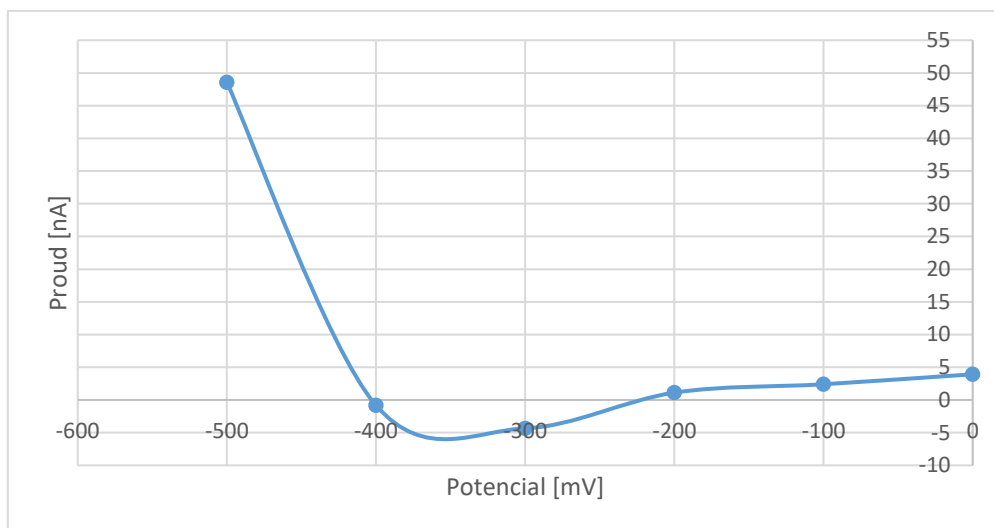
Detekce	$a \pm s_a$ [pro UV/VIS mAU, pro ECD nA]	$b \pm s_b$ [pro UV/VIS mAU·ml/g, pro ECD nA·ml /g]	n	R ²	LOD [nmol/dm ³]	LOQ [nmol/dm ³]
UV/VIS (260 nm)	-0,016±0,056	900,8±4,2	12	0,9998	15,06	52,16
ECD 1. pracovní elektroda	31,2±15,8	90417,3±1187,2	12	0,9983	15,06	52,16
ECD 2. pracovní elektroda	4,38±2,37	47514,6±177,9	12	0,9999	15,06	52,16

Z hydrodynamického voltamogramu (graf č. 1) je zřetelné, že oxidace probíhá již při potenciálu +600 mV a strmě roste až po +1000 mV. V důsledku omezení – výrobce nedoporučuje vkládat na pracovní elektrodu potenciál vyšší než 1000 mV – nebylo možné doměřit tento hydrodynamický voltamogram do obvyklého sigmoidního tvaru.



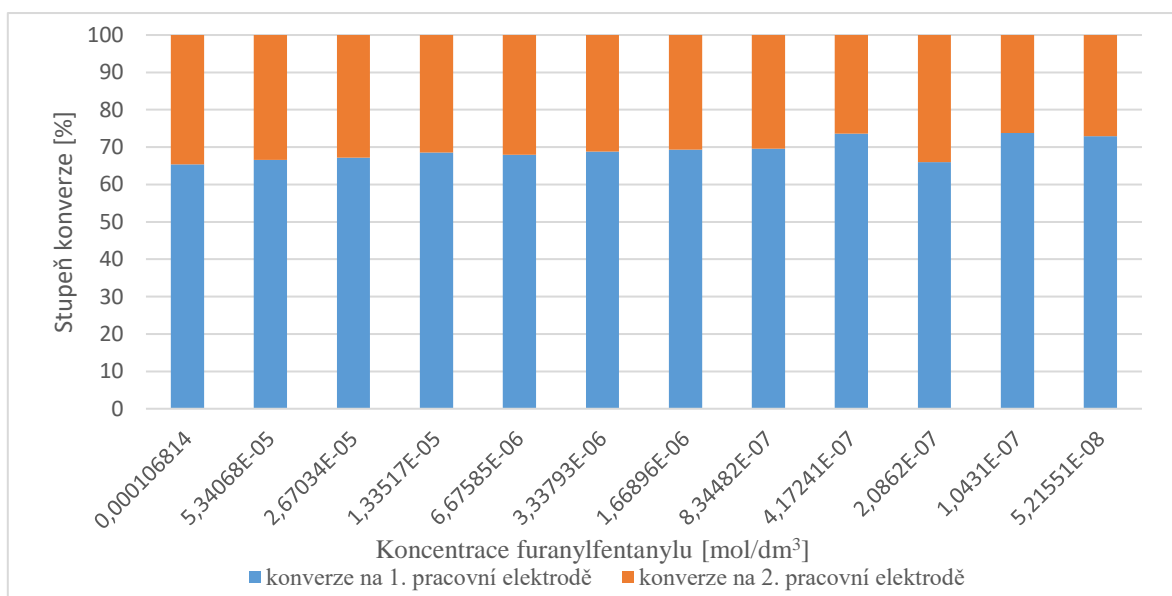
Graf č. 1 – Voltamogram furanylfentanylu – potenciál vkládán na první pracovní elektrodu

Ve druhém hydrodynamickém voltamogramu (graf č. 2) byl zaznamenán katodický proud v rozmezí od -400 do -200 mV, kdy se pravděpodobně redukuje produkty vzniklé oxidací na první pracovní elektrodě. Nárůst proudu při zápornějších potenciálech může být důsledkem toho, že furanylfentanyl při tomto potenciálu vykazuje katalytické účinky na vývoj H₂ a dochází k posunutí potenciálu na referentní hydrogenpaládiové elektrodě.



Graf č. 2 – Hydrodynamický voltamogram furanylfentanylu – potenciál byl měněn na druhé pracovní elektrodě při konstantním potenciálu první pracovní elektrody 900 mV

Stupeň konverze na první elektrodě s klesající koncentrací furanylfentanylu nadávkovaného do HPLC-UV-ECD mírně roste ve prospěch první pracovní elektrody (graf č. 3).



Graf č. 3 – Stupeň konverze na obou pracovních elektrodách při konstantním potenciálu $E_1 = E_2 = 900$ mV v závislosti na koncentraci pro furanylfentanyl

Hmotnostní spektrum samotného furanylfentanylu získané při LC-MS analýze (retenční čas furanyl fentanylu je 3,538 min) bylo porovnáno se spektrem furanylfentanylu z EC-MS (obrázek 13 v příloze). Součástí obrázku č. 13 jsou i navrhované fragmenty iontu m/z 375. V EC-MS spektru iontu m/z 375 lze naléznout fragment m/z 271 m/z , který náleží furanylnorfentanylu.

Při on-line EC-MS furanylfentanylu bylo zjištěno, že při vkládání potenciálu +400 mV se nejprve objevuje jeho oxidační produkt, ion m/z 271. Kolizní spektrum a spektrum z LC-MS analýzy (obrázek 14 v příloze) se vzájemně podobají. Ion m/z 271 měl při separaci LC-MS retenční čas 1,09 minuty. Ion m/z 271 bývá v literatuře [44] popisován jako ion furanylu norfentanylu, který bývá majoritně zastoupen při metabolismu furanylfentanylu a je dále biologicky neaktivní.

Při zvyšování potenciálu vkládaného na EC celu dochází k objevení dalšího oxidačního produktu, konkrétně iontu m/z 405, který lze nalézt i v HPLC-MS (retenční čas 3,205 min). Tento iont byl identifikován jako methoxy-furanylfentanyl. Na obrázku 15 v příloze jsou spektra tohoto produktu společně s navrženými strukturami jeho fragmentů.

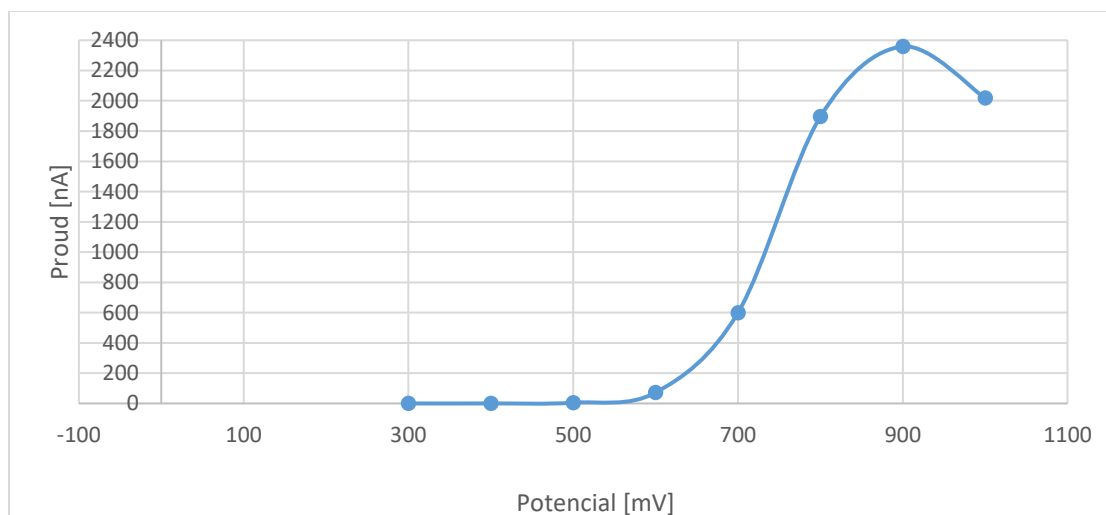
3.2 Výsledky fentanylu

Analýza samotného fentanylu pomocí HPLC-UV-ECD poskytovala mez stanovitelnosti pro UV/VIS detekci $4,64 \cdot 10^{-7}$ mol/dm³ (156 ng/ml). Mez stanovitelnosti pro ECD detekci vykazovala na obou elektrodách nastavených na potenciál +900 mV $5,81 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³ (19,55 ng/ml). První bod kalibrační křivky odpovídá hodnotě LOQ. Mez detekce vykazovala pro UV/VIS detekci $1,41 \cdot 10^{-7}$ mol/dm³ (47,4 ng/ml). V případě elektrochemické detekce byla LOD $1,76 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³ (5,9 ng/ml). Příčina vyššího LOD a LOQ pro fentanyl oproti furanylfentanylu je způsobena odlišnou elektronovou strukturou fentanylu, v níž chybí konjugovaný furanylový kruh jako další chromofor. V tabulce č. 9 je přehled regresních parametrů kalibračních křivek s koeficienty determinace.

Tabulka č. 9 – Regresní parametry kalibračních křivek $y = a + bx$ fentanylu pro HPLC-UV-ECD

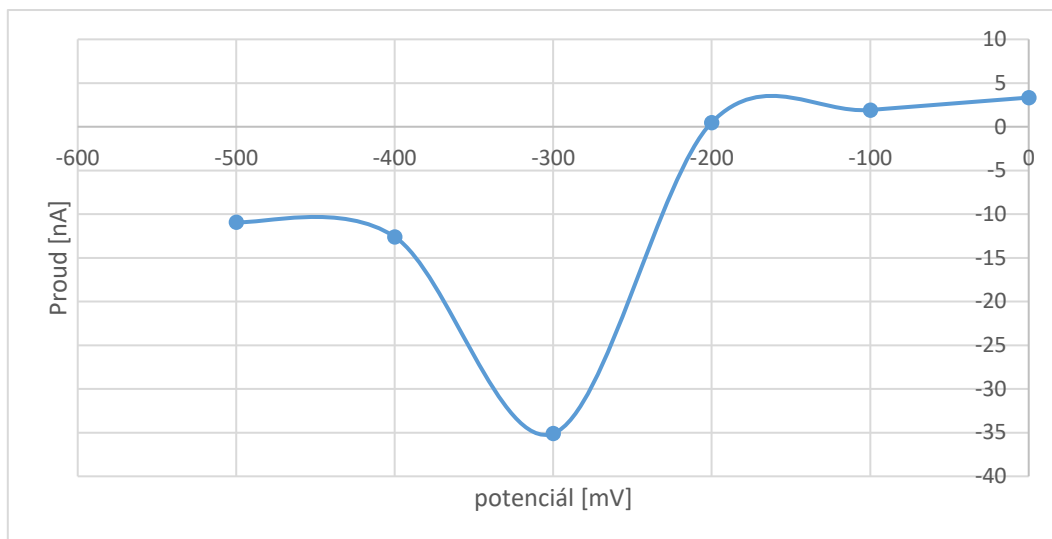
Detekce	$a \pm s_a$ [pro UV/VIS mAU, pro ECD nA]	$b \pm s_b$ [pro UV/VIS mAU·ml/g, pro ECD nA·ml/g]	n	R ²	LOD [nmol/dm ³]	LOQ [nmol/dm ³]
UV/VIS	-0,007 ± 0,002	55,15 ± 0,27	7	0,9999	140,72	464,38
ECD 1. pracovní elektroda	16,05 ± 8,58	182648 ± 1232	11	0,9996	17,59	58,05
ECD 2. pracovní elektroda	-6,20 ± 3,01	81349,9 ± 431,8	11	0,9997	17,59	58,05

Hydrodynamický voltamogram fentanylu zaznamenaný na první pracovní elektrodě ECD (graf č. 4) vykazuje maximum při +900 mV. Tento potenciál byl proto zvolen jako nejvhodnější pro detekci fentanylu. Dále je z grafu patrné, že oxidace fentanylu nastává již při potenciálu +600 mV, kdy dochází ke zřetelnému nárůstu proudové odezvy. Při tomto potenciálu bývá nejčastějším produktem elektrochemické oxidace právě norfentanyl, jak bylo zjištěno při EC-MS experimentech.



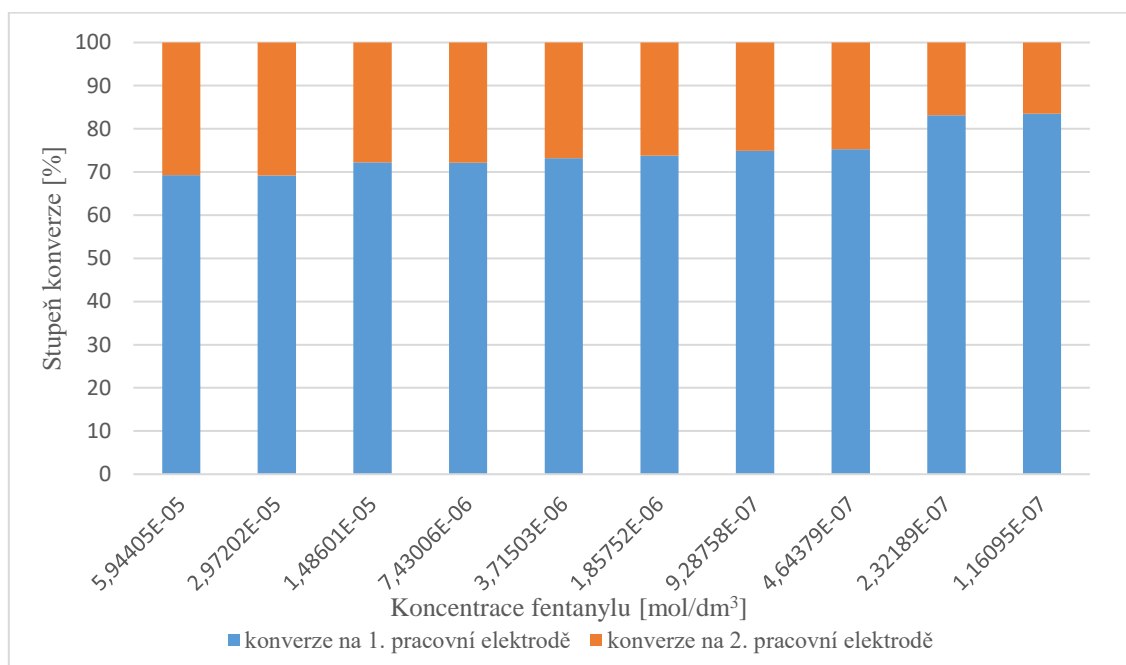
Graf č. 4 – Hydrodynamický voltamogram fentanylu – potenciál vkládán na první pracovní elektrodu

Z hydrodynamického voltamogramu pro záporný potenciál vkládaný na 2. pracovní elektrodu při konstantním potenciálu +900 mV na 1. elektrodě (graf č. 5) je jasně pozorovatelné, že optimální potenciál pro detekci produktů vznikajících při anodické oxidaci fentanylu je -300 mV.



Graf č. 5 – Hydrodynamický voltamogram fentanylu – potenciál byl měněn na druhé pracovní elektrodě při konstantním potenciálu první pracovní elektrody 900 mV

Pokud byl na obou pracovních elektrodách nastaven potenciál 900 mV, stupeň konverze na první elektrodě s klesající koncentrací fentanylu nadávkovaného do HPLC-UV-ECD mírně rostl (viz graf č. 5), podobně jako tomu bylo u furanylfentanylu.



Graf č. 5 – Stupeň konverze na obou pracovních elektrodách při konstantním potenciálu $E_1 = E_2 = 900$ mV v závislosti na koncentraci pro fentanyl

On-line EC-MS experimenty s fentanylem ukázaly, že prvotní oxidační produkt vzniká při +400 mV, stejně jako v případě furanylfentanylu. Protonovaná molekula tohoto oxidačního produktu má m/z 233. Analýzou kolizního spektra tohoto iontu byl produkt identifikován jako norfentanyl. Tento N-dealkylovaný produkt je stejně jako v případě furanylfentanylu majoritním produktem při biotransformaci. Norfentanyl byl nalezen i HPLC-MS analýzou v roztoku po elektrolýze, kdy má tento oxidační produkt retenční čas 0,974 minut. Hmotnostní spektra získaná při EC-MS a HPLC-MS jsou porovnána na obrázku 16 v příloze.

Dalším oxidačním produktem, který se objevuje při potenciálu +450 mV, je iont m/z 349, který je pozorovatelný pouze v rozmezí +450 mV až +550 mV (obrázek 17 v příloze). Tento iont byl přítomný pouze při on-line EC-MS analýze fentanylu. Možná příčina je nestabilní struktura tohoto iontu. Na obrázku 17 je vyobrazena navrhaná struktura iontu společně s jeho fragmenty.

Předposledním oxidačním produktem, který se objevoval při EC-MS a v tomto případě se objevil i při HPLC-MS analýze elektrolyzátu fentanylu, je iont m/z 351. Objevil se při vkládání potenciálu +500 mV na pracovní elektrodu. Na obrázku 18 v příloze je možno pozorovat podobnost spekter a návrhy struktury iontu společně s jeho fragmenty.

Poslední oxidační produkt fentanylu poskytl iont m/z 353. Hmotnostní spektrum z HPLC-MS analýzy a kolizní spektrum iontu m/z 353 z EC-MS se v zásadě neliší (obrázek 19 v příloze). Navržená struktura a fragmenty jsou součástí obrázku. Neshoda spekter může být zapříčiněna nízkou intenzitou při HPLC-MS, možnou koelucí jiných oxidačních produktů fentanylu nebo překryvem EC-MS signálu různých iontů se stejným poměrem m/z . Retenční čas tohoto iontu byl 1,873 minut.

3.3 Sufentanil

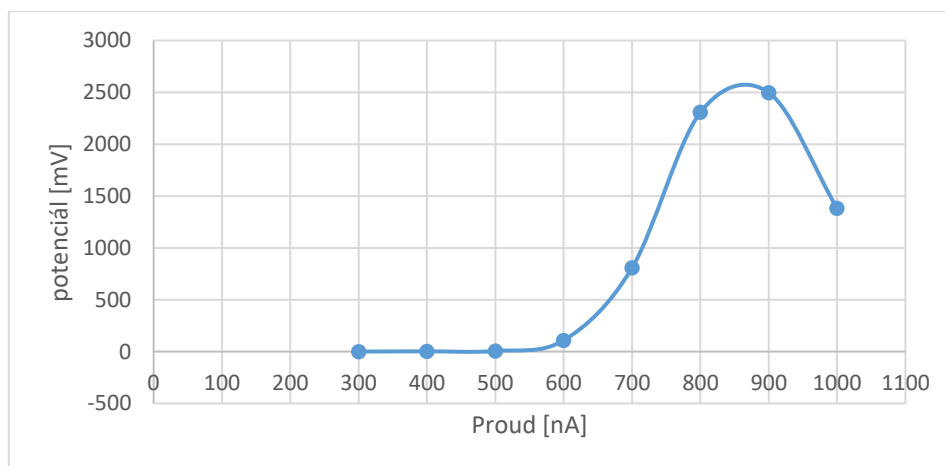
HPLC-UV-ECD analýza sufentanylu poskytovala mez stanovitelnosti $8,08 \cdot 10^{-7}$ mol/dm³ (312 ng/ml) pro UV/VIS detekci. Mez stanovitelnosti pro EC detekci poskytovaly obě pracovní elektrody při potenciálu na elektrodě +900 mV $1,01 \cdot 10^{-7}$ mol/dm³ (39 ng/ml). Mez detekce pro UV/VIS detekci vykazovala hodnotu $2,45 \cdot 10^{-7}$ mol/dm³ (95 ng/ml), pro elektrochemickou detekci vykazovaly obě pracovní elektrody při potenciálu 900 mV mez detekce $3,06 \cdot 10^{-8}$ mol/dm³ (12 ng/ml). Hodnoty LOQ a LOD byly určeny stejnou metodou jako v případě

furanylfentanylu a fentanylu. V tabulce č. 10 se nachází přehled regresních parametrů kalibračních křivek s koeficienty determinace.

Tabulka č. 10 – Regresní parametry kalibračních křivek $y = a + bx$ sufentanilu pro HPLC-UV-ECD

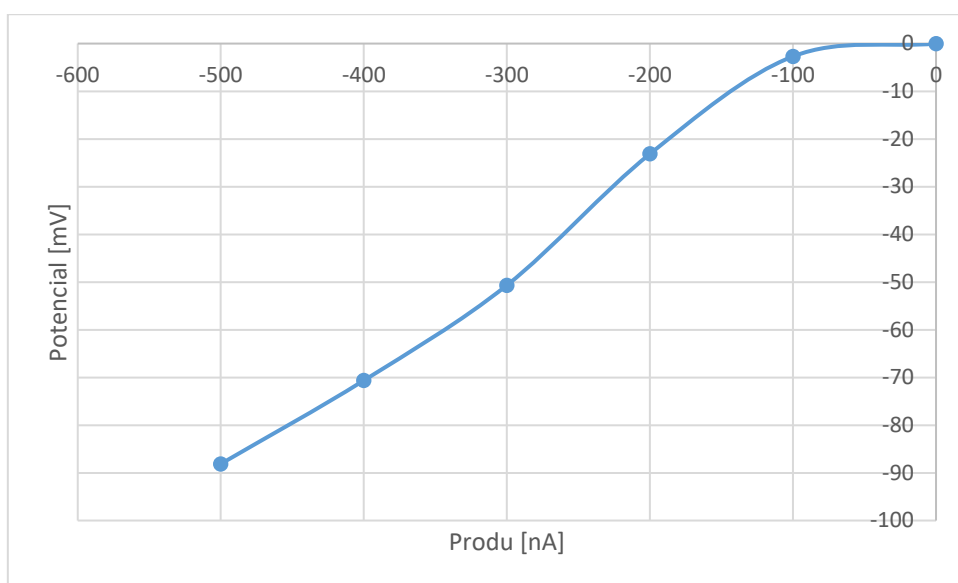
Detekce	$a \pm s_a$ [pro UV/VIS mAU, pro ECD nA]	$b \pm s_b$ [pro UV/VIS mAU·ml/g, pro ECD nA·ml/g]	n	R^2	LOD [nmol/dm ³]	LOQ [nmol/dm ³]
UV/VIS	-0,003 ± 0,001	33,7034 ± 0,1155	7	0,9999	244,98	808,43
ECD 1. pracovní elektroda	13,87 ± 10,27	115127 ± 1406	10	0,9988	30,62	101,05
ECD 2. pracovní elektroda	14,54 ± 5,75	87611 ± 787	10	0,9994	30,62	101,05

Hydrodynamický voltamogram sufentanilu na 1. ECD elektrodě (graf č. 6) má stejně jako v případě fentanylu sigmoidní tvar. Největší proud byl registrován při potenciálu 900 mV. Strmý nárůst proudu pozorujeme po překročení potenciálu 600 mV, podobně jako tomu bylo u fentanylu.



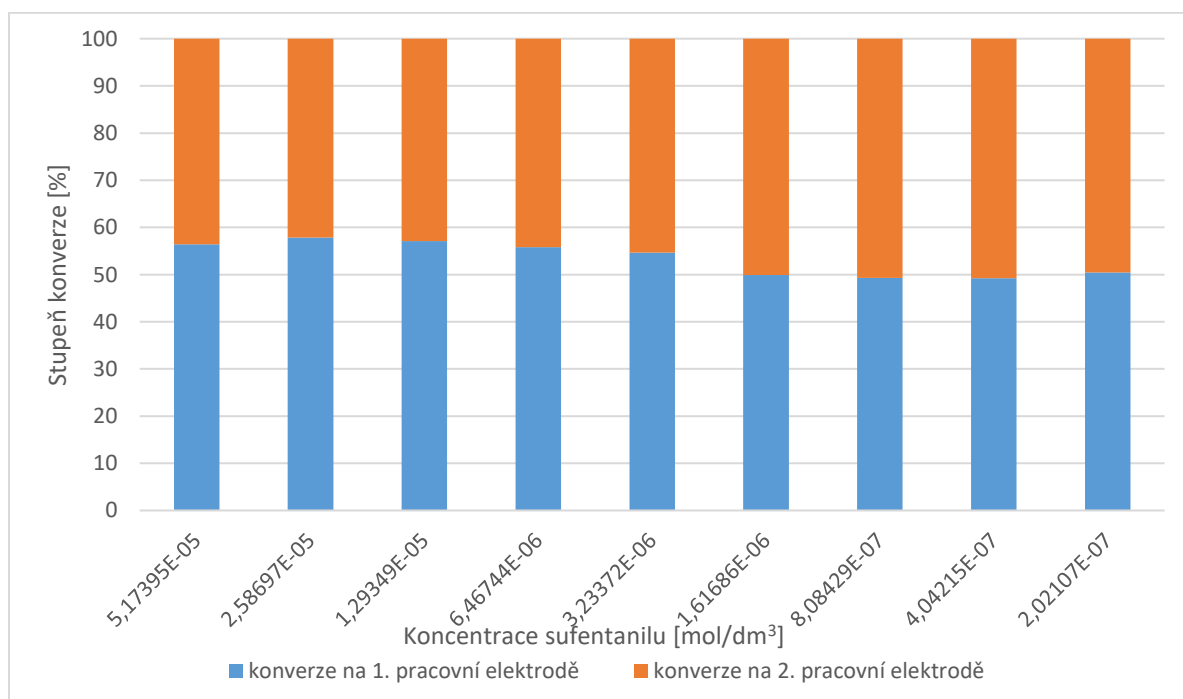
Graf č. 6 – Hydrodynamický voltamogram sufentanilu – potenciál vkládán na první pracovní elektrodu

V případě druhého hydrodynamického voltamogramu registrovaném na 2. ECD elektrodě při konstantním potenciálu 900 mV na 1. elektrodě (graf č. 7) pozorujeme katodický proud rostoucí v celém rozmezí potenciálů -500 až 0 mV.



Graf č. 7 – Hydrodynamický voltamogram sufentanilu – potenciál byl měněn na druhé pracovní elektrodě při konstantním potenciálu pracovní elektrody 900 mV

Stupeň konverze se na rozdíl od fentanylu a furanylfentanylu s klesající koncentrací sufentanilu příliš nemění, dle tabulky č. 16 v příloze se spíše zdá, že s klesající koncentrací naopak klesá (graf č. 8).



Graf č. 8 – Stupeň konverze sufentanilu na obou pracovních elektrodách při konstantním potenciálu $E_1 = E_2 = 900$ mV v závislost na koncentraci pro sufentanil

Sufentanil jako výchozí látka s protonovanou molekulou m/z 387 se objevil na HPLC-MS chromatogramu v retenčním čase 4,25 minut. Při EC-MS experimentech intenzita iontu m/z 387 klesala s rostoucím vkládaným potenciálem. Konkrétně od 500 mV byl v MS spektru zcela minoritní až v šumu. Spektra sufentanilu získaná při HPLC-MS a EC-MS/MS analýze jsou zobrazena na obrázku 20 v příloze, včetně navrhovaných struktur fragmentových iontů. Podobnost obou spekter je patrná. Na rozdíl od předchozích derivátů nevznikal fragmentací primárně iont norsufentanilu (m/z 277), ale ion m/z 238. Může to být zapříčiněno přítomností kvarterního uhlíku na piperidinovém kruhu.

Při on-line EC-MS oxidaci sufentanilu byl nejdříve produkován při potenciálu +400 mV iont m/z 277 odpovídající norsufentanilu. Retenční čas norsufentanilu při analýze HPLC-MS byl 1,81 minut. Kolizní spektrum z EC-MS/MS a spektrum z HPLC-MS analýzy se téměř shodují a lze tedy s velkou pravděpodobností vyloučit koeluci jiných látek při HPLC-MS. Navrhovaná struktura iontu s jeho fragmenty jsou na obrázku 21 v příloze. Stejně jako v případě fentanylu a furanylfentanylu, norsufentanil vzniká při metabolismu sufentanilu jako majoritní neaktivní produkt.

Další oxidační produkt, který byl nalezen při EC-MS i HPLC-MS, má ion m/z 417 a retenční čas 3,92 minuty. Hmotnostní spektrum z HPLC-MS analýzy a kolizní spektrum z EC-MS/MS ukazuje obrázek 22 v příloze.

Oxidační produkty sufentanilu, které nebyly pozorovány při analýze EC-MS, byly ionty m/z 140, s retenčním časem 0,97 min (obrázek 23 v příloze) a iont m/z 236 s retenčním časem 1,17 minuty (obrázek 24 v příloze).

Při studiu hmotnostního spektra z HPLC-MS byly zpozorovány dva produkty oxidace, které měly stejný poměr m/z 415, avšak lišily se retenčními časy. První, méně polární oxidační produkt, by mohl odpovídat diketo-sufentanilu, jehož navrhovaná struktura je zobrazena na obrázku 25 v příloze spolu s jeho fragmenty. Retenční čas méně polárního oxidačního produktu byl 2,21 minut. Druhý produkt, pojmenovaný methoxy-sufentanil, byl detekován v čase 4,32 minut (obrázek 26 v příloze). Oba tyto produkty se liší zejména svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a fragmentací výchozího iontu. Bohužel nebylo možné pomocí EC-MS/MS ion 415 izolovat a následně fragmentovat.

Poslední oxidační produkt, který se nalézal jak v EC-MS tak v HPLC-MS, poskytoval ion m/z 431 obrázek 27 v příloze. Kolizní a hmotnostní spektrum z HPLC-MS analýzy

poskytují odlišné píky s výjimkou fragmentu m/z 301. Ion m/z 431 se objevuje minoritně při potenciálu od +450 mV a od +850 mV. V rozmezí +450 až +850 mV je jeho intenzita v porovnání s m/z 415 iontem výrazně menší.

4 Závěr

Byla vyvinuta metoda pro stanovení fentanylu, sufentanilu a v současné době nejvíce problémového furanylfentanylu, a to technikou HPLC s UV/VIS detekcí a elektrochemickou detekcí. Výsledky této práce mohou být využity laboratořemi nedisponujícími nákladnou HPLC-MS instrumentací při analýze nebezpečných psychotropních látek, zejména furanylfentanylu, který je v dnešní době nejvíce zneužíván jako náhrada za drahý heroin. Zároveň by mohla předložená práce pomoci při rychlé analýze při akutních intoxikacích fentanylem nebo jeho deriváty. Mez stanovitelnosti při použití UV/VIS detektoru pro fentanyl a sufentanil byla srovnatelná s prací [49], kde fentanyl a jeho deriváty byly analyzovány pomocí HPLC-DAD-AD, přičemž fenology při DAD vykazovaly LOD 1,66 $\mu\text{g/ml}$. V případě furanylfentanylu vykazovala předložená metoda této práce vyšší LOD o 2 řády. V této diplomové práci byly při analýze fentanylu, furanylfentanylu a sufentanilu pomocí ECD detekce dosaženy hodnoty LOD v porovnání s DAD pro fentanyl o 1 řád nižší.

Bylo studováno elektrochemické chování vybraných psychotropních látek prostřednictvím cyklické a diferenčně pulzní voltametrie. Ze získaných voltamogramů bylo možno určit nejvhodnější potenciál k jejich elektrolýze. Elektrolyzované roztoky byly ponechány jeden den v lednici a analyzovány metodou HPLC-MS. Vedle toho byla použita metoda on-line EC-MS umožňující elektrochemicky generovat a ihned detekovat i málo stabilní reakční produkty. Z výsledků analýzy hmotnostních spekter je možné nalézt shody mezi produkty elektrochemických přeměn studovaných fentanylů a metabolickými produkty, které vznikají v živých organismech. Jako hlavní produkt elektrochemické oxidace všech zkoumaných fentanylů byla nalezena jejich N-dealkylovaná forma, (v literatuře označovaná předložkou nor), která je u všech tří látek popisována jako hlavní produkt enzymatického metabolismu [44, 47, 48].

Studium produktů elektrochemické oxidace odhalilo, že hlavním reakčním centrem fentanylu, furanylfentanylu a sufentanilu je piperidinový kruh, na jehož atom dusíku je navázána alifatická část. Hlavním mechanismem elektrochemické oxidace všech tří fentanylů je oxidativní N-dealkylace. Analogická reakce probíhá při enzymatické metabolizaci, jak *in vivo*, tak *in vitro*. Další reakční místa, která se nabízejí na oxidaci, jsou v poloze *ortho*, popřípadě *para* od dusíku na piperidinovém kruhu, jak bylo potvrzeno v práci [58]. Ze sterických důvodů nejpravděpodobnější místo oxidace (dehydrogenace) bude na uhlíku v poloze *ortho*. Vzniklý

iminiový kation může podléhat následným reakcím, např. vodou za vzniku o-hydroxyderivátů, které se dále mohou oxidovat na příslušné ketony [58].

5 Seznam zkratek

Zkratka	Termín
AD	amperometrický detektor
AdSV	„Adsorptive stripping voltammetry“
ATP	Adenosintrifosfát
AMX	N-phenylpropionamid
B	Magnetická indukce
CE	Kapilární elektroforéza
CNS	Centrální nervová soustava
CYP	Cytochrom
Da	Dalton
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
ED ₅₀	„Effective dose“ – efektivní dávka, která vyvolá u 50 % uživatelů kognitivní či behaviorální změny
EI	„Electron ionization“ – ionizace elektronem
E _k	Kinetická energie
eV	Elektronvolt
FBA	2-[(furan-2-carbonyl)(methyl)amino]benzoová kyselina
GC	Plynová chromatografie
GDP	Guanosindifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
HCOOH	kyselina mravenčí
HPLC	„High performance liquid chromatography“ – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LD ₅₀	„Lethal dose“ – smrtelná dávka, která zabije 50 % uživatelů
L-L	„Liquid–liquid extraction“ – extrakce kapalina – kapalina
Log P	Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol – voda
LOD	„Limit of detection“ – limit detekce
LOQ	„Limit of quantification“ – limit stanovení
m	hmotnost
MF	mobilní fáze
MS	„Mass spectrometry“ – Hmotnostní spektrometrie
NaOH	Hydroxid Sodný
pKa	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
SDME	„Static Mercury drop electrode“
SF	Stacionární fáze
SPCE	„Screen printed carbon electrode“
SPE	„Solid Phase extraction“ – extrakce na tuhé fázi
SSRI	„Serotonin selective reuptake inhibitor“ – selektivní serotoninový inhibitor zpětného vychytávání
TD ₅₀	„Toxic dose“ – toxická dávka, která vyvolá u 50 % uživatelů příznaky otravy
UDP	Uridindifosfát
z	Náboj

6 Literatura

1. Shiloh, R., et al., *Atlas of Psychiatric Pharmacotherapy, Second Edition*. 2006: CRC Press.
2. Stolerman, I.P., *Encyclopedia of psychopharmacology*. 2010, Berlin ; London: Springer
3. Rašková, H., J.i. Vaněček, and I. Šeferna, *Vybrané kapitoly z farmakologie*. 1. vyd. ed., Praha,: Univ, Karlova.
4. Lüllmann, H., *Color Atlas of Pharmacology*. 2005.
5. Jiřina, M. and a. kolektiv, *Farmakologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2007.
6. Bullock, S., E. Manias, and A. Galbraith, *Fundamentals of Pharmacology*. 2006: Pearson Education Australia.
7. Karch, S.B., *Drug abuse handbook*. 2nd ed. 2007, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis. 1267 p.
8. Studzian, M., G. Bartosz, and L. Pulaski, *Endocytosis of ABCG2 drug transporter caused by binding of 5D3 antibody: trafficking mechanisms and intracellular fate*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2015. **1853**(8): p. 1759-1771.
9. Gruenberg, J. and F.R. Maxfield, *Membrane transport in the endocytic pathway*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(4): p. 552-63.
10. Miroslav, D. and a. kolektiv, *Farmakokinetika*. 2006.
11. Misailidi, N., et al., *Furanylfentanyl: another fentanyl analogue, another hazard for public health*. *Forensic Toxicology*, 2018. **36**(1): p. 1-11.
12. Peterson, L.A., *Reactive Metabolites in the Biotransformation of Molecules Containing a Furan Ring*. *Chemical Research in Toxicology*, 2013. **26**(1): p. 6-25.
13. Crowell-Davis, S. and T. Murray, *Veterinary Psychopharmacology*. *Veterinary Psychopharmacology*, 2006: p. 1-270.
14. Jones, C.R., et al., *Gut Wall Metabolism. Application of Pre-Clinical Models for the Prediction of Human Drug Absorption and First-Pass Elimination*. *Aaps Journal*, 2016. **18**(3): p. 589-604.
15. Yoon, I.S., et al., *Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol*. *Drug Metabolism Reviews*, 2011. **43**: p. 75-76.
16. Brandenberger, H. and R.A.A. Maes, *Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists*. 1997: W. de Gruyter.
17. Banks, M., et al., *Designer Drug Efficacy: Application of Receptor Theory to Fixed-Proportion Mu-Opioid Agonist and Antagonist Mixtures in Rhesus Monkeys*. *Neuropsychopharmacology*, 2017. **42**: p.
18. Rang, H.P., *The receptor concept: pharmacology's big idea*. *Br J Pharmacol*, 2006.
19. Porter, C.C. and C.A. Stone, *Biochemical mechanisms of drug action*. *Annu Rev Pharmacol*, 1967. **7**: p.
20. Swinney, D.C., *Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success?* *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(9): p. 801-8.
21. Peckham, A.M., A. De La Cruz, and R.L. Dufresne, *Kappa opioid receptor antagonism: Are opioids the answer for treatment resistant depression?* *Ment Health Clin*, 2018. **8**(4): p. 175-183.
22. Haley, J.S., *The Therapist's Guide to Psychopharmacology: Working With Patients, Families and Physicians to Optimize Care*. *Families Systems & Health*, 2010. **28**(2): p. 190-191.
23. Megarbane, B., C. Lagard, and L. Chevillard, *Tramadol: Distinguishing the Pathophysiology of Serotonin Syndrome and Seizures*. *Am J Med*, 2018. **131**(11): p. 487.
24. Derry, S., et al., *Fentanyl for neuropathic pain in adults*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **10**: p.
25. Feerman, D.E. and J.M. Lasker, *Metabolism of fentanyl, a synthetic opioid analgesic, by human liver microsomes. Role of CYP3A4*. *Drug Metab Dispos*, 1996. **24**(9): p. 932-9.
26. Labroo, R.B., et al., *Fentanyl Metabolism by Human Hepatic and Intestinal Cytochrome P450 3A4: Implications for Interindividual Variability in Disposition, Efficacy, and Drug Interactions*. *Drug Metabolism and Disposition*, 1997. **25**(9): p. 1072-1080.

27. Armenian, P., et al., *Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review*. Neuropharmacology, 2018. **134**(Pt A): p. 121-132.
28. Liu, C., et al., *The identification and analytical characterization of 2,2'-difluorofentanyl*. Vol. 10. 2017.
29. O'Neil, M.J., et al., *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 15th ed. 2013, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
30. *Fentanyl Experimental and Predictated data*. staženo dne 21. 10. 2018; http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3228.html?rid=7a3c75e6-486c-4408-b0db-4713a88fb75d&page_num=0.
31. Thurlkill, R.L., et al., *pKa of fentanyl varies with temperature: implications for acid-base management during extremes of body temperature*. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 2005. **19**(6): p. 759-762.
32. Concheiro, M., et al., *Postmortem Toxicology of New Synthetic Opioids*. Frontiers in Pharmacology, 2018.
33. Shoff, E.N., et al., *Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn*. Journal of Analytical Toxicology, 2017. **41**(6): p. 484-492.
34. Smith, H.S., *Opioid Metabolism*. Mayo Clinic Proceedings, 2009. **84**(7): p. 613-624.
35. Guillon, J., et al., *Possible involvement of multiple cytochrome P450s in fentanyl and sufentanil metabolism as opposed to alfentanil*. Biochemical Pharmacology, 1997. **53**(11): p. 1613-1619.
36. Martucci, H.F.H., et al., *Distribution of furanyl fentanyl and 4-ANPP in an accidental acute death: A case report*. Forensic Sci Int, 2018. **283**: p.
37. *Furanylfentanyl Experimental and Predictated data* staženo dne 28.10.2018; <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14921702.html>.
38. Watanabe, S., et al., *In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Studies for the New Synthetic Opioids Acetylfentanyl, Acrylfentanyl, Furanylfentanyl, and 4-Fluoro-Isobutyrylfentanyl*. AAPS J, 2017. **19**(4): p. 1102-1122.
39. Labutin, A., et al., *Identification of Furanoylfentanil and its Metabolites in Human Urine*. Vol. 07. 2017.
40. *Sufentanil*. staženo dne 20. 9. 2018; <https://www.rxlist.com/sufenta-drug.htm#medguide>.
41. *Sufentanil Experimental and Predictated data*. staženo dne 2. 10. 2018; http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.38043.html?rid=b6eba5f8-725f-4caf-8032-91e329d3bfac&page_num=0.
42. Malkawi, A.H., A.M. Al-Ghananeem, and P.A. Crooks, *Development of a GC-MS assay for the determination of fentanyl pharmacokinetics in rabbit plasma after sublingual spray delivery*. Aaps Journal, 2008. **10**(2): p. 261-267.
43. Skulska, A., M. Kala, and A. Parczewski, *Fentanyl and its analogues in clinical and forensic toxicology*. Przegl Lek, 2005. **62**(6): p. 581-4.
44. Nguyen, A., M.M. Goggin, and G.C. Janis, *Identification of Unique Metabolites of the Designer Opioid Furanyl Fentanyl*. Journal of Analytical Toxicology, 2017. **41**(5): p. 367-375.
45. Ahuja, S. and M. Dong, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. 2005: Elsevier Science.
46. Dong, M.W., *Modern HPLC for Practicing Scientists*. 2006: Wiley.
47. Strayer, K.E., et al., *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. **3**(1): p. 514-523.
48. Lurie, I.S. and R. Iio, *Use of multiple-reaction monitoring ratios for identifying incompletely resolved fentanyl homologs and analogs via ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(9): p. 1515-1519.
49. Elbardisy, H.M., et al., *Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection*. Analytical Methods, 2019. **11**(8): p. 1053-1063.

50. Strano-Rossi, S., et al., *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, 2011. **399**(4): p. 1623-1630.
51. Strano-Rossi, S., et al., *Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS*. J Appl Toxicol, 2011. **31**(7): p. 649-54.
52. Wong, P.S.H. Ion Trap Mass Spectrometry staženo dne 20.12.2018; <http://currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3c.pdf>.
53. *Electrospray ionization*. staženo dne 22.12.2018; www.waters.com/waters/en_US/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=en_US.
54. Gao, L., et al., *Handheld rectilinear ion trap mass spectrometer*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(17): p. 5994-6002.
55. Guo, H., N.F. Hu, and S.C. Lin, *Adsorptive Stripping Voltammetric Properties of Fentanyl at Hg Electrode*. Talanta, 1994. **41**(11): p. 1929-1932.
56. Goodchild, S.A., et al., *Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl*. Analytical Chemistry, 2019. **91**(5): p. 3747-3753.
57. Dai, H., et al., *Fabrication of a new electrochemiluminescent sensor for fentanyl citrate based on glassy carbon microspheres and ionic liquid composite paste electrode*. Anal Chim Acta, 2009. **647**(1): p. 60-5.
58. Mali'n, T.j., et al., *P450-catalyzed vs. electrochemical oxidation of haloperidol studied by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(9): p. 1231-1240

7 Přílohy

Tabulka č.11 – Data ke kalibrační závislosti pro furanylfentanyl

koncentrace [g/l]	koncentrace [mol/dm ³]	UV/VIS 260 nm			1. pracovní elektroda 900 mV [nA]			2. pracovní elektroda 900 mV [nA]		
		průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	
0,04	0,000106814	35,6542	36,85	36,2521	3490,163	3684,291	3587,227	1805,593	1992,694	1899,144
0,02	5,34068E-05	17,6921	17,6192	17,65565	1855,67	1953,15	1904,41	902,2539	1008,591	955,4223
0,01	2,67034E-05	8,7664	8,655	8,7107	1032,266	1007,343	1019,804	507,8565	487,7367	497,7966
0,005	1,33517E-05	4,3557	4,5642	4,45995	514,8708	565,7004	540,2856	226,6856	268,3838	247,5347
0,0025	6,67585E-06	2,3291	2,2943	2,3117	273,2037	261,2604	267,2321	132,008	119,8301	125,9191
0,00125	3,33793E-06	1,2619	1,1581	1,21	156,4822	132,786	144,6341	68,8232	62,3953	65,60925
0,000625	1,66896E-06	0,622	0,6124	0,6172	70,486	71,6992	71,0926	29,1264	33,7701	31,44825
0,0003125	8,34482E-07	0,3375	0,301	0,31925	39,2833	29,4773	34,3803	15,6789	14,393	15,03595
0,00015625	4,17241E-07	0,1651	0,1555	0,1603	18,9669	18,9838	18,97535	6,0171	7,5939	6,8055
0,000078125	2,0862E-07	0,0726	0,0847	0,07865	9,8736	10,304	10,0888	5,018	5,3705	5,19425
3,90625E-05	1,0431E-07	0,0499	0,0386	0,04425	4,1249	5,5472	4,83605	1,1249	2,3147	1,7198
1,95313E-05	5,21551E-08	0,0207	0,0276	0,02415	2,4188	3,4171	2,91795	0,7374	1,4324	1,0849

Tabulka č.11 – Data ke kalibrační závislosti pro fentanyl

koncentrace [g/l]	koncentrace [mol/dm ³]	UV/VIS 260 nm			1. pracovní elektroda 900 mV [nA]			2. pracovní elektroda 900 mV [nA]			Průměr [nA]
		průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr			
0,02	5,94405E-05	1,0998	1,0996	1,0997	3648,126	3673,565	3660,845	1671,577	1577,288	1624,433	
0,01	2,97202E-05	0,538	0,541	0,5395	1921,794	1726,814	1824,304	824,6738	799,9821	812,328	
0,005	1,48601E-05	0,2692	0,2589	0,26405	999,9245	986,9417	993,4331	396,158	367,5275	381,8428	
0,0025	7,43006E-06	0,1271	0,126	0,12655	495,5073	463,9752	479,7413	188,9637	181,3907	185,1772	
0,00125	3,71503E-06	0,0687	0,0633	0,066	254,9092	253,4581	254,1837	93,0794	93,3009	93,19015	
0,000625	1,85752E-06	0,0292	0,0308	0,03	129,635	131,5678	130,6014	47,5059	45,3674	46,43665	
0,0003125	9,28758E-07	0,0152	0,0115	0,01335	68,4758	60,0008	64,2383	24,0889	18,974	21,53145	
0,00015625	4,64379E-07	0	0	0	38,1828	36,2183	37,20055	13,184	11,2758	12,2299	
0,000078125	2,32189E-07	0	0	0	19,1333	18,9158	19,02455	4,3799	3,3361	3,858	
3,90625E-05	1,16095E-07	0	0	0	9,8065	11,2517	10,5291	2,1514	2,0068	2,0791	
1,95313E-05	5,80474E-08	0	0	0	4,7165	4,8326	4,77455	1,1541	0,9971	1,0756	

Tabulka č.13 – Tabulka č.11 – Data ke kalibrační závislosti pro sufentanil

koncentrace [g/l]	koncentrace [mol/dm ³]	UV/VIS 260 nm			1. pracovní elektroda 900 mV [nA]			2. pracovní elektroda 900 mV [nA]			Průměr [nA]
		průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr	průměr			
0,02	5,17395E-05	0,6657	0,6791	0,6724	2446,868	2125,05	2285,959	1201,423	2331,149	1766,286	
0,01	2,58697E-05	0,3236	0,3361	0,32985	1107,053	1297,223	1202,138	878,723	871,3694	875,0462	
0,005	1,29349E-05	0,1695	0,1591	0,1643	716,3254	570,3523	643,3389	461,4953	505,5185	483,5069	
0,0025	6,46744E-06	0,0795	0,0819	0,0807	281,3921	303,5972	292,4947	229,031	234,4347	231,7329	
0,00125	3,23372E-06	0,0399	0,0376	0,03875	159,0927	158,709	158,9009	137,1839	126,7997	131,9918	
0,000625	1,61686E-06	0,0181	0,0174	0,01775	86,3136	80,6464	83,48	88,0476	79,4127	83,73015	
0,0003125	8,08429E-07	0,0087	0,0089	0,0088	39,0097	37,0607	38,0352	38,8601	39,4359	39,148	
0,00015625	4,04215E-07	0	0	0	18,7566	20,9786	19,8676	19,1131	21,8771	20,4951	
0,000078125	2,02107E-07	0	0	0	10,1394	10,1489	10,14415	9,7665	10,1338	9,95015	
3,90625E-05	1,01054E-07	0	0	0	5,7707	4,114	4,94235	4,6872	4,3235	4,50535	

Tabulka č. 14 – Stupeň konverze furanylfentanylu na obou pracovních elektrodách při konstantním potenciálu $E_1 = E_2 = 900$ mV pro různé koncentrace analytu

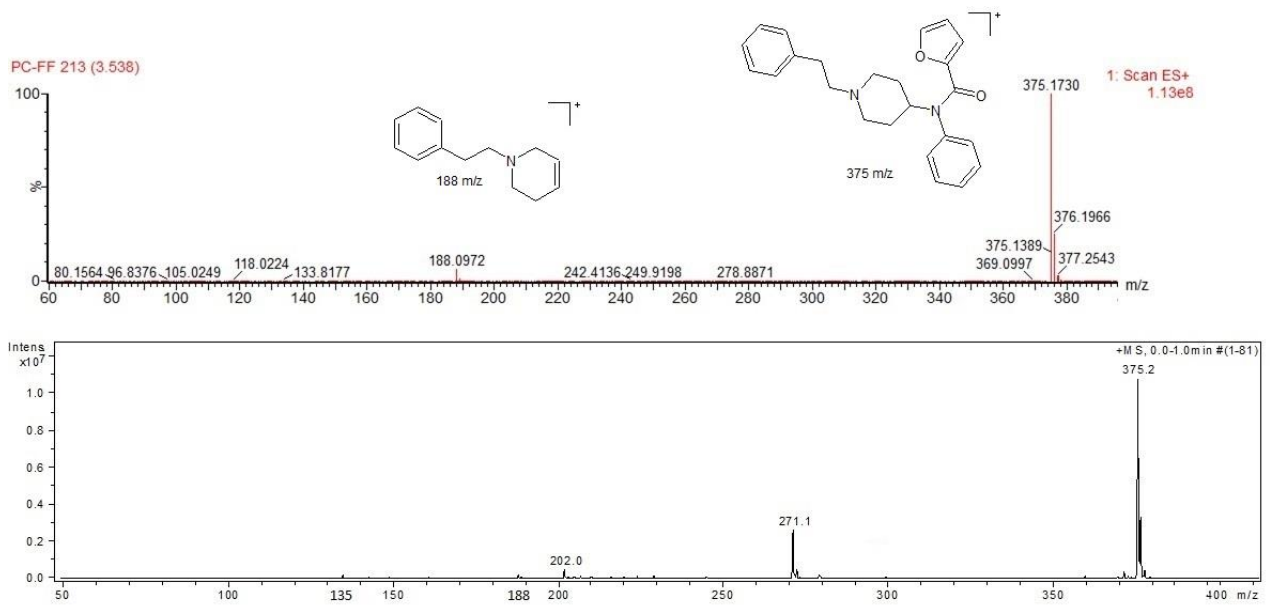
Koncentrace [g/l]	Konverze na 1. ECD elektrodě [%]	Konverze na 2. ECD elektrodě [%]
0,04	65,38	34,62
0,02	66,59	33,41
0,01	67,20	32,80
$5 \cdot 10^{-3}$	68,57	31,43
$2,5 \cdot 10^{-3}$	67,97	32,03
$1,25 \cdot 10^{-3}$	68,79	31,21
$6,25 \cdot 10^{-4}$	69,33	30,67
$3,13 \cdot 10^{-4}$	69,57	30,43
$1,56 \cdot 10^{-4}$	73,60	26,40
$7,81 \cdot 10^{-5}$	66,01	33,99
$3,91 \cdot 10^{-5}$	73,77	26,23
$1,95 \cdot 10^{-5}$	72,90	27,10

Tabulka č. 15 – Stupeň konverze fentanylu na obou pracovních elektrodách při konstantním potenciálu $E_1 = E_2 = 900$ mV pro různé koncentrace analytu

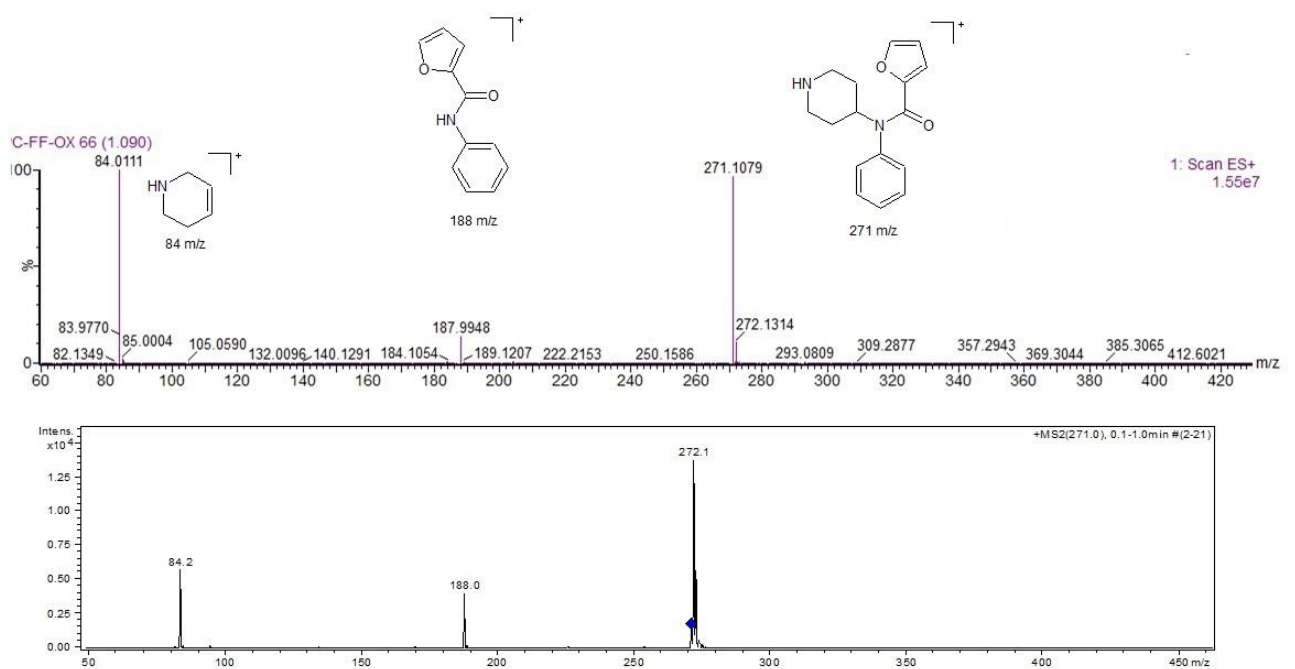
Koncentrace [g/l]	Konverze na 1. ECD elektrodě [%]	Konverze na 2. ECD elektrodě [%]
0,02	69,26	30,74
0,01	69,19	30,81
$5 \cdot 10^{-3}$	72,24	27,76
$2,5 \cdot 10^{-3}$	72,15	27,85
$1,25 \cdot 10^{-3}$	73,17	26,83
$6,25 \cdot 10^{-4}$	73,77	26,23
$3,13 \cdot 10^{-4}$	74,90	25,10
$1,56 \cdot 10^{-4}$	75,26	24,74
$7,81 \cdot 10^{-5}$	83,14	16,86
$3,91 \cdot 10^{-5}$	83,51	16,49
$1,95 \cdot 10^{-5}$	81,61	18,39

Tabulka č. 16 – Stupeň konverze sufentanilu na obou pracovních elektrodách při konstantním potenciálu $E_1 = E_2 = 900$ mV pro různé koncentrace analytu

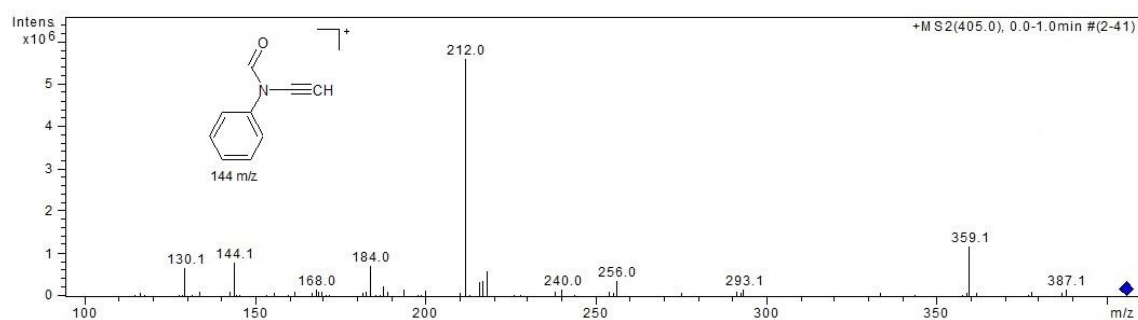
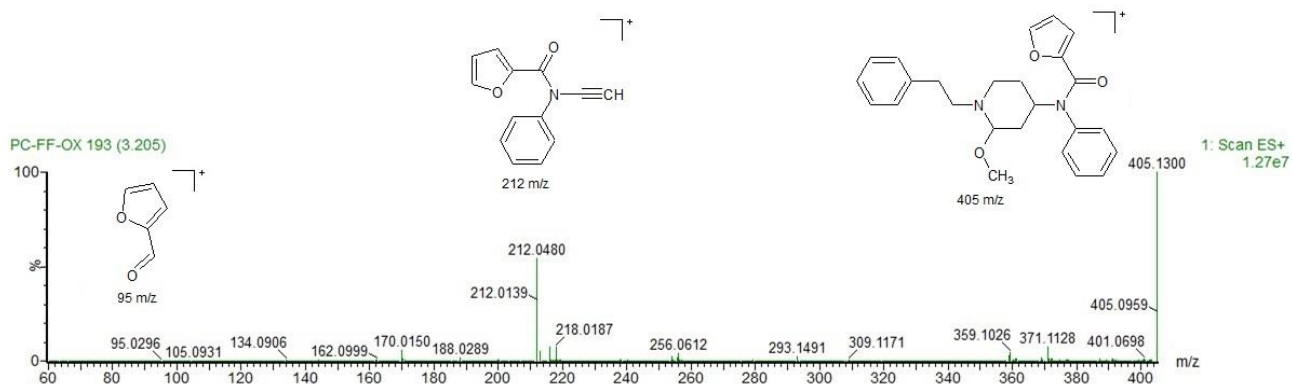
Koncentrace [g/l]	Konverze na 1. ECD elektrodě [%]	Konverze na 2. ECD elektrodě [%]
0,02	56,41	43,59
0,01	57,87	42,13
$5 \cdot 10^{-3}$	57,09	42,91
$2,5 \cdot 10^{-3}$	55,80	44,20
$1,25 \cdot 10^{-3}$	54,63	45,37
$6,25 \cdot 10^{-4}$	49,93	50,07
$3,13 \cdot 10^{-4}$	49,28	50,72
$1,56 \cdot 10^{-4}$	49,22	50,78
$7,81 \cdot 10^{-5}$	50,48	49,52
$3,91 \cdot 10^{-5}$	52,31	47,69



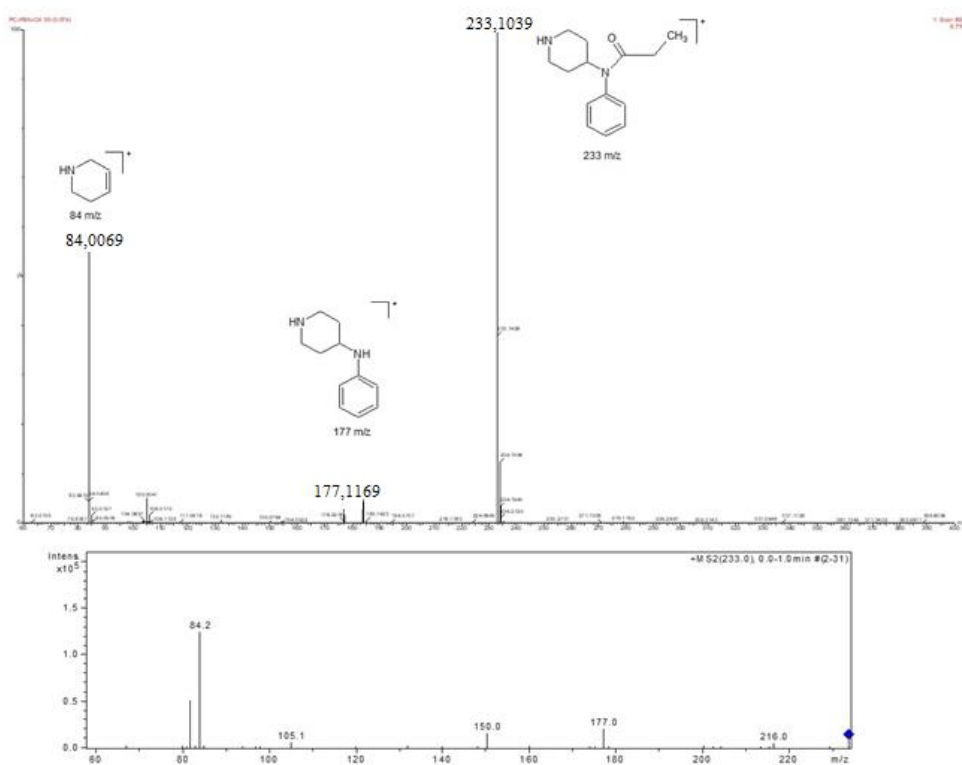
Obrázek 13 - Hmotnostní spektra protonované molekuly furanylfentanylu (iont m/z 375) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 3,538$ min, nahoře) a hmotnostní spektrum z EC/MS (dole)



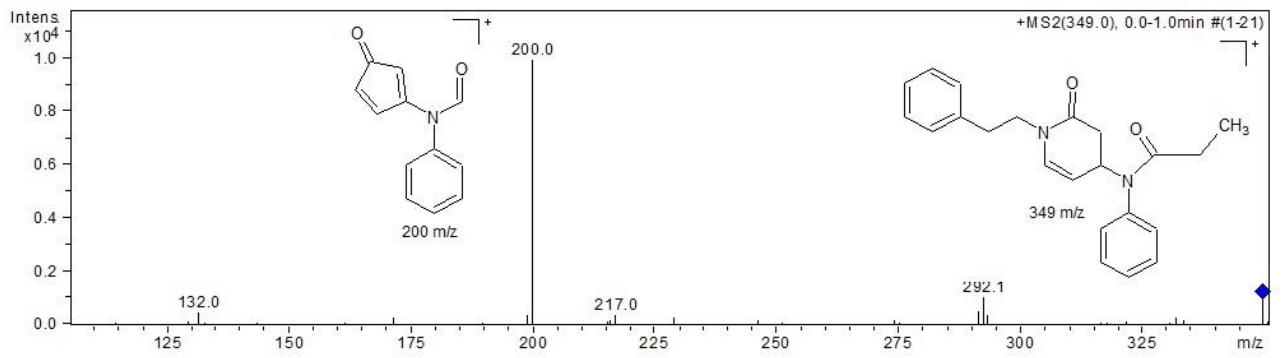
Obrázek 14 - Horní část obrázku ukazuje hmotnostní spektrum z rekonstruovaného chromatogramu pro oxidační produkt furanylfentanylu – iont m/z 271 z HPLC-MS analýzy ($t_r = 1.090$ min). Spodní část ukazuje kolizní spektrum izolovaného iontu – m/z 271 z EC-MS/MS



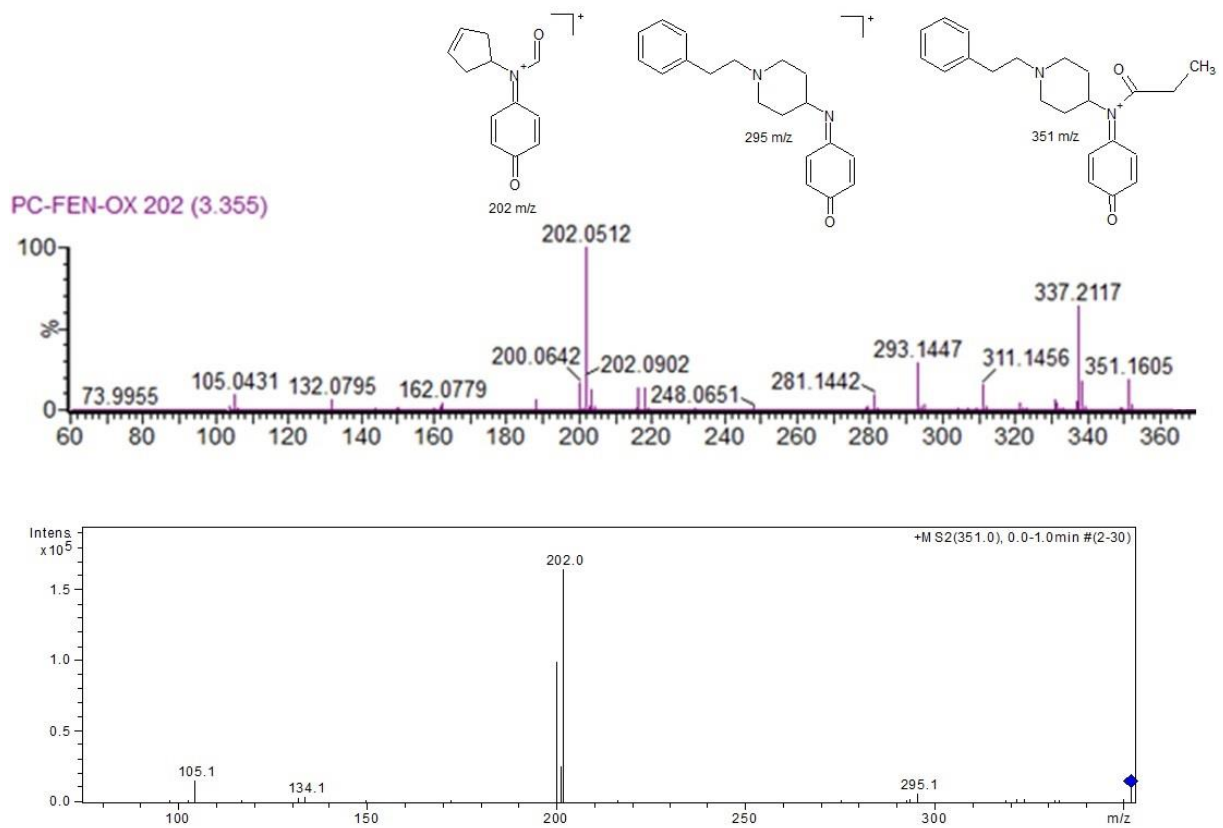
Obrázek 15 - Horní část obrázku ukazuje hmotnostní spektrum produktu oxidace furanyl-fentanylu (ion m/z 405) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 3,205$ min). Spodní část ukazuje kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 405 z EC-MS/MS.



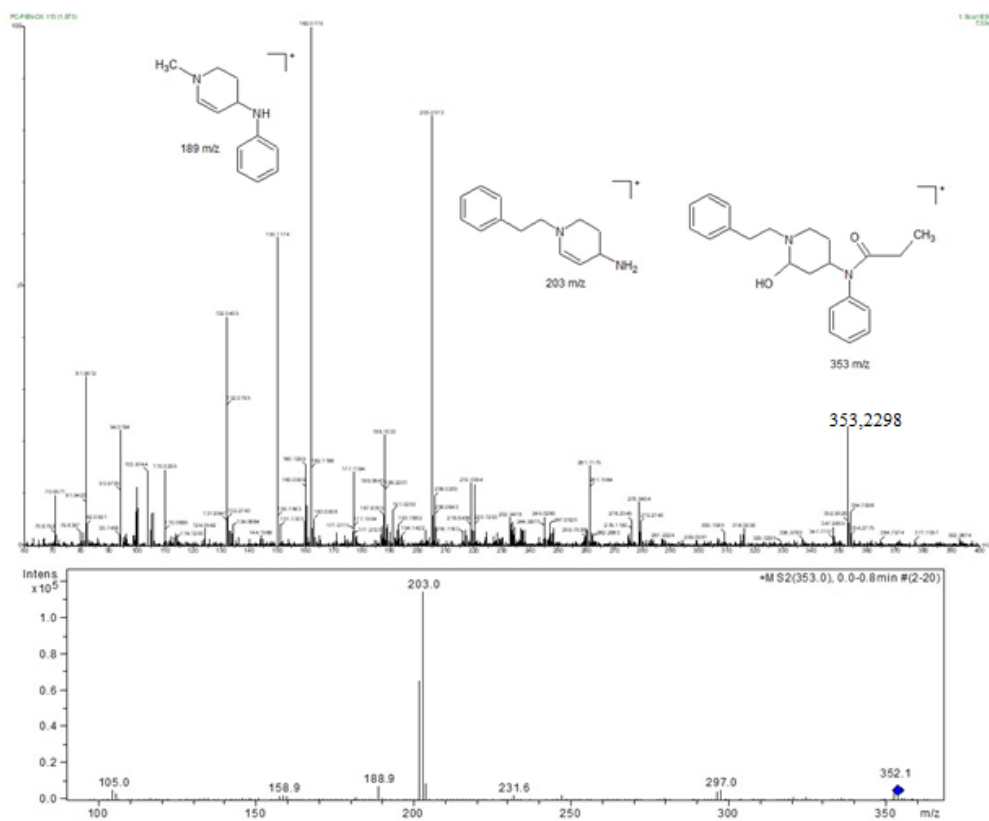
Obrázek 16 - Horní část obrázku ukazuje hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace fentanylu (ion m/z 233) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 0,974$ min). Spodní část ukazuje kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 233 z EC-MS/MS.



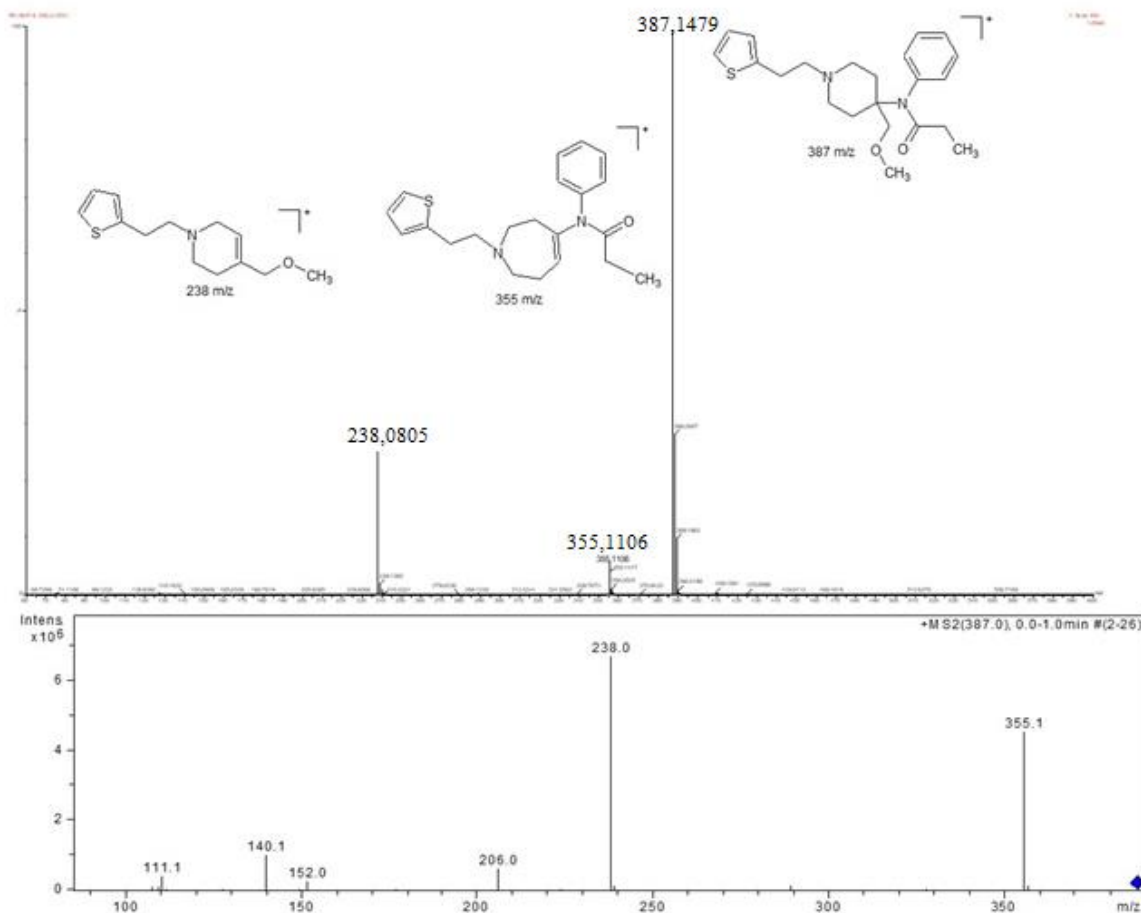
Obrázek 17 - Kolizní spektrum iontu m/z 349 oxidačního produktu fentanylu z EC-MS/MS.



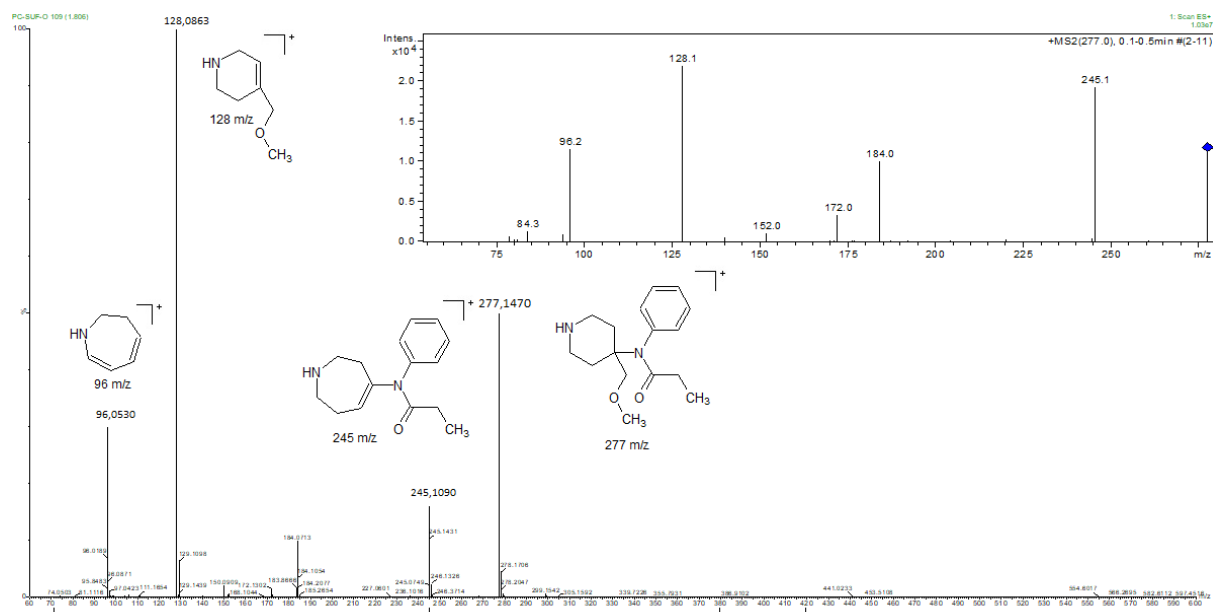
Obrázek 18 – Horní část obrázku ukazuje hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace fentanylu (ion m/z 351) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 3,355$ min). Spodní část ukazuje kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 351 z EC-MS/MS.



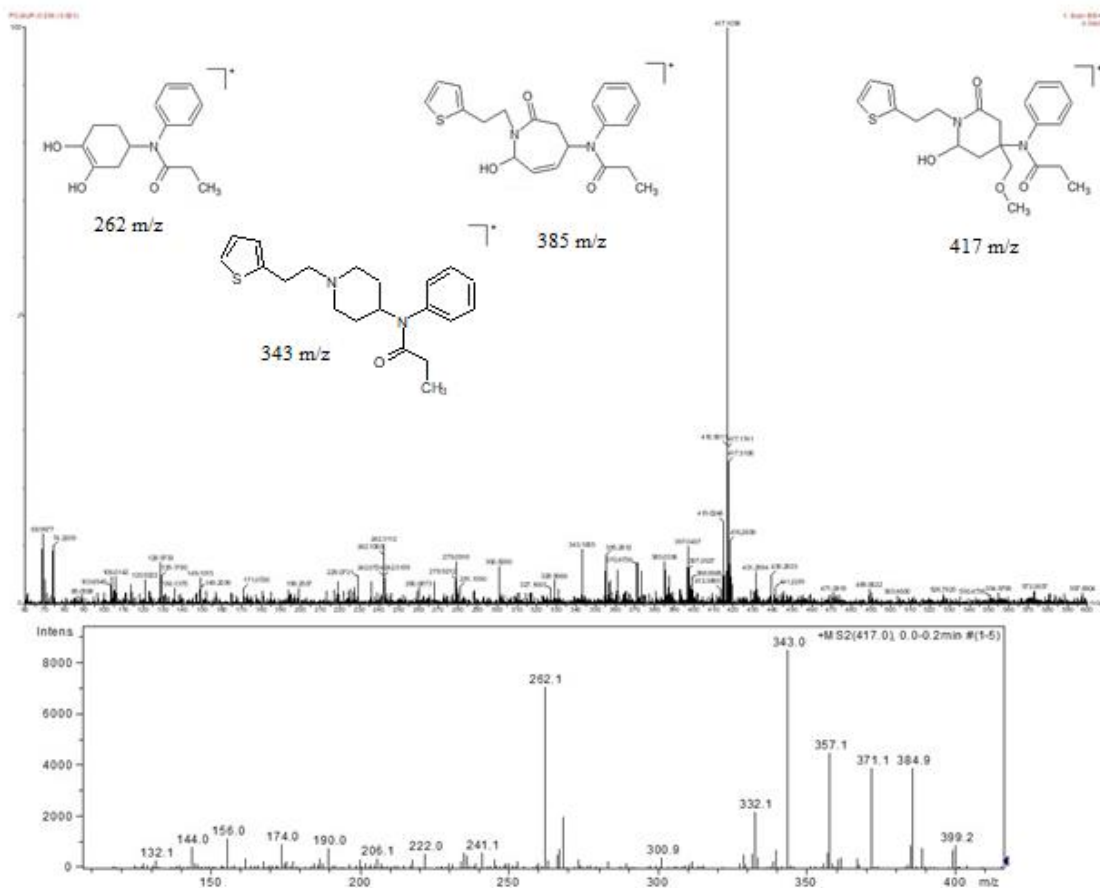
Obrázek 19-horní část obrázku ukazuje hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace fentanylu (ion m/z 353) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 1,873$ min). Spodní část ukazuje kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 353 z EC-MS/MS.



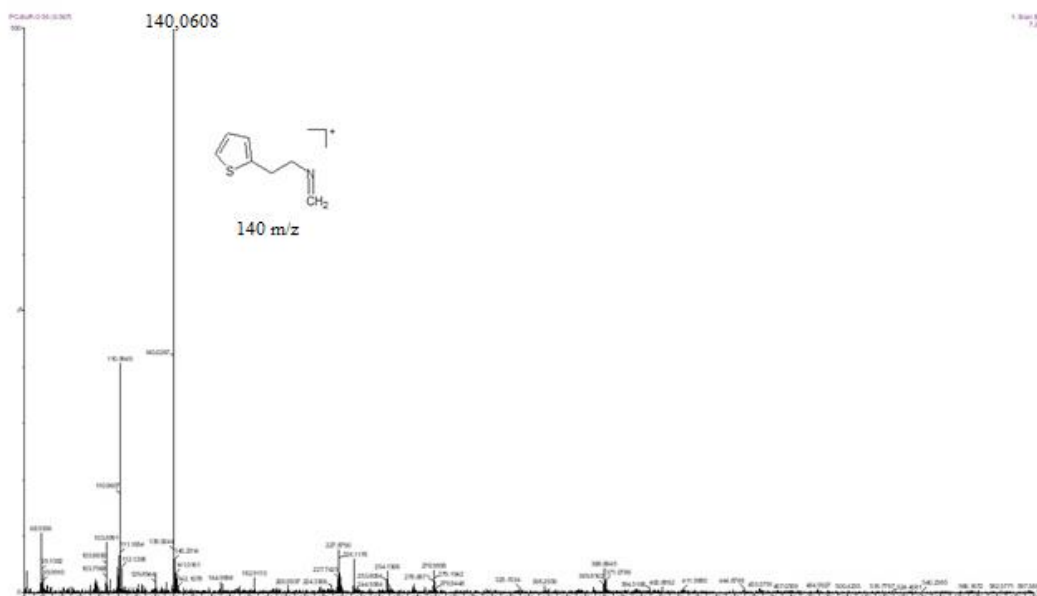
Obrázek 20 – Hmotnostní spektrum sufentanilu (ion m/z 387) z HPLC-MS analýzy ($t_r=4,254$ min). Vloženo je kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 387 z EC-MS/MS (dole).



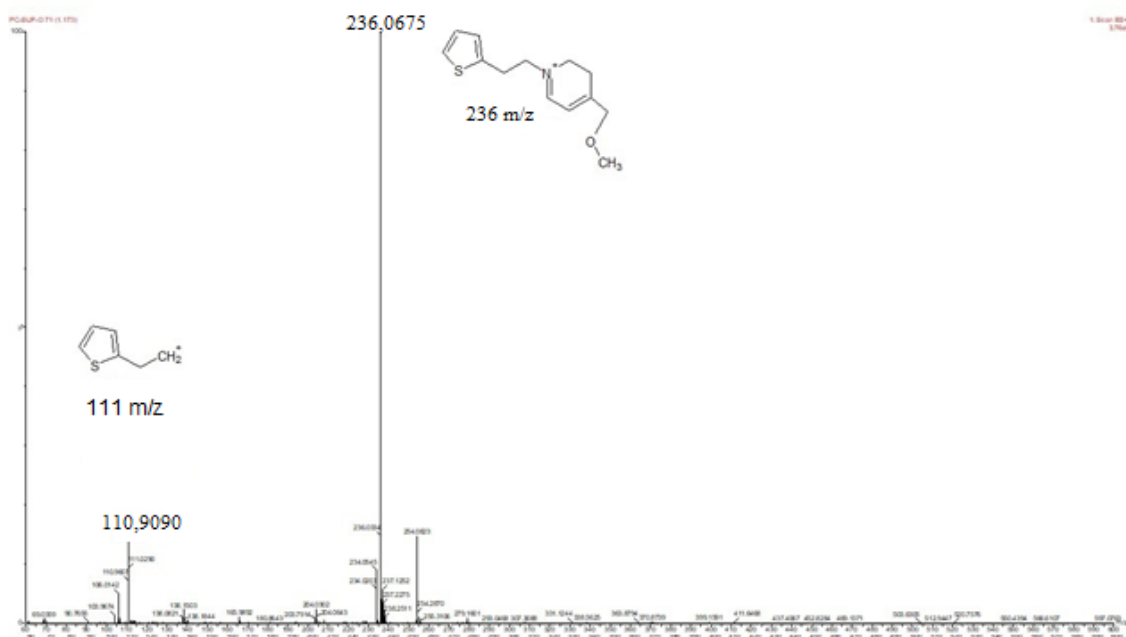
Obrázek 21 – Hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace sufentanilu (ion m/z 277) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 1,806$ min). Vloženo je kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 277 z EC-MS/MS.



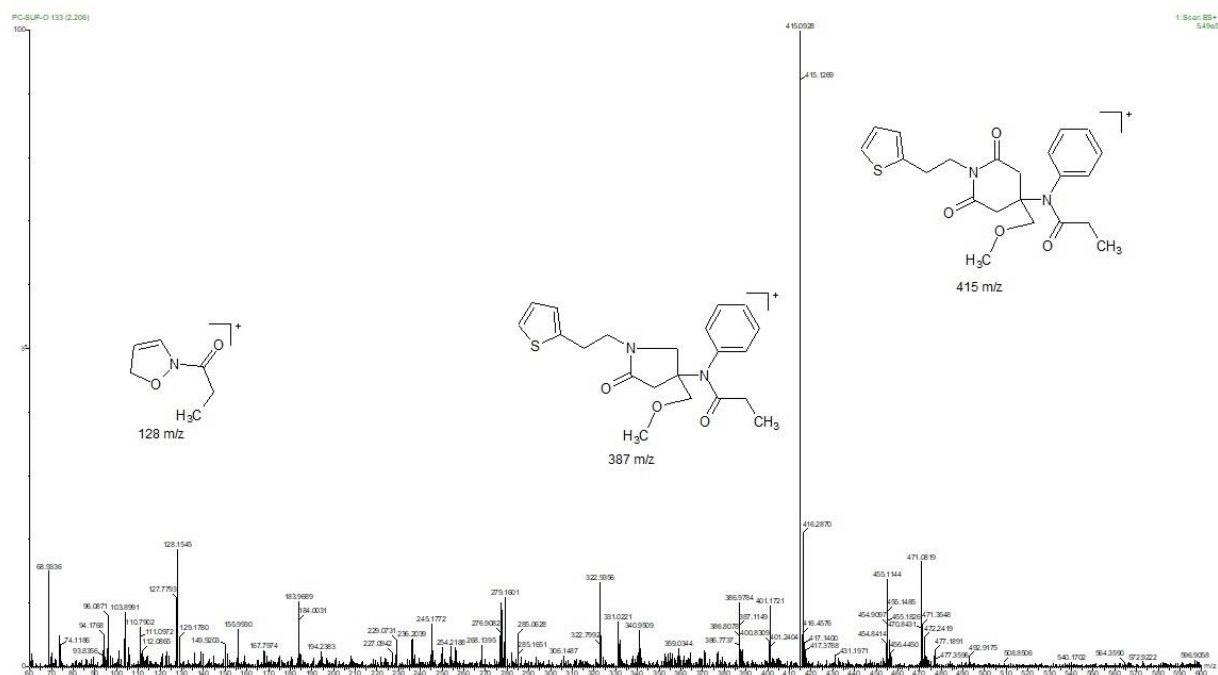
Obrázek 22 – Horní část obrázku zobrazuje hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace sufentanilu (ion m/z 417) z HPLC-MS analýzy ($t_r = 3,921$ min). V dolní části je kolizní spektrum izolovaného iontu m/z 417 z EC-MS/MS.



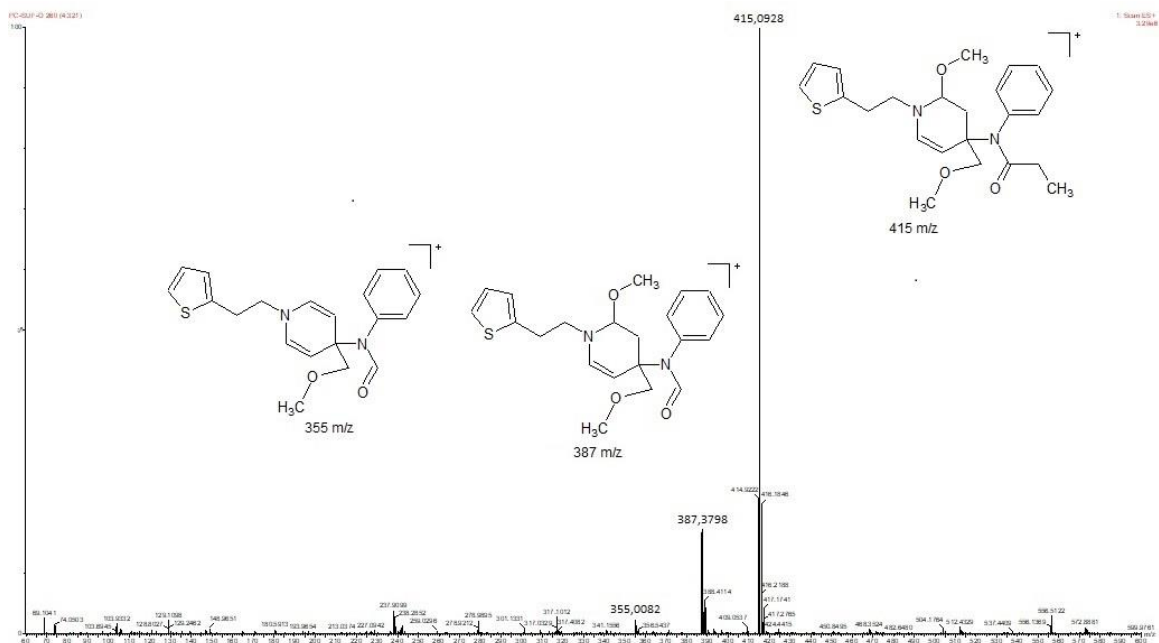
Obrázek 23- Hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace sufentanilu (ion m/z 140) z HPLC-MS analýzy s retenčním časem 0,97 min.



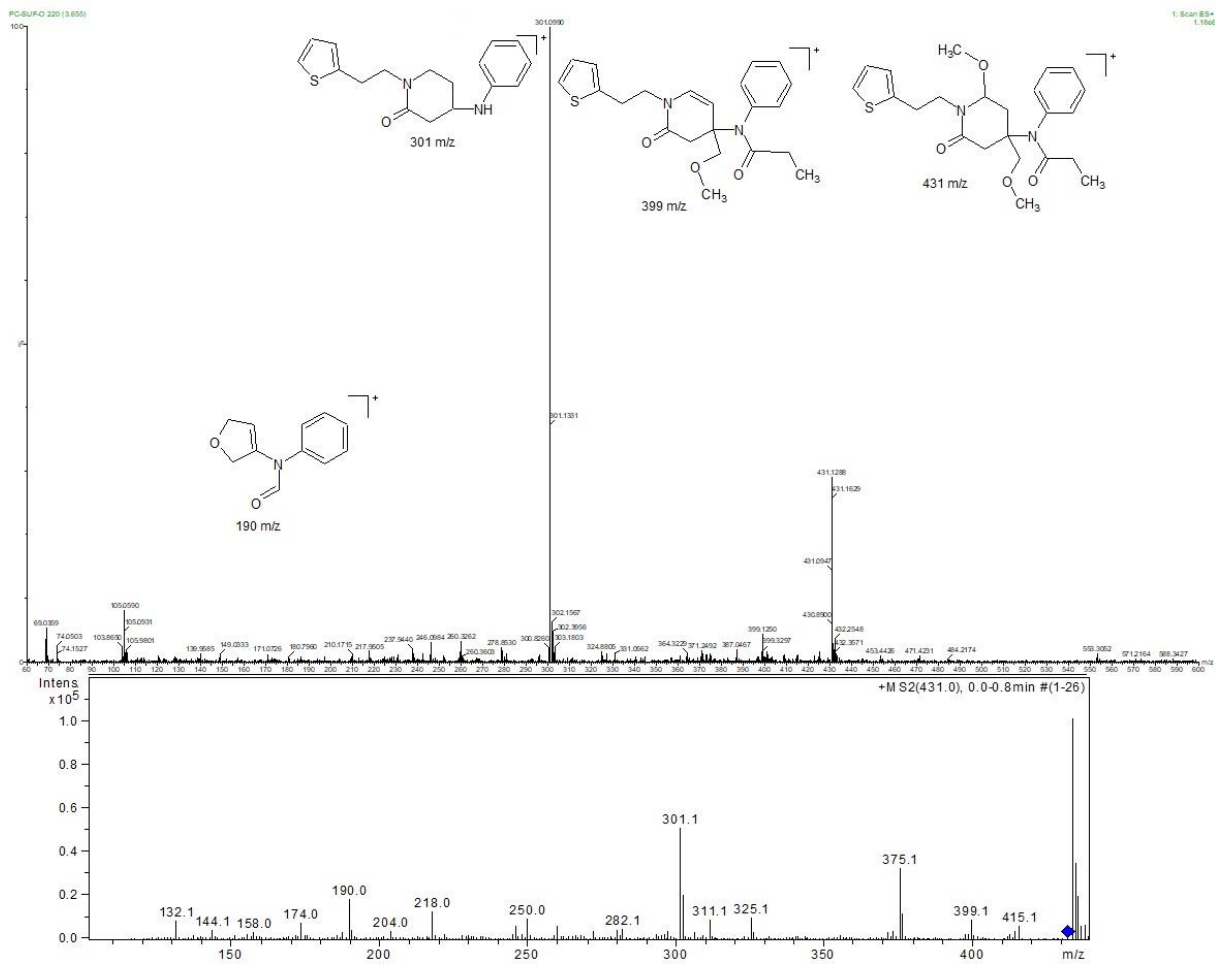
Obrázek 24 – hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace sufentanilu (ion m/z 236) z HPLC-MS analýzy s retenčním časem 1,17 min.



Obrázek 25 – Hmotnostní spektrum z HPLC-MS analýzy produktu elektrochemické oxidace sufentanilu – diketo-sufentanil (ion m/z 415) s $t_r=2,21$ min.



Obrázek 26 – Hmotnostní spektrum z HPLC-MS analýzy produktu elektrochemické oxidace sufentanilu – methoxy-sufentanil (ion 415 m/z) s $t_r=4,32$ min.



Obrázek 27 – Horní část obrázku zobrazuje hmotnostní spektrum produktu elektrochemické oxidace sufentanilu (ion 431 m/z) z HPLC-MS analýzy s retenčním časem 3,61 minut. V dolní části obrázku je kolizní spektrum izolovaného m/z 431 z EC-MS/MS analýzy.