

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2022

Bc. Ester Drastíková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



---

Univerzita Palackého  
v Olomouci

Stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu  
pomocí kapilární elektroforézy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Ester Drastíková

Studijní program: Chemie N1407

Studijní obor: Analytická chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Rok: 2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Dále prohlašuji, že jsem byla seznámena s právy vztahujícími se na mou diplomovou práci a povinnostmi vyplývajícími z autorského zákona č. 121/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

Na tomto místě bych ráda poděkovala osobám, které stály za zrodem mé diplomové práce. V první řadě vedoucímu práce, doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za to, že si mě již podruhé tzv. vzal pod křídla. Děkuji za jeho stálý optimismus, kdy za každých okolností bylo vše báječné, skvělé a úžasné, také za jeho pomoc, obětovaný čas, trpělivost i za všechny ochotně poskytnuté odborné rady.

Za psychickou podporu, mojení, porozumění, sdílení všech situací a odvozy z vlaku děkuji mému milému Kájovi.

Velký dík patří sourozencům a jejich rodinám, strejdovi Erichovi, a hlavně rodičům za psychickou i materiální podporu v průběhu celého studia a neutuchající naději, kterou do mě vkládali.

Důležité poděkování směřuje k dlouholeté kamarádce Lucce Příbylové za přátelství, podporu a také za její pomoc s překladem i formátováním této práce. Zároveň neméně důležité děkuji Terce Závodné, a to za přátelství, pomoc během studia i za praktické rady ohledně zpracování výsledků.

## Bibliografická identifikace

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Jméno příjmení autora | Bc. Ester Drastíková   |
| Název práce           | Stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu pomocí kapilární elektroforézy  |
| Typ práce             | Diplomová  |
| Pracoviště            | Katedra analytické chemie  |
| Vedoucí práce         | doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.   |
| Rok obhajoby práce    | 2022   |
| Abstrakt              | <p>Tato diplomová práce se zabývá micelární elektrokinetickou chromatografií. Jsou zde uvedeny základní principy, zařízení a aplikace. V experimentální části je pak popsán postup analýzy pro stanovení rozdělovacích koeficientů pomocí MEKC. Tato metoda pak byla aplikovaná na stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu.</p> |
| Klíčová slova         | kapilární elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, rozdělovací koeficient, fentanyl a jeho deriváty   |
| Počet stran           | 52   |
| Počet příloh          | -  |
| Jazyk                 | Český  |

## Bibliographical identification

|  |   |
|--|---|
| Author's first name and surname  | Bc. Ester Drastíková  |
| Title  | Determination of partition coefficients of fentanyl derivatives by capillary electrophoresis                            |
| Type of thesis   | Diploma   |
| Department   | Department of analytical chemistry  |
| Supervisor   | doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.  |
| The year of presentation   | 2022  |
| <p>Abstract</p> <p>The topic of this diploma thesis is micellar electrokinetic chromatography. This thesis outlines basic principles, devices, and applications. In the empirical part an analysis procedure to determine partition coefficients using MEKC is described. This method was used for determining partition coefficients of fentanyl derivatives.</p> |   |
| Keywords   | capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, partition coefficients, fentanyl and its derivatives |
| Number of pages  | 52  |
| Number of appendices   | -   |
| Language   | Czech   |

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| Seznam použitých zkratek.....                        | 17 |
| Cíle práce .....                                     | 18 |
| 1 Úvod.....  | 11 |
| 2 Teoretická část.....                               | 13 |
| 2.1 Kapilární elektroforéza .....                    | 13 |
| 2.1.1 Počátky kapilární elektroforézy .....          | 13 |
| 2.1.2 Zařízení pro kapilární elektroforézu.....      | 14 |
| 2.1.3 Principy separace .....                        | 18 |
| 2.1.4 Rozdělovací koeficient.....                    | 22 |
| 2.1.5 Micelární elektrokinetická chromatografie..... | 24 |
| 2.2 Fentanyl .....                                   | 27 |
| 2.2.1 Metabolismus fentanylu .....                   | 27 |
| 2.3 Morfin .....                                     | 29 |
| 2.4 Kodein .....                                     | 30 |
| 2.5 Norfentanyl.....                                 | 31 |
| 2.6 Furanylfentanyl.....                             | 32 |
| 2.7 Thiofentanyl .....                               | 33 |
| 2.8 Karfentanyl .....                                | 34 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3     | Experimentální část .....                              | 35 |
| 3.1   | Chemikálie .....                                       | 35 |
| 3.2   | Zařízení .....   | 35 |
| 3.3   | Výsledky a diskuse .....                               | 36 |
| 3.3.1 | Vývoj metody .....                                     | 36 |
| 3.3.2 | Separace standardů.....                                | 37 |
| 3.3.3 | Rozdělovací koeficienty standardů – kalibrace.....     | 38 |
| 3.3.4 | Léčiva .....   | 40 |
| 3.3.5 | Rozdělovací koeficienty fentanylu a jeho derivátů..... | 43 |
| 4     | Závěr .....  | 46 |
|       | Seznam obrázků .....                                   | 47 |
|       | Seznam tabulek .....                                   | 48 |
| 5     | Literatura .....                                       | 49 |



## Seznam použitých zkratek

|        |   |
|--------|---|
| CE     | capillary electrophoresis (kapilární elektroforéza)                                   |
| DAD    | diode array detector (detektor diodového pole)  |
| EOF    | electroosmotic flow (elektroosmotický tok)  |
| MEKC   | micellar electrokinetic chromatography<br>(micelární elektrokinetická chromatografie) |
| SDS    | sodium dodecyl sulfate (dodecyl sulfát sodný)   |
| UV-VIS | ultraviolet visible (ultrafialová viditelná)  |

## Cíle práce

1. Přehledná rešerše na téma kapilární elektroforéza a její teorie se zaměřením na micelární elektrokinetickou chromatografii, stanovení rozdělovacích koeficientů a dále rešerše na téma fentanyly a další jeho deriváty.
2. Vývoj metody na stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu pomocí kapilární elektroforézy, následné stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu.

## 1 Úvod

Jelikož je v posledních letech napříč všemi odvětvími kladen důraz na ekologii, spotřebu materiálů a miniaturizaci, ani v případě chemie tomu není jinak. Jeden z mnoha takových případů představuje elektromigrační metoda – kapilární elektroforéza, technika zabývající se separací látek ve stejnosměrném elektrickém poli. K rozvoji kapilární elektroforézy došlo především ve druhé polovině 20. století. Hlavní předností zmíněné separační techniky je malá spotřeba vzorku a také rozpouštědel. Mezi další výhody kapilární elektroforézy patří možnost použití v širokém rozmezí pH a také možnost aplikovat vysokého napětí, což vede ke zkrácení doby analýzy. Touto metodou je možné analyzovat malé anorganické látky nebo organické ionty až po biologické makromolekuly (DNA, proteiny). Separace je uskutečňována v kapiláře o malém vnitřním průměru, typicky jde o 50-75  $\mu\text{m}$ , s délkou 30-100 cm naplněné elektrolytem. Tato nejčastěji křemenná kapilára je pokrytá vrstvou polyimidu, a to z důvodu usnadnění manipulace i zvýšení mechanické odolnosti kapiláry. V místě detekce je odstraněním vrstvy polyimidu vytvořeno „okénko“. Křemenná kapilára je v tomto místě průhledná a prochází jí ultrafialové (UV) i viditelné (VIS) světlo, což umožňuje použití fluorescenčních nebo UV-VIS detektorů. Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky upraven kovalentní vazbou s různými substituenty, čehož se využívá například ke změně náboje na vnitřní stěně kapiláry nebo ke snížení adsorpce.

Metoda kapilární elektroforézy se svou historií, instrumentací, aplikacemi a principy separace bude popsána v kapitole zaměřující se právě na zmíněnou metodu. Pozornost bude směřována k důležitému parametru, kterým je studovaný rozdělovací koeficient. Dále bude spolu s instrumentací a oblastmi využití vysvětlena metoda micelární elektrokinetické chromatografie, jejíž výhodou je možnost separovat i elektricky neutrální molekuly.

Další úsek práce se bude zabývat separovanými látkami – fentanyly, opioidy ovlivňující centrální nervovou soustavu. Příkladem může být morfin, kodein, thiofentanyl či nejsilnější známý opioid – karfentanyl. V této části budou zobrazeny jejich chemické struktury, zmíněny jejich žádoucí účinky a vedlejší účinky, jakož i v některých případech srovnání sil účinků.

Experimentální část práce bude zaměřena na vývoj metody pro stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu. V první části bylo separováno šest standardů (benzen, toluen, etylbenzen, propylbenzen, butylbenzen a tokoferol) se známými hodnotami rozdělovacích koeficientů pro kalibraci stanovení. Poté bude zmíněno měření rozdělovacích koeficientů dvou léčivých látek, a sice yohimbinu a chlorcyklizinu, jejichž rozdělovací koeficienty jsou rovněž známy. V nejdůležitější části se bude práce zabírat analýzou jednotlivých derivátů fentanylu a fentanylu samotného a výpočty příslušných rozdělovacích koeficientů z migračních dat.

## 2 Teoretická část

Na několika následujících stranách byla zpracována rešerše na téma elektroforéza zaměřena zejména na kapilární elektroforézu a její aplikace. Dále byla popsána problematika rozdělovacích koeficientů, jakožto důležitého parametru pro distribuci léčiva v lidském těle. K tomu určená je další popsaná metoda, a sice elektrokinetická micelární chromatografie. Později jsou zmíněny separované opioidy – fentanyl a jeho strukturní analogy a metabolity.

### 2.1 Kapilární elektroforéza

Komplexním termínem elektroforéza rozumíme separační techniky založené na odlišné pohyblivosti iontů v elektrickém poli, přičemž jednou z těchto separačních technik je i kapilární elektroforéza. Mezi výhody kapilární elektroforézy patří vlastnosti kapilár – nízká vodivost, jsou antikonvektivní a díky velkému poměru plochy k objemu, kapiláry efektivně odvádí vznikající teplo. Vysoký elektrický odpor kapiláry umožňuje aplikaci vysokého elektrického pole, což vede ke krátkým dobám analýzy a vysoké účinnosti s minimálním generováním tepla. Jednou z největších výhod CE je však její rozsah použití, oproti původním předpokladům analýzy biologických makromolekul. Ukázalo se, že separace je účinná u aminokyselin, chirálních léčiv, vitaminů, peptidů, proteinů, sacharidů, oligonukleotidů, fragmentů DNA a celých buněk i virových částic. CE může nabídnout jednodušší vývoj metody, minimální požadavky na objem vzorku a s tím spojené malé množství odpadu. Navíc jedním z klíčových rysů CE je jednoduchost jejího přístrojového vybavení. [1]

#### 2.1.1 Počátky kapilární elektroforézy

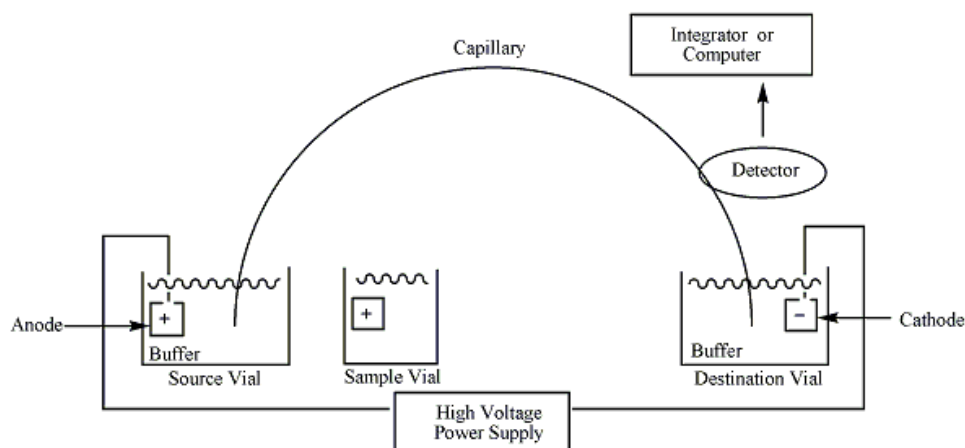
V roce 1937 zavedl elektroforézu pro separaci proteinů Tiselius, za což mu byla udělena Nobelova cena. První separace v otevřené trubici byla popsána Hjerténem v roce 1967 a později již Mikkersem et al. byla provedena elektroforéza v teflonových nebo skleněných kapilárách o vnitřním průměru 200  $\mu\text{m}$ . [2]

V 80. letech Jorgenson a Lukacs v této technice pokročili pomocí kapilár z taveného křemene s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$ . Jorgensonem byla rovněž objasněna teorie, popsány vztahy mezi provozními parametry a kvalitou separace a demonstrován potenciál kapilární elektroforézy jako analytické techniky. [3]

V posledních desetiletích našla CE své uplatnění v mnoha nejrůznějších oborech, jako je farmaceutický, forenzní, klinický, potravinářský či enviromentální. Mezi trendy patří spojení CE s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) nebo miniaturizace (mikrofluidní systémy na čípech, kterými jsem se zabývala v bakalářské práci). [1]

### 2.1.2 Zařízení pro kapilární elektroforézu

Zařízení pro kapilární elektroforézu je koncepčně jednoduché. Hlavní komponenty jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 1), jedná se o vialku se vzorkem, zdrojovou a koncovou vialku, kapiláru oběma konci umístěnou do rezervoárů s elektrolytem, detektor, zdroj vysokého napětí a výstupní zařízení a počítač.



Obrázek 1: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu [4]

Elektroforéza se provádí naplněním zdrojové vialky, kapiláry a koncové vialky elektrolytem, obvykle vodným tlumivým roztokem. Vstupní konec kapiláry je umístěn ve vialce se vzorkem, vzorek je kapilárou nasáván a následně je vstupní konec kapiláry umístěn zpět do zdrojové vialky s elektrolytem. V tomto okamžiku je mezi zdrojovou a koncovou vialku vkládáno napětí.

Jak rozpuštěné látky migrují kapilárou různou rychlostí, jsou detegovány detektorem a tento výstup je odeslán do počítače. Zobrazený výstup se označuje jako elektroferogram vyobrazující odezvu detektoru na čas. V elektroferogramu se separované sloučeniny objevují jako píky s rozdílnými migračními časy. [5]

#### 2.1.2.1 UV-VIS detektory

V kapilární elektroforéze bylo využíváno několik druhů detektorů zahrnující UV-VIS absorpční detektory, fluorescenční, fluorescenční indukované laserem, hmotnostní spektrometr, dále pak detektory na principu konduktivity, amperometrický, radiometrický a detektory založené na měření indexu lomu. V některých případech jsou zapojeny dva nebo více detektorů v sérii. [5], [6]

Mezi nejpoužívanější se řadí detektory založené na absorpci ultrafialového nebo viditelného (UV-VIS) záření, jejichž detekční limity jsou přibližně 1 mg/l–1 µg/l (ppm–ppb). Vstupní záření o intenzitě  $I_0$  prochází kapilárou, kde je zčásti nebo zcela absorbováno vzorkem a poté vychází z kapiláry o nižší intenzitě označované  $I_1$ , která je detegována fotodetektorem, nejčastěji fotodiodou. Poměr dvou zmíněných intenzit popisuje transmitance.

$$T = \frac{I_1}{I_0} \quad (1)$$

Princip absorpční UV-VIS detekce je založen na Lambert-Beerově zákoně, kde absorbance  $A$  je dána vztahem,

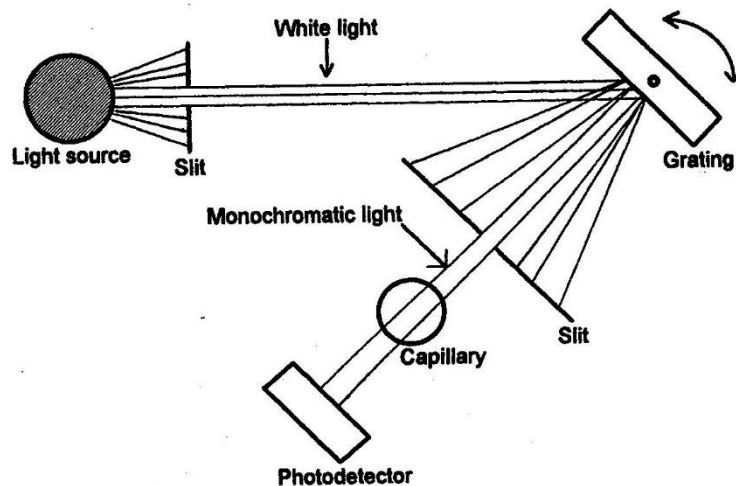
$$A = \log \frac{1}{T} = c\epsilon l \quad (2)$$

kde  $c$  označuje koncentraci rozpuštěné látky,  $\epsilon$  značí molární absorpční koeficient ( $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a  $l$  je tloušťka vrstvy, přes kterou záření prochází. Molární absorpční koeficient vystupující ve výše uvedeném vztahu, závisí na chromoforu rozpuštěné látky, vlnové délce dopadajícího záření a také na pH a složení daného pufru. Chromofor je část molekuly, která absorbuje záření.

Fotodetektor měří intenzitu záření a elektronika detektoru intenzitu převádí na absorbanci. Většina UV-VIS detektorů pracuje v rozmezí vlnových délek 190 nm až 800 nm. Z toho podíl UV je od 190 nm do 350 nm a oblast VIS zhruba od 350 nm do 800 nm. Většina látek absorbuje záření při 190 nm, dokonce i rozpuštěný kyslík. Proto je třeba pro selektivitu použít co nejdelší vlnovou délku, která poskytne dostatečnou absorbanci pro detekci. Jelikož je absorbance závislá na absorptivitě, výška píku je na ní rovněž závislá. Při nástřiku stejné množství dvou látek způsobí různou výšku píků, protože mají různou absorptivitu. Právě z toho důvodu závisí citlivost UV-VIS detekce na vzorku. Minimální koncentrace detegována pomocí tohoto typu detektoru, se pohybuje v rozmezí  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  mol/l. [6]

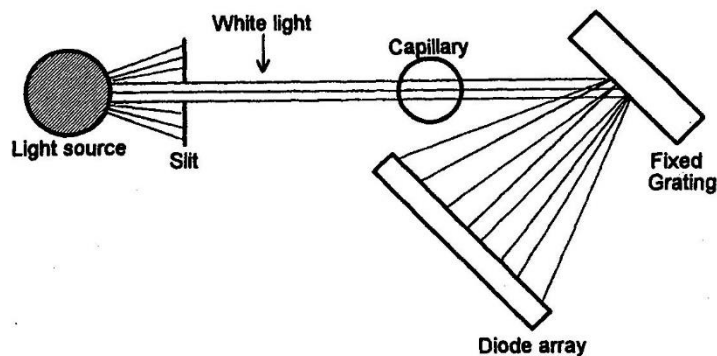
Následující schéma zobrazuje hlavní části UV-VIS detektoru s variabilní vlnovou délkou. Zdrojem záření je obvykle deuteriová lampa. Záření dopadá na mřížku, která záření rozkládá na různé vlnové délky. Elektrickým motorem nebo manuálním natáčením mřížky je vybrána vlnová délka a ta projde štěrbinou zamezující průchodu záření nežádoucích vlnových délek. V jednom místě je z kapiláry odstraněna část polyimidu, čímž je vytvořeno okénko pro průchod záření sloužící jako detekční cela. Monochromatické záření prochází kapilárou a je zachyceno fotodiodou. Tento typ detektoru umožňuje sbírat data pouze pro jednu vlnovou délku v rozsahu UV-VIS. [5], [6]





Obrázek 2: Schéma UV-VIS detektoru s variabilní vlnovou délkou [5]

Schéma níže znázorňuje další typ UV-VIS detektoru, detektor diodového pole (DAD). V tomto případě UV-VIS záření nejdříve prochází kapilárou, až poté dopadá na mřížku, která záření rozkládá, přičemž se mřížka nepohybuje. Záření o různých vlnových délkách dopadá na diodové pole. Každá dioda má úzké rozmezí vlnových délek, tedy vlnová délka je vybrána elektronickým vzorkováním z příslušné diody. Výstup z celého pole lze vzorkovat ve 20-40 ms. Výhodou tohoto typu detektoru je možnost detekce více vlnových délek najednou a schopnost získat spektrální data. Spektrální data umožňují stanovení čistoty a určitou identifikaci píku. [7]



Obrázek 3: Schéma detektoru diodového pole [5]

### 2.1.3 Principy separace

Metoda kapilární elektroforézy využívá dva transportní jevy – elektroforetickou mobilitu a elektroosmotický tok. Vlivem obou těchto jevů dochází k pohybu kladně nabitých rozpuštěných látek k záporně nabitě elektrodě. [5]

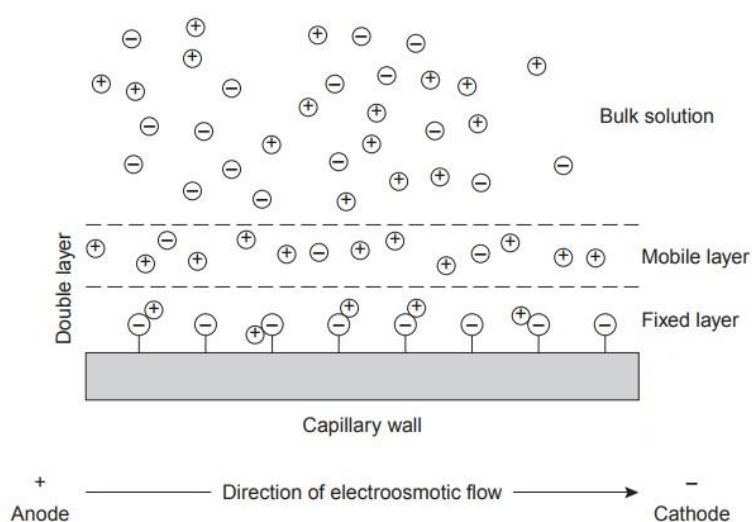
#### 2.1.3.1 Elektroosmotický tok

V kapilární elektroforéze, kromě rozpuštěných látek, se vlivem elektrického pole pohybuje také roztok pufru. Tento jev je označován jako elektroosmotický tok (EOF). Za normálních podmínek kladně nabitě ionty migrují ke katodě a stejným směrem jsou unášeny molekuly rozpouštědla. Nabité molekuly rozpuštěných látek jsou separovány vlivem rozdílnosti elektroforetických mobilit a budou mít tendenci migrovat k elektrodě, která má opačný náboj než rozpuštěná látka.

Elektroosmotický tok (v pufru o alkalickém pH) je výrazně větší než elektroforetické mobility záporně nabitých rozpuštěných látek, proto jsou unášeny spolu s pufrům k detektoru. Jelikož záporně nabitě rozpuštěné látky jsou stahovány zpátky ke zdrojové vialce s kladným nábojem anody, pohybují se rychlostí nižší, než je elektroosmotický tok. Neutrální rozpuštěné látky nejsou nijak ovlivňovány elektroforetickou mobilitou, a proto se pohybují kapilárou stejnou rychlostí jako EOF. Rozpuštěné látky prochází kapilárou v následujícím pořadí: kationty, neutrální látky a poté anionty. Neutrální látky jsou odděleny od nabitých látek, ale nejsou separovány jednotlivě. Rozpuštěné látky s nejvyšší mobilitou a první, které migrují kapilárou, jsou malé, vysoce nabitě kationty. Naproti tomu malé, vysoce nabitě anionty migrují skrz kapiláru jako poslední. Hlavní výhodou EOF je možnost separace aniontů od kationtů v jednom kroku. Druhým benefitem je přiměřená doba analýzy i v případě iontů s malým rozdílem poměru náboje k velikosti.

Elektroosmotický tok je objemový tok kapaliny v kapiláře, který je důsledkem povrchového náboje na vnitřní stěně křemenné kapiláry. To může být způsobeno ionizací povrchu kapiláry nebo adsorpcí iontů z pufru na kapiláru. Křemenná kapilára je tvořena silanolovými skupinami Si-OH, které jsou při  $\text{pH} > 4$  disociovány na Si-O<sup>-</sup>.

Takto disociované skupiny přitahují kladně nabitě ionty z pufru a tvoří vnitřní vrstvu kationtů na stěně kapiláry. Tyto kationty nemají dostatečnou hustotu k neutralizaci všech záporných nábojů, takže se vytvoří druhá, vnější vrstva kationtů. Vnitřní vrstva je těsně vázána skupinami Si-O<sup>-</sup> a označuje se jako pevná vrstva. Vnější vrstva kationtů není vázána pevně, jelikož je dál od skupin Si-O<sup>-</sup>. Je označována jako mobilní vrstva. Tyto dvě vrstvy tvoří difuzní dvojvrstvu kationtů, jejíž podstata je znázorněna v následujícím obrázku (Obrázek 4). [1], [5], [6]



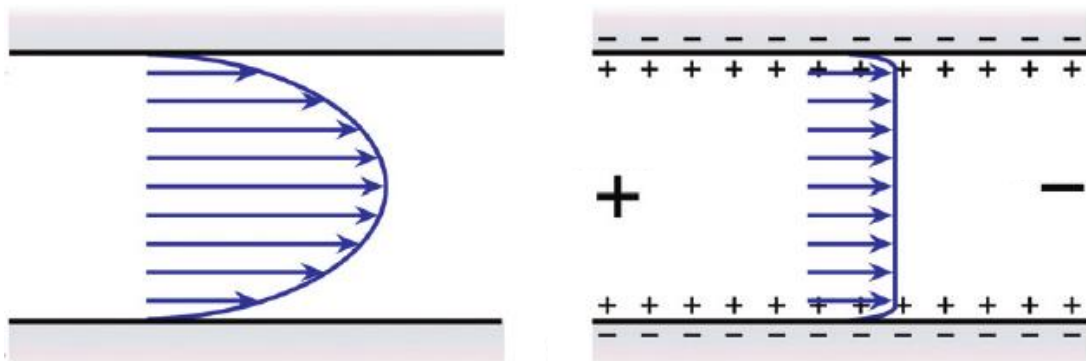
Obrázek 4: Schematický diagram vzniku elektroosmotického toku [8]

Po vložení elektrického pole je mobilní vrstva přitahována k záporně nabitě katodě. Od toho okamžiku jsou kationty solvatovány, „táhnou“ s sebou roztok pufru, což způsobí elektroosmotický tok. Mezi pevnou a mobilní vrstvou je smykové rozhraní, na kterém vzniká elektrická nerovnováha, což je potenciální rozdíl napříč vrstvami – zeta potenciál. EOF je úměrný zeta potenciálu, který je úměrný tloušťce dvojvrstvy. [9] Zeta potenciál je dán vztahem níže, kde  $\delta$  je tloušťka difuzní dvojvrstvy,  $e$  je náboj na jednotku plochy,  $\epsilon$  je dielektrická konstanta pufru. Tloušťka difuzní dvojvrstvy je nepřímo úměrná koncentraci pufru.

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon}$$

(3)

EOF má ve srovnání s čerpaným laminárním prouděním v HPLC relativně plochý profil. V důsledku třecího odporu je EOF u stěn kapiláry pomalejší (Obrázek 5). Tato redukce v průtoku ubírá jen malou část z celkového plochého toku, jelikož oblast v blízkosti stěny kapiláry je velmi malá. Výhoda profilu plochého proudění spočívá ve stejné rychlosti rozpuštěných molekul způsobené elektroosmotickým tokem bez ohledu na jejich polohu v průřezu kapiláry. Jsou eluovány jako úzké pásy poskytující úzké píky s vysokou účinností. To je v kontrastu k rozpuštěným látkám pohybujícím se skrz kapiláru vlivem čerpaného toku, kde se rozpuštěné látky ve střední části kapiláry pohybují rychleji než ty, které jsou blíže ke stěně kapiláry.



Obrázek 5: Parabolický profil průtoku kapaliny při hydrodynamickém čerpání (vlevo), plochý profil způsobený EOF (vpravo) [10]

Je důležité, aby EOF byl konstantní. Pokud se průtok liší, způsobí to změnu migračních časů rozpuštěných látek, což může zapříčinit nesprávnou identifikaci píků nebo chyby při stanovení. Změny průtoku mohou rovněž vyvolat změny v ploše píků, a to při použití detektorů měřící koncentraci (UV-VIS). Pokud se průtok dvakrát sníží, rozpuštěná látka zůstane v detektoru dvakrát déle a jeho pík bude dvakrát větší.

Pokud se stanovení řídí plochou píku, objeví se v tomto případě významné chyby. V případě, kdy migrační časy nejsou reprodukovatelné, by měla být v kalibračních grafech místo plochy píku použita plocha píku/migrační čas. Když je využíván detektor založený na měření koncentrace, výška píku se se změnou průtoku na rozdíl od plochy píku příliš nezmění. [5]

### 2.1.3.2 Elektroforetická mobilita

Vlivem elektrického pole bude elektricky nabitá rozpuštěná látka migrovat pufrem s elektroforetickou rychlostí  $v_{EP}$  (cm/s)

$$v_{EP} = \mu_{EP}E \quad (4)$$

kde  $\mu_{EP}$  je elektroforetická mobilita a  $E$  označuje aplikované elektrické pole. Separace je dosaženo migrací rozpuštěných látek kapilárou o rozdílných rychlostech. Elektroforetická mobilita je dána následujícím vztahem.

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Veličina  $q$  je náboj ionizované rozpuštěné látky,  $\eta$  značí viskozitu pufru a  $r$  poloměr rozpuštěné látky. Elektroforetická mobilita je analogická k elektroosmotické mobilitě  $\mu_{EOF}$ , má rovněž stejnou jednotku,  $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ . Elektroforetická mobilita je do určité míry závislá na tvaru iontů. Z výše uvedeného vztahu je zřejmé, že čím je větší poměr náboje k velikosti ( $q/r$ ), tím je vyšší elektroforetická mobilita a vyšší rychlost pro dané vložené elektrické pole a pufr. Kapilárou nejrychleji migrují malé a vysoce nabitě molekuly, kdežto velké molekuly s nižším nábojem putují pomaleji. Neutrální molekuly mají nulovou elektroforetickou mobilitu, protože pro ně se  $q$  rovná nule. Zvýšení viskozity pufru způsobuje snížení elektroosmotického toku, což zároveň způsobí snížení elektroforetické mobility.

Elektroforetická rychlost je závislá na obou mobilitách a elektrickém poli, zatímco elektroforetická mobilita je závislá pouze na vlastnostech rozpuštěné látky a pufru. Na aplikovaném elektrickém poli nezávisí. [5], [6]

#### 2.1.4 Rozdělovací koeficient

Rozdělovací koeficienty jsou důležitými parametry pro výzkum distribuce léčiv a také drog v lidském těle. Rozdělovací koeficient  $P$  je bezrozměrné číslo vyjadřující míru schopnosti sloučeniny rozdělit se mezi dvě fáze (vodná a organická). Jedná se tedy o poměr dvou rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému dvou omezeně mísitelných rozpouštědel. Obvykle je vyjádřen v logaritmickém tvaru a jeho hodnota závisí na hodnotě pH, teplotě nebo iontové síle. Pro správnou interpretaci dat je proto nutné definovat experimentální podmínky.  $\log P$  se používá pro kvantitativní hodnocení permeační schopnosti buněčné membrány, toxicity a dalších fyziologických aktivit chemických sloučenin. [11] Vyšší rozdělovací koeficient předurčuje vyšší permeabilitu konkrétní látky přes buněčnou membránu. [12]

##### 2.1.4.1 Stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů

Hodnoty rozdělovacích koeficientů nejsou pro všechny látky doposud známy. Jejich odhad je vhodný nejen pro studium farmakologických a toxikologických vlastností, ale také pro vyhodnocení chromatografického chování těchto látek v systému reverzních fází. Stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů ( $P$ ) lze provést několika metodami, konkrétně konvenční metodou třepací láhve nebo separačními metodami.

Metoda třepací lahve je časově velmi náročná a vyžaduje velké množství studovaných látek ve vysoké čistotě. Pro obecný systém organické a vodné fáze, v případě použití metody třepací lahve, lze rozdělovací koeficient vyjádřit následovně:

$$P = \frac{V_w}{V_o} \left[ \frac{C_{wo} - C_w}{C_w} \right] \quad (6)$$

$V_w, V_o$ ... objemy vodné a organické fáze

$C_{wo}, C_w$ ...koncentrace látky ve vodné fázi před a po třepání

Výhodná alternativní metoda pro rychlý a jednoduchý odhad  $\log P$  s nízkou spotřebou látek, je metoda MEKC, popsána v následující kapitole. Kapacitní faktory rozpuštěné látky získané z experimentů MEKC lze snadno převést na hodnoty  $\log P$ . [13], [14], [15]

Odhad hodnot  $\log P$  metodou MEKC je založen na měření kapacitních faktorů ( $k$ ) studovaných rozpuštěných látek, které lze vypočítat z retenčního času rozpuštěné látky, migračního času EOF a migračního času micel, dle uvedené rovnice.

$$k = \frac{t_R - t_{EOF}}{t_{EOF} \left( 1 - \frac{t_R}{t_{MIC}} \right)} \quad (7)$$

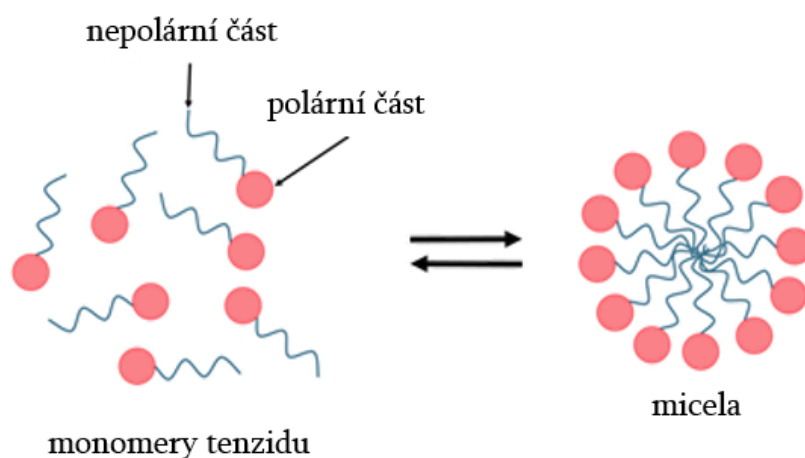
Veličiny  $t_R$ ,  $t_{EOF}$  a  $t_{MIC}$  jsou odpovídající migrační časy studované rozpuštěné látky, markeru EOF, respektive markeru migrace micel. [15], [16]

## 2.1.5 Micelární elektrokinetická chromatografie

Tato metoda je založená na podobnosti mezi alifatickou částí oktanolu a lipofilními řetězci micel a/nebo reverzními fázemi. Pro úspěšnou separaci látek metodou MEKC je nutný vznik asociátů tenzidů (micel) v mobilní fázi. Tenzidy jsou povrchově aktivní látky složené z hydrofobní části – uhlovodíkového řetězce, a části nebo částí hydrofilních, tj. disociovatelné funkční skupiny nebo neutrální, ale polární funkční skupiny. Tenzidy je možné dělit podle chemické struktury a chování v polárních rozpouštědlech na:

- aniontové – povrchově aktivní složka je negativně nabitá
- kationtové – povrchově aktivní složka je pozitivně nabitá
- neiontové – obsahují hydrofilní skupinu, ale nedisociují
- amfoterní – povrchově aktivní složka je podle pH aniontem, kationtem nebo navenek elektroneutrální molekulou (velikosti opačných nábojů se rovnají)

Ke vzniku micel dochází se zvyšující se koncentrací tenzidu v daném rozpouštědle. Postupně vzájemně interagují hydrofobní části monomerů tenzidů, až do koncentrace, kdy vzniknou nadmolekulární útvary označované jako micely. Schematický vznik micel tenzidu představuje obrázek níže (Obrázek 6). [17]



Obrázek 6: Schéma vzniku micely z monomerů tenzidu



Jádro micely je v polárních rozpouštědlech vždy hydrofobní. Nabitě disociované funkční skupiny, polární neutrální funkční skupiny nebo hydrofilní řetězec tvoří vnější obal.

#### 2.1.5.1 Separace neutrálních molekul

Kapilární elektromigrační metody nejčastěji slouží k separaci nabitých molekul. Modifikací separačních podmínek je však možné separovat i molekuly, které nenesou elektrický náboj. Základem je přítomnost elektricky nabitého aditiva v elektrolytu. Aditivum s nenabitými molekulami interaguje a umožňuje tímto jejich separaci v elektrickém poli. Nejčastěji používanými aditivy jsou právě zmíněné tenzidy.

Pokud uvažujeme separaci aromatických uhlovodíků, u kterých rostou hydrofobní vlastnosti (benzen, toluen, ethylbenzen, propylbenzen), je nutné pro účinnou separaci přidat tenzid. Bez tohoto přídatku by k separaci nedošlo. V elektrolytu vznikají negativně nabitě micely migrující k anodě. Rychlost těchto micel však není příliš velká. V případě MEKC separace s přidavkem SDS je výhodné pracovat při neutrálním až bazickém pH. Tehdy je rychlost elektroosmotického toku vyšší, než rychlost micel putujících k anodě a EOF tak unáší micely ke katodě.

Hydrofobní analyt je rozdělován mezi hydrofilní elektrolyt a hydrofobní dutinu micely. Obě fáze, mezi kterými dochází k rozdělování analytu (elektrolyt a micelární fáze) jsou v pohybu. Koncentrace a povaha micel v elektrolytu, rychlost a směr EOF ovlivňuje selektivitu separace. V případě neutrálních molekul je separace ovlivněna pouze rozdělovací rovnováhou analytu mezi micely a okolní elektrolyt. Čím je interakce mezi neutrálním analytem a micelou silnější, tím bude větší migrační čas, jelikož micely se pohybují opačným směrem než EOF. [17]

#### 2.1.5.2 Instrumentace MEKC

K separaci analytů metodou MEKC je vhodné, aby přístroj disponoval stabilizovaným zdrojem stejnosměrného napětí, nádobami s elektrolytem, křemennou kapilárou a detektorem. Mechanismus separace je dán pouze složením pufru.

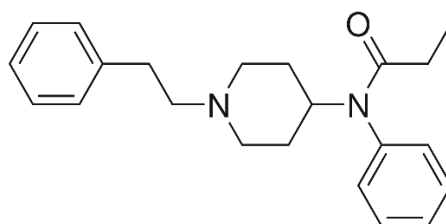
Typ detektoru se odvíjí od vlastností analytů určených k separaci. Mezi nejčastější kombinaci pro kapilární elektroforézu patří spektrofotometrický detektor UV/VIS (DAD, PDA). Tenzidy bez aromatického jádra absorbují v UV/VIS oblasti zanedbatelně, proto je lze bez problému použít pro separaci a detekci sloučenin, které UV/VIS záření absorbují. [17]

#### 2.1.5.3 Aplikace MEKC

Separční metoda MEKC umožňuje použití v široké oblasti. Disponuje možností separace neutrálních hydrofobních analytů, ale také ionizovatelných analytů. Nejčastěji se využívá ve farmaceutické analýze, kde se kontrolují hlavní složky léčiv, nečistoty a oddělují se enantiomery. Své uplatnění však našla i v analýze potravin nebo u vzorků životního prostředí. [17]

## 2.2 Fentanyl

Fentanyl je syntetický opioid, který je 80 až 100x silnější než morfin. Byl vyvinut v roce 1959 a zaveden jako nitrožilní anestetikum v 60. letech 20. století. Ve farmacii se využívá také jako analgetikum k léčbě bolesti u pacientů s rakovinou, a to ve formě náplastí aplikovaných na kůži. Mimo transdermálních náplastí je fentanyl pro léčivé účely dostupný ve formě pastilek označovaných jako fentanylová „lízátka“, dále ve formě šumivých tablet, sublingválních tablet, sublingválních sprejů, nosních sprejů a injekcí. Kvůli svým silným opioidním vlastnostem je fentanyl často zneužíván, například jako příměs do heroinu. Přídavek nebo nahrazení heroinu fentanylem mnohdy vede k úmrtím z předávkování. Podobně jako ostatní opioidy (morfin, oxykodon, hydromorfon), fentanyl vyvolává účinky jako euforie, úleva od bolesti, sedace, zmatenost, zvracení nebo zúžení zornic. [18], [19]

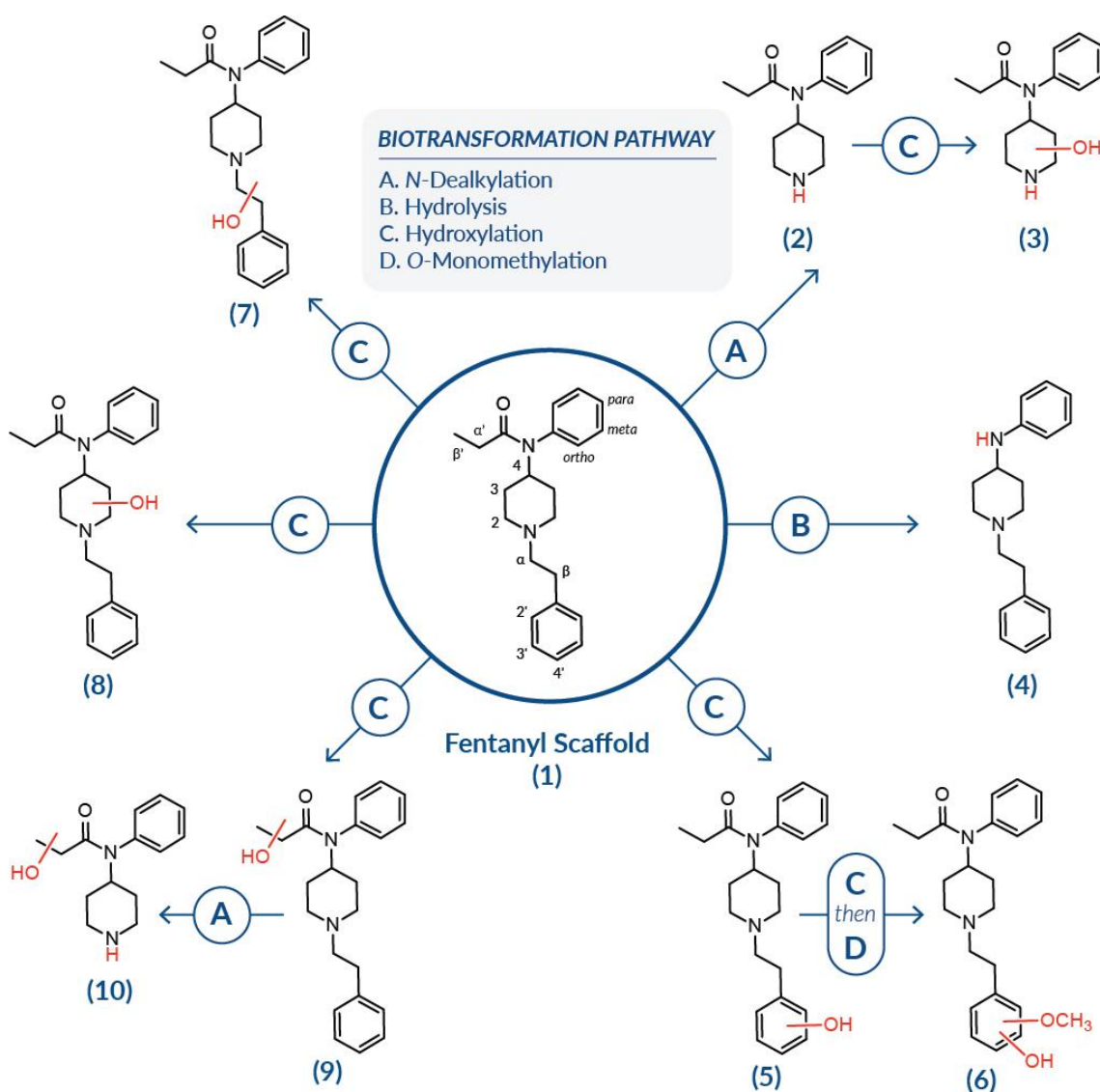


Obrázek 7: Struktura fentanylu [18]

### 2.2.1 Metabolismus fentanylu

Metabolismus fentanylu byl dobře prostudován, ale méně se ví o metabolismu novějších sloučenin podobných fentanylem, které se na trhu objevily. [19] Fentanyl je rychle metabolizován v játrech enzymy cytochromu P450 na několik metabolitů souhrnně označovaných jako metabolity fáze I – metabolity prvního průchodu. Úlohou zmíněného metabolismu je přeměna látek na méně lipofilní molekuly, které jsou pak lépe vylučitelné. Metabolity prvního průchodu následně podléhají metabolismu druhého průchodu, který inaktivuje metabolity fáze I. Mnohé metabolity z fáze II jsou ve formě sulfátových nebo glukuronidových biologických konjugátů, které jsou ještě dále hydrofilní.

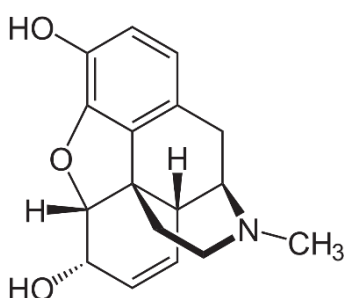
V lidské plazmě je identifikace nemetabolizovaného fentanylu snadná, zatímco v moči koncentrace metabolitů výrazně převyšuje množství původního fentanylu. Obecně platí, že při analýze vzorků moči budou nehydrolyzované vzorky vykazovat produkty glukuronidace a sulfatace fáze II, v hydrolyzovaných vzorcích moči budou detegovány pouze metabolity fáze I. [20], [21]



Obrázek 8: Hlavní navrhované cesty metabolismu fentanylu [21]

## 2.3 Morfin

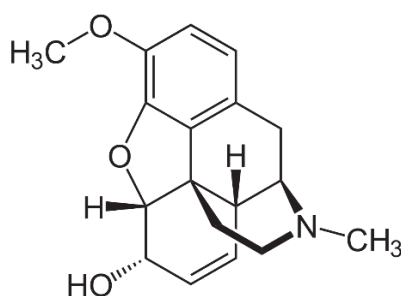
Morfin, v lékařství označován jako morfium, je přírodní opiát z pryskyřice máku setého, kde je zastoupen spolu s kodeinem (viz kapitolu 2.4) Používá se nejen jako celkové anestetikum, ale díky jeho vysokému potenciálu návyku je zneužíván také jako droga. Při předávkování je podáván naloxon jako antidotum. Mezi účinky morfinu se řadí: zmírnění bolesti, sedace, pokles dechové frekvence, nevolnost až zvracení, snížení pohyblivosti střeva – zácpa. Morfin nepříznivě ovlivňuje koordinaci pohybů a rozhodování při obsluze strojů a řízení motorových vozidel. Při vyšších dávkách (otravě) se objevuje mióza – tedy zúžení oční zornice, apatie, kóma nebo poruchy krevního oběhu. Obvyklou aplikací je intravenózní podání až šestkrát denně, přičemž morfin působí na opiátové receptory. Další možnosti užívání představují potahované tablety užívané ústy, nebo tablety s prodlouženým uvolňováním. Morfin je účinný po dobu 4 až 5 hodin, v testech je průkazný z krve, vlasů, slin nebo moči, a to i několik dní po jeho užití. [22], [23]



Obrázek 9: Struktura morfinu [22]

## 2.4 Kodein

Kodein z řeckého kodeia – makovice, je opioid široce používaný k léčbě symptomů kašle (antitusivní účinky) a nachlazení a k úlevě od bolesti (analgetické účinky). Dříve se podával také k léčbě průjmů. Přirozeně se vyskytuje, jak již bylo zmíněno, v máku setém, poprvé jej v roce 1830 izoloval Francouz Jean-Pierre Robiquet. Většinou není připravován extrakcí z makovic, ale methylací morfinu. Účinek kodeinu je zprostředkován morfinem – v organismu dochází k přeměně kodeinu na morfin. Na morfin se přemění zhruba 5-10 % kodeinu, zbývající část pak tvoří sloučeniny kodein-6-glukoronid, norkodein a hydromorfon. U některých lidí dochází k této přeměně rychleji, což vede k vysokému obsahu morfinu v krvi způsobující závažné důsledky, jako jsou kupříkladu problémy s dýcháním. Jsou stanovena doporučení farmakovigilančním výborem pro posuzování rizik léčivých přípravků (PRAC) o nepodávání kodeinu pacientům, u kterých je známá rychlejší konverze kodeinu na morfin, dále pak kojícím matkám – prostupnost významného množství do mateřského mléka a ovlivnění kojeného dítěte – a u dětí do 12 let věku. Kodein má menší účinnost než morfin, proto také není tak náchylný k vytvoření závislosti. [24], [25]

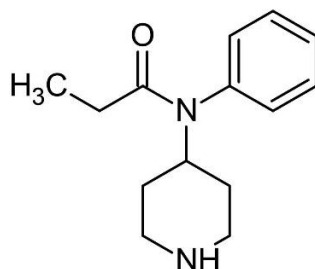


Obrázek 10: Struktura kodeinu [25]

Léky s obsahem kodeinu jsou dostupné buď na recept, nebo na volný prodej. Kodein je prodáván samostatně, nebo v kombinaci s dalšími látkami, jako je paracetamol či aspirin. Přípravky s obsahem kodeinu používané k léčbě kašle registrované v České republice jsou: Codein Slovakofarma, Panadol Ultra, Panadol Ultra Rapid, Korylan a Pleumolysin. Všechny zmíněné přípravky jsou vázány na lékařský předpis. Pro zneužívání se přestalo vyrábět analgetikum Alnagon. [24], [25]

## 2.5 Norfentanyl

Norfentanyl je hlavním metabolitem fentanylu, látkou mající vysoký potenciál zneužití, který může vést k těžké psychické nebo fyzické závislosti. Je bezprostředním chemickým prostředníkem v procesu syntézy, který v současnosti používají ilegální provozovatelé laboratoří k nezákonné výrobě fentanylu. Kontrola norfentanylu je nezbytná, aby se právě tomuto zneužití zabránilo. Není známo žádné legitimní použití norfentanylu kromě syntézy fentanylu. Norfentanyl je pro nezákonnou výrobu atraktivní, jelikož pro tuto látku neexistují chemické předpisy, je snadno dostupný u dodavatelů chemikálií a lze jej snadno převést na fentanyl. [26]

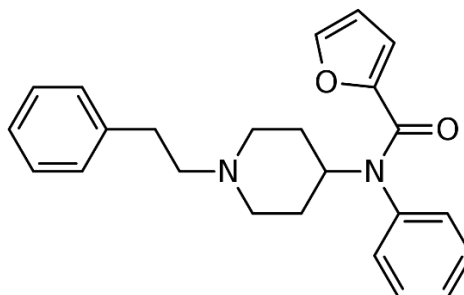


Obrázek 11: Struktura norfentanylu

## 2.6 Furanylfentanyl

Furanylfentanyl je opioidní analgetikum patřící mezi analogy fentanylu, prodáváný jako designová droga. Je přibližně z jedné pětiny tak účinný jako fentanyl. Nežádoucí účinky tohoto opioidu jsou obdobné jako u samotného fentanylu. Zahrnují tedy svědění, nevolnost a potenciálně závažnou, život ohrožující respirační depresi. [27], [28], [29]

Hladina furanylfentanylu může být stanovována v moči nebo krvi. Jako počáteční screeningové testy se často používají imunotesty, které jsou komerčně dostupné. Pro kvantifikaci se však volí chromatografické techniky. V případě smrtelného předávkování lze u oběti předpokládat 1-45  $\mu\text{g/l}$  furanylfentanylu v krvi. [27], [30], [31]

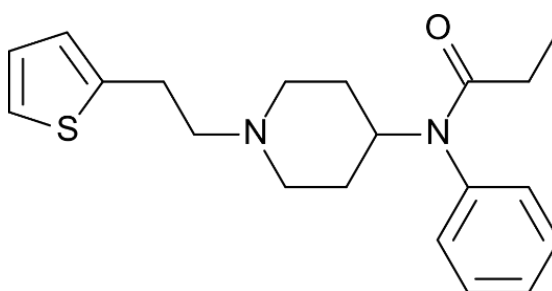


Obrázek 12: Struktura furanylfentanylu [27]



## 2.7 Thiofentanyl

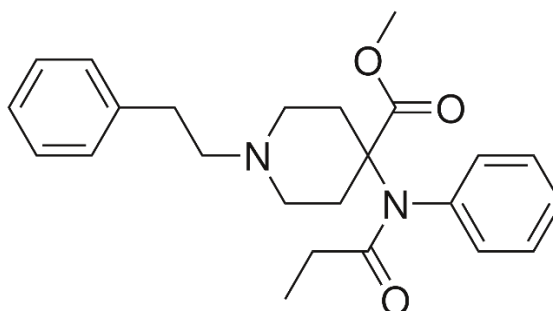
Dalším opioidním analgetikem ve výčtu analogů fentanylu, je thiofentanyl. Řadí se mezi piperidiny, thiofeny a anilidy. Rovněž u tohoto analogu jsou pozorovány podobné účinky jako v případě samotného fentanylu (svědění, nevolnost, možná potenciálně život ohrožující respirační deprese) a potenciál jeho zneužití je také vysoký. [32], [33] Thiofentanyl se používá hlavně při anestezii zvířat. [34]



Obrázek 13: Struktura thiofentanylu [32]

## 2.8 Karfentanyl

Karfentanyl, analgetikum morfinové třídy anilidového typu, je nejsilnější známý opioid s 10 000násobným účinkem, než je tomu u morfinu. Oproti heroinu je účinnost vyšší 4 000x, a 20–100x účinnější než fentanyl. Skupinou chemiků z belgické Janssen Pharmaceutica byl poprvé syntetizován v polovině 70. let minulého století. [35] Vzhledem k pevné vazbě na opioidní receptory a velmi silnému účinku, se karfentanyl v humánní medicíně nepoužívá. V dávce 10 mg/6 t se však karfentanyl využívá k imobilizaci zvířat, jako jsou sloni, nosorožci, medvědi, a to například v případě potřeby zvířata transportovat. [36] Výborně se také hodí pro studium interakce opioidu se svým receptorem. Účinky a vedlejší účinky karfentanylu jsou shodné s účinky ostatních opioidů – euforie, relaxace, úleva od bolesti, zúžení zornic, nízký krevní tlak, ospalost, ztráta vědomí a potlačení dýchání. Nástup účinku je velmi rychlý a působí déle než fentanyl. Karfentanyl se vyskytuje rovněž jako nelegální droga užívána injekčně, nebo inhalačně. Nejčastěji se přidává nebo prodává jako heroin, protože je levnější, snadněji se vyrábí a získává. [37] V této souvislosti byla hlášena úmrtí. [38] V červnu roku 2016 kanadská policie zabavila jeden kilogram karfentanylu dodaného z Číny. Zásilka obsahovala 50 miliónů smrtelných dávek drogy, což je více než dost na zničení celé populace země. [37] Toxicita karfentanylu – srovnatelná s toxicitou nervového plynu – a jeho snadná dostupnost vyvolaly obavy z jeho potenciálního zneužití jako zbraň hromadného ničení teroristickými skupinami. [37] Účinky karfentanylu, včetně předávkování, mohou zvrátit jeho antagonisté – naltrexon a naloxon. Avšak ve srovnání s ostatními opioidy, mohou být nutné vyšší nebo vícenásobné dávky než obvykle. [35], [36], [40]



Obrázek 14: Struktura karfentanylu [40]

### 3 Experimentální část

Ve druhé části diplomové práce bude demonstrována MEKC metoda pro stanovení rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu. Nejdříve bude práce zaměřena na separaci benzenu, toluenu, etylbenzenu, propylbenzenu, butylbenzenu a tokoferolu pro „kalibraci“ vhodných podmínek. Následovat bude experimentální studium dvou léčiv, yohimbinu a chlorcyklizinu, se známými rozdělovacími koeficienty pro ověření funkčnosti metody. A následně bude MEKC metoda využita pro stanovení rozdělovacích koeficientů fentanylu a jeho strukturních analogů.

#### 3.1 Chemikálie

Kyselina fosforečná, kyselina boritá, dodecyl sulfát sodný, vše zakoupeno od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) v čistotě p. a.

Benzen, toluen, etylbenzen, propylbenzen, butylbenzen, tokoferol o koncentracích p. a., zakoupeno od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Fentanyl, kodein, morfium, karfentanyl, thiofentanyl, furanyl fentanyl, norfentanyl (zásobní koncentrace 1 mg/ml methanolu), získány od RNDr. Jany Skopalové, Ph. D. (Katedra analytické chemie, PŘF UP Olomouc).

#### 3.2 Zařízení

Kapilární elektroforéza Agilent Technologies 7100 s UV detektorem diodového pole.

### 3.3 Výsledky a diskuse

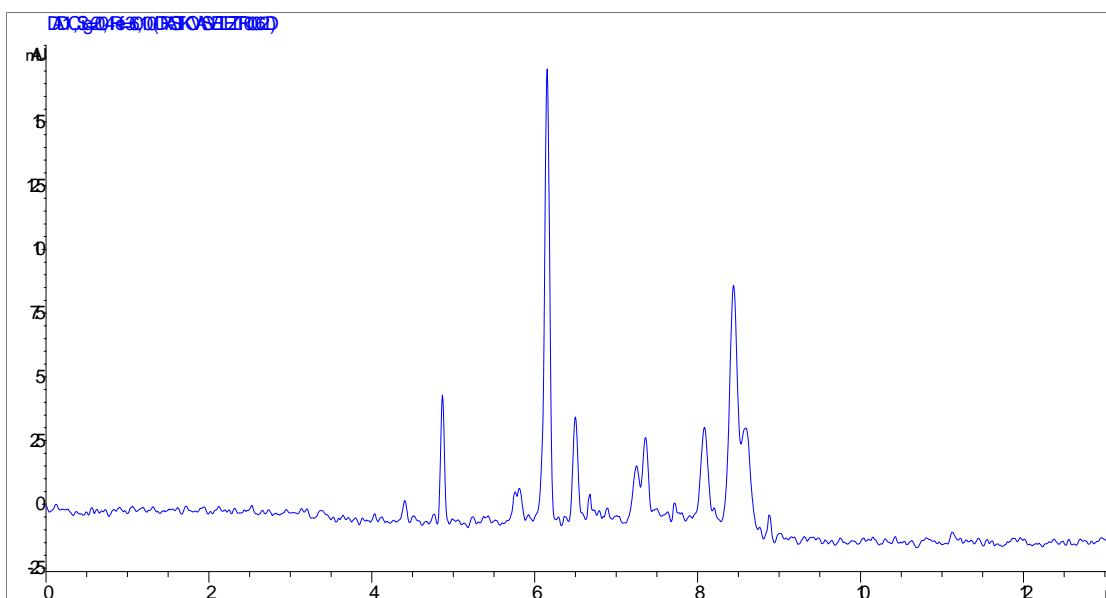
V následující kapitole bude sepsán postup stanovení rozdělovacích koeficientů fentanylu a jeho derivátů. Zároveň budou v této části diplomové práce zhodnoceny výsledky studia dané problematiky a následně bude zpracována diskuse k závěrům z toho plynoucích v kontrastu se současnými poznatky odborné literatury.

#### 3.3.1 Vývoj metody

Vývoji metody pro stanovení rozdělovacích koeficientů fentanylu a jeho derivátů pomocí kapilární elektroforézy s MEKC byla věnována značná část celého studia. Nejdříve bylo zkoumáno použití vhodného pufru připravovaného ředěním deionizovanou vodou ze zásobního roztoku kyseliny fosforečné, později rozpuštěním kyseliny borité v deionizované vodě pro borátový pufr. Práci s fosfátovým pufrem o pH 7,4 při různých koncentracích (10 mmol/l, 50 mmol/l) s různými přídávky SDS (20 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l, 100 mmol/l) nahradil pufr borátový s pH 9,5 o koncentraci 50 mmol/l s 50 mmol/l SDS. Metoda s borátovým pufrem pracovala úspěšně.

### 3.3.2 Separace standardů

Byla separována směs benzenu, toluenu, etylbenzenu, propylbenzenu, butylbenzenu a tokoferolu. Vzorčky standardů byly připraveny ředěním zásobních roztoků příslušným pufrům na koncentraci  $10^{-3}$  mol/l. Následně byl připraven směsný vzorek všech šesti standardů ( $10^{-4}$  mol/l). Poté bylo do kónické vialky odpipetováno 100  $\mu$ l vzorku. Po vložení vialky do automatického dávkovače byla spuštěna analýza. Migrační pořadí bylo ověřeno postupnou analýzou jednotlivých standardů. Hodnoty migračních časů pak byly použity k výpočtu rozdělovacích koeficientů.



Obrázek 15: Elektroferogram separace standardů

### 3.3.3 Rozdělovací koeficienty standardů – kalibrace

Nejprve byly vypočteny kapacitní faktory ( $k$ ) podle následující rovnice, kde  $t_{ST}$ ,  $t_{EOF}$  a  $t_{TOK}$  vyjadřují retenční časy standardů benzenu a alkylderivátů benzenu, migrační čas markeru EOF (methanolu) a markeru migračního času micel (tokoferolu). Vypočtené kapacitní faktory jsou uvedeny v tabulce 1.

$$k = \frac{t_{ST} - t_{EOF}}{t_{EOF} - \frac{t_{EOF}}{t_{TOK}} \cdot t_{ST}}$$

(8)

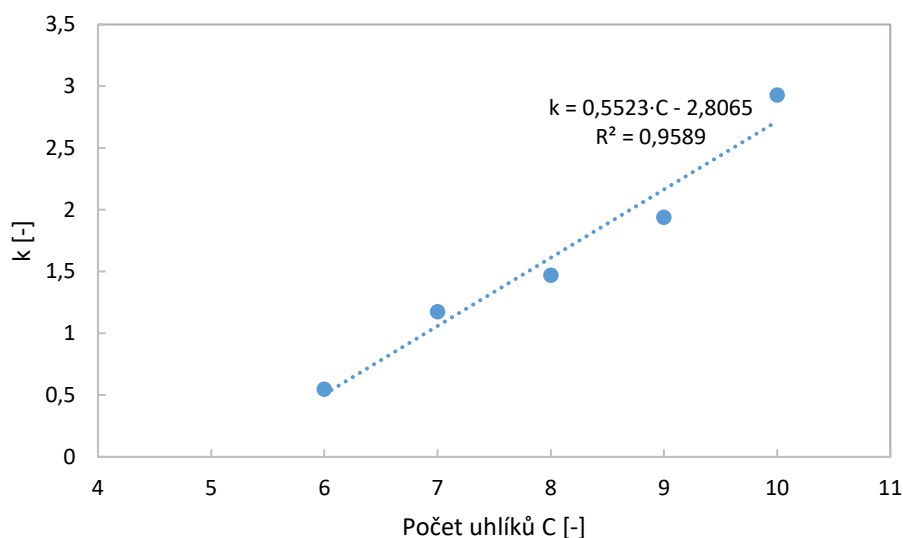
Ukázka výpočtu kapacitního faktoru pro benzen:

$$k = \frac{4,9 - 3,5}{3,5 - \frac{3,5}{16,6} \cdot 4,857} = 0,548076$$

Tabulka 1 Kapacitní faktory standardů

| Standardy    | t [min] | k [-]    | Počet uhlíků [-] |
|--------------|---------|----------|------------------|
| benzen       | 4,9     | 0,548076 | 6                |
| toluen       | 6,1     | 1,174422 | 7                |
| etylbenzen   | 6,6     | 1,470286 | 8                |
| propylbenzen | 7,3     | 1,937942 | 9                |
| butylbenzen  | 8,5     | 2,927690 | 10               |
| tokoferol    | 16,6    |          |                  |

Kapacitní faktory ( $k$ ) by teoreticky měly lineárně růst s počtem uhlíků v hydrofobní molekule. Na následujícím grafu (Obrázek 16) je vyobrazena závislost kapacitního faktoru na počtu uhlíků. Závislost je lineární ( $R^2 = 0,96$ ) a lze ji tedy použít pro další výpočty rozdělovacích koeficientů.

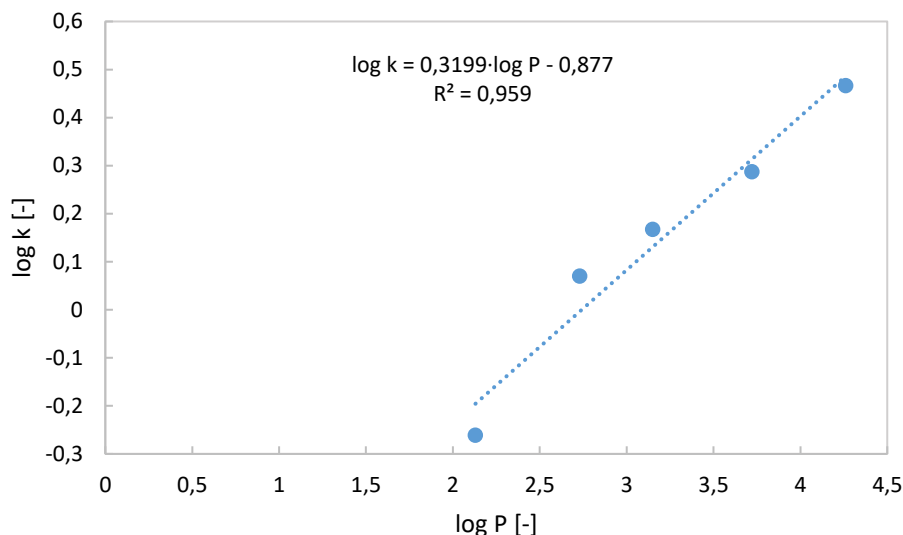


Obrázek 16: Grafické znázornění kapacitního faktoru a počtu uhlíků

Rozdělovací koeficient lze obecně zjistit z lineární závislosti logaritmu rozdělovacího koeficientu ( $\log P$ ) na logaritmu kapacitního faktoru ( $\log k$ ). Tato závislost je čistě obecná  $\log P = a \log k + b$  a odpovídá i mechanismu rozdělování v micelární elektrokinetické chromatografii. Pro určení této závislosti bylo využito již zmíněné měření kapacitních faktorů standardů alkybenzenů a známé hodnoty jejich rozdělovacích koeficientů. Následující tabulka uvádí tabelované hodnoty logaritmů rozdělovacích koeficientů pro jednotlivé standardy a také experimentálně získané logaritmy kapacitních faktorů. Tyto hodnoty pak byly vyneseny v grafu s lineární regresí (Obrázek 17).

Tabulka 2: Rozdělovací koeficienty a kapacitní faktory standardů

| Standardy    | $\log P$ [-] | $\log k$ [-] |
|--------------|--------------|--------------|
|              | Tabulky      | Výpočet      |
| benzen       | 2,13         | -0,261159    |
| toluen       | 2,73         | 0,069824     |
| etylbenzen   | 3,15         | 0,167402     |
| propylbenzen | 3,72         | 0,287341     |
| butylbenzen  | 4,26         | 0,466525     |



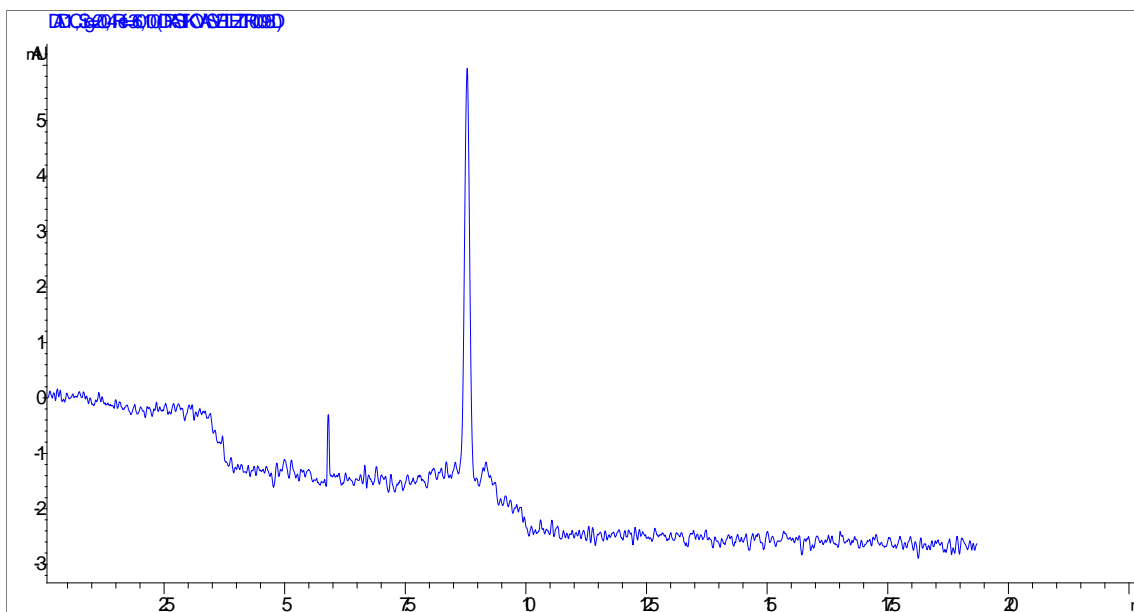
Obrázek 17: Grafická závislost log k a log P

Z Obrázku 17 je patrné, že závislost logaritmu kapacitního faktoru na logaritmu rozdělovacího koeficientu je lineární a lze ji použít pro výpočty rozdělovacích koeficientů derivátů fentanylu.

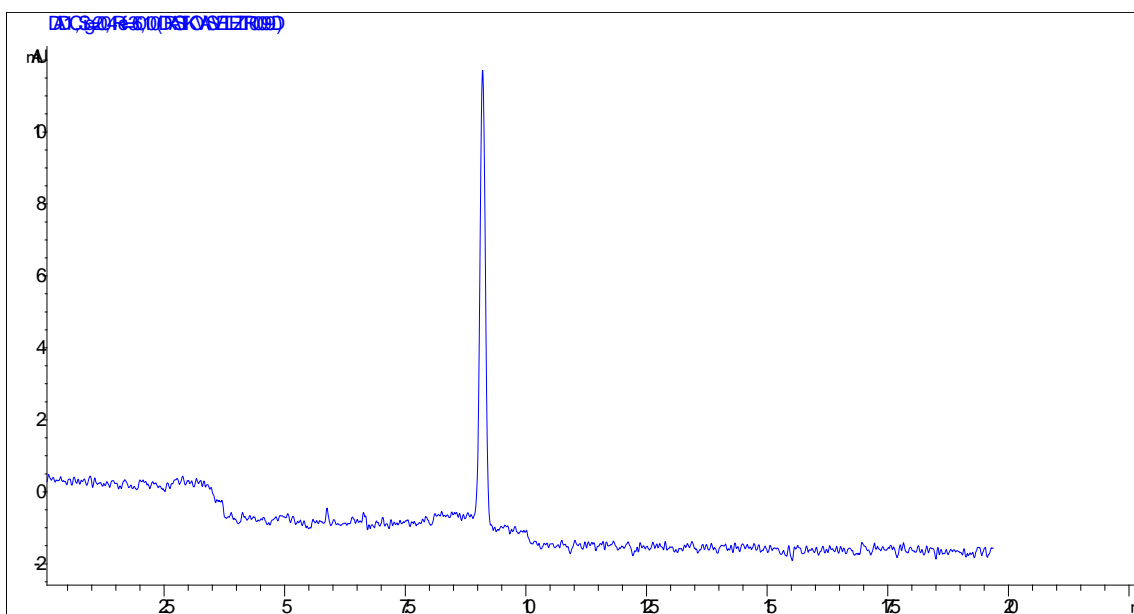
### 3.3.4 Léčiva

Pro ověření metody stanovení rozdělovacích koeficientů byla studována také dvě léčiva, jmenovitě yohimbin a chlorcyklizin. Yohimbin hydrochlorid je výtažek, alkaloid, ze stromové kůry afrického yohimbe sloužící k léčbě mužské impotence, ale je účinný i při snižování tělesného tuku u mužů a žen. Dále yohimbin zvyšuje krevní tlak a má antidiuretické účinky. Chlorcyklizin je oproti tomu antihistaminikum, které zmírňuje účinky vysoké hladiny histaminu v těle jako je svědění, kýčání, vodnaté oči a výtok z nosu. Oba vzorky byly připraveny rozpuštěním zmiňovaných účinných látek na požadovanou koncentraci  $10^{-4}$  mol/l. Elektroforegramy dvou zmíněných léčiv jsou uvedeny níže. Retenční čas yohimbinu byl 8,8 min a v případě chlorcyklizinu 9,1 min.





Obrázek 18: Elektroferogram yohimbinu



Obrázek 19: Elektroferogram chlorcyclizinu

Tabulka 3 uvádí hodnoty retenčních časů a příslušných kapacitních faktorů dvou studovaných léčiv získaných z rovnice pro výpočet kapacitních faktorů (8).

Tabulka 3: Kapacitní faktory studovaných léčiv

| Léčiva        | t [min] | k [-]    | log k [-] |
|---------------|---------|----------|-----------|
| yohimbin      | 8,785   | 3,059323 | 0,485625  |
| chlorcyklizin | 9,105   | 3,386813 | 0,529791  |

Rozdělovací koeficienty yohimbinu a chlorcyklizinu byly získány dosazením do rovnice lineární regrese z grafu – Obrázek 17. Tabulka 4 uvádí experimentálně zjištěné hodnoty a srovnání s tabelovanými hodnotami rozdělovacích koeficientů.

$$\log k = 0,3199 \cdot \log P - 0,877$$

(9)

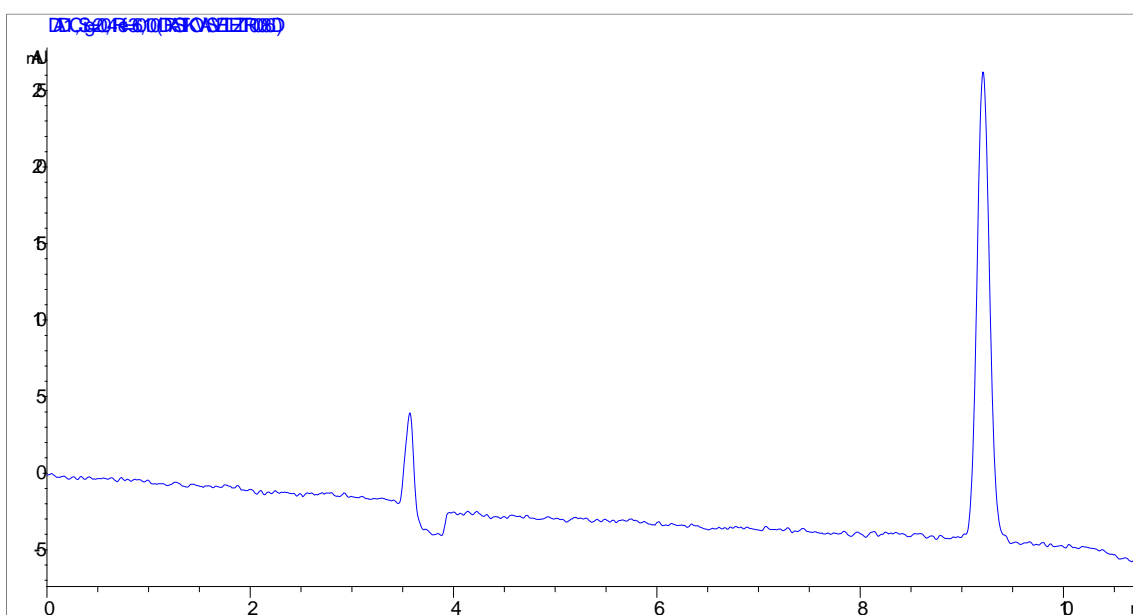
Tabulka 4: Rozdělovací koeficienty léčiv

| Léčiva        | log P   |          |
|---------------|---------|----------|
|               | Tabulky | Výpočet  |
| yohimbin      | 2,90    | 4,259535 |
| chlorcyklizin | 3,67    | 4,397597 |

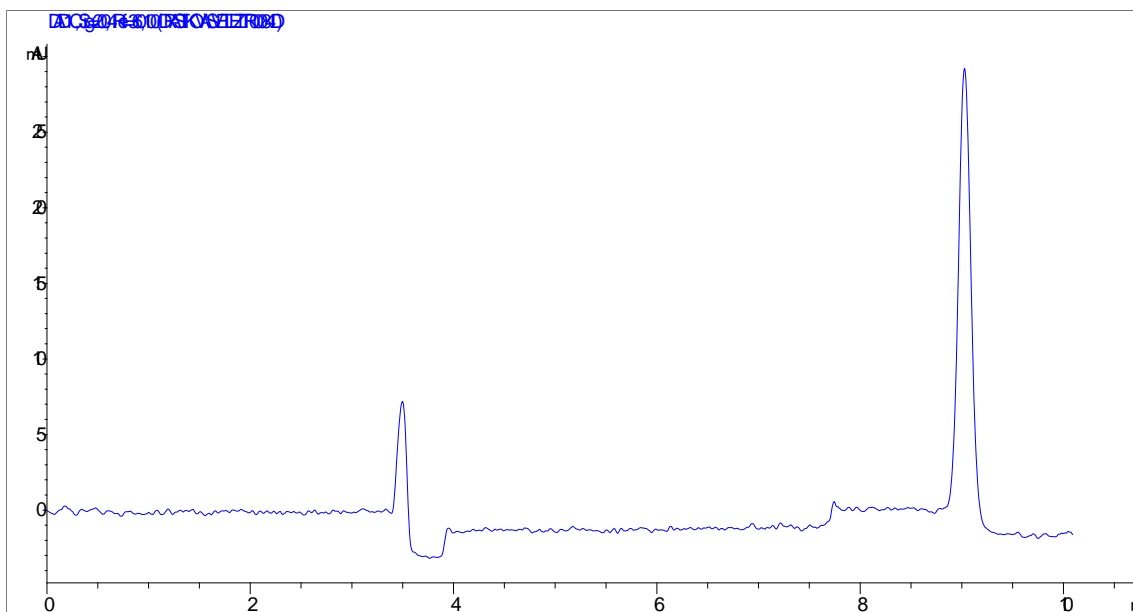
Hodnoty rozdělovacích koeficientů (log P) jsou relativně podobné, odlišnosti v absolutních hodnotách mohou být způsobeny použitím jiných prostředích pro zjištění log P hodnot. V případě této DP je používán borátový elektrolyt o pH 9,5 o relativně malé iontové síle. Naopak v případě klasických technik (vytřepávání) je často používáno např. prostředí o fyziologickém pH (7,4), případně jiné iontové síle.

### 3.3.5 Rozdělovací koeficienty fentanylu a jeho derivátů

K dispozici byly vzorky fentanylu, morfinu, kodeinu, furanyl fentanylu, thiofentanylu, norfentanylu a karfentanylu o koncentracích 1 mg/1 ml methanolu. Tyto roztoky opioidů byly dále ředěny borátovým pufrům s SDS. Z migračních časů byly stanoveny hodnoty rozdělovacích koeficientů fentanylu a jeho derivátů. Níže budou zobrazeny ukázky vybraných elektroferogramů.



Obrázek 20: Elektroferogram karfentanylu



Obrázek 21: Elektroferogram fentanylu

Podobně jako v případě léčiv v předchozí kapitole byly nejprve vypočteny kapacitní faktory fentanylů a následně jejich logaritmované hodnoty (Tabulka 5). Tyto hodnoty byly dosazeny do regresní rovnice získané měřením standardů alkybenzenů a poté byly vypočteny rozdělovací koeficienty fentanylu a jeho derivátů (Tabulka 6).

Tabulka 5: Kapacitní faktory fentanylu a jeho derivátů

| Fentanyly        | t [min] | k [-]    | log k [-] |
|------------------|---------|----------|-----------|
| karfentanyl      | 9,209   | 3,499354 | 0,543988  |
| kodein           | 8,426   | 2,722440 | 0,434958  |
| thiofentanyl     | 8,989   | 3,264916 | 0,513872  |
| norfentanyl      | 9,233   | 3,525776 | 0,547255  |
| furanyl fentanyl | 8,993   | 3,269058 | 0,514423  |
| fentanyl         | 9,027   | 3,304437 | 0,519097  |
| morfin           | 6,639   | 1,406803 | 0,148233  |

Tabulka 6: Rozdělovací koeficienty fentanylu a jeho derivátů

| Fentanyly        | log P [-]   |
|------------------|-------------|
|                  | Výpočet     |
| karfentanyl      | 4,44 ± 0,22 |
| kodein           | 4,10 ± 0,15 |
| thiofentanyl     | 4,35 ± 0,18 |
| norfentanyl      | 4,45 ± 0,22 |
| furanyl fentanyl | 4,35 ± 0,21 |
| fentanyl         | 4,36 ± 0,16 |
| morfin           | 3,20 ± 0,13 |

Zjištěné hodnoty rozdělovacích koeficientů se v případě zkoumaných fentanylů od sebe příliš neliší (log P je v rozmezí 4,53 – 4,45). Kodein a morfin jakožto „klasické“ opiáty mají o něco nižší hodnoty. Deriváty fentanylu jsou více lipofilní. V literatuře lze najít predikce log P hodnot (na základě výpočetních programů; např. DrugBank), kdy například thiofentanyl má predikovanou hodnotu log P = 4,21, případně fentanyl log P = 4,12. Je tedy zřejmé, že MEKC metoda poskytla dostatečně validní výsledky a je možné ji dále používat pro stanovení rozdělovacích koeficientů zejména u látek, které jsou finančně nákladné nebo jsou k dispozici ve velmi malých množstvích (a nebylo by možné použití klasických, například třepacích metod).

## 4 Závěr

Byla zpracována rešerše z literárních zdrojů v oblasti kapilární elektroforézy, zaměřená především na metodu micelární elektrokinetické chromatografie, na základní principy separace ve stejnosměrném elektrickém poli, dále na seznámení se s termíny elektroosmotický tok a elektroforetická mobilita. Tato práce byla orientována na stanovení rozdělovacích koeficientů u osmi opioidů – fentanylu a jeho strukturních analogů. Z literární rešerše plyne výhoda použití kapilární elektroforézy s micelární elektrokinetickou chromatografií pro stanovení rozdělovacích koeficientů.

Stanovení rozdělovacích koeficientů fentanylu a jeho metabolitů či strukturních analogů pomocí kapilární elektroforézy s MEKC, bylo jednou z hlavních motivací této práce. Konvekční metoda třepací lahve je oproti separačním metodám časově náročná a jsou k ní potřeba velké objemy rozpouštědel v požadované čistotě. Proto se dnes ke zmíněné metodě, vzhledem k jejím nevýhodám, příliš nepřistupuje. Oproti tomu je v případě kapilární elektroforézy zajisté žádoucí co nejmenší zatížení životního prostředí díky malé spotřebě vzorků i rozpouštědel.

## Seznam obrázků

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu [4].....   | 14 |
| Obrázek 2: Schéma UV-VIS detektoru s variabilní vlnovou délkou [5].....   | 17 |
| Obrázek 3: Schéma detektoru diodového pole [5] .....  | 17 |
| Obrázek 4: Schematický diagram vzniku elektroosmotického toku [8].....  | 19 |
| Obrázek 5: Parabolický profil průtoku kapaliny při hydrodynamickém čerpání (vlevo), plochý profil způsobený EOF (vpravo) [10] ..... | 20 |
| Obrázek 6: Schéma vzniku micely z monomerů tenzidu .....  | 24 |
| Obrázek 7: Struktura fentanylu [18].....  | 27 |
| Obrázek 8: Hlavní navrhované cesty metabolismu fentanylu [21].....  | 28 |
| Obrázek 9: Struktura morfinu [22] .....   | 29 |
| Obrázek 10: Struktura kodeinu [25] .....  | 30 |
| Obrázek 11: Struktura norfentanylu.....   | 31 |
| Obrázek 12: Struktura furanylfentanylu [27].....  | 32 |
| Obrázek 13: Struktura thiofentanylu [32] .....  | 33 |
| Obrázek 14: Struktura karfentanylu [40].....  | 34 |
| Obrázek 15: Elektroferogram separace standardů.....   | 37 |
| Obrázek 16: Grafické znázornění kapacitního faktoru a počtu uhlíků .....  | 39 |
| Obrázek 17: Grafická závislost log k a log P .....  | 40 |
| Obrázek 18: Elektroferogram yohimbinu.....  | 41 |
| Obrázek 19: Elektroferogram chlorcyklizinu.....   | 41 |

Obrázek 20: Elektroferogram karfentanylu..... 43

Obrázek 21: Elektroferogram fentanylu ..... 44

### Seznam tabulek

Tabulka 1 Kapacitní faktory standardů..... 38

Tabulka 2: Rozdělovací koeficienty a kapacitní faktory standardů ..... 39

Tabulka 3: Kapacitní faktory studovaných léčiv ..... 42

Tabulka 4: Rozdělovací koeficienty léčiv ..... 42

Tabulka 5: Kapacitní faktory fentanylu a jeho derivátů ..... 44

Tabulka 6: Rozdělovací koeficienty fentanylu a jeho derivátů ..... 45



## 5 Literatura

- [1] LAUER, H. H. a G. P. ROZING. *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer* [online]. 2nd. Německo: Agilent technologies, 2014 [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: [www.agilent.com](http://www.agilent.com)
- [2] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, and Th. P. E. M. Vergeegen, *J. Chromatog.* **169** (1979), 11-20.
- [3] James W. Jorgenson and Krynn DeArman Lukacs, *Anal. Chem.* **53** (1981), 1298-1302.
- [4] Capillary electrophoresis. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2021 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary\\_electrophoresis](https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis)
- [5] BRUKER, Dale R. Capillary electrophoresis: Techniques in Analytical Chemistry. I. title. Canada: Wiley-Interscience, c1995. ISBN 0-471-11763-3.
- [6] BUSZEWSKI, Boguslaw a Ewelina DZIUBAKIEWICZ, SZUMSKI, Michal, ed. Electromigration Techniques: Theory and Practice. Poland: Springer, c2013. ISBN 978-3-642-35042-9.
- [7] Ludvig Huber and Stephan A. George, Eds., Diode Array Detection in HPLC. New York: Marcel Dekker, 1993, ch. 3
- [8] Theory of Capillary Electrophoresis: Modern Analytical Chemistry: Chromatographic and Electrophoretic Methods. BrainKart.com [online]. Chennai: Therithal info, c2018-2023 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: [https://www.brainkart.com/article/Theory-of-Capillary-Electrophoresis\\_29777/](https://www.brainkart.com/article/Theory-of-Capillary-Electrophoresis_29777/)
- [9] Takao Tsuda, Kazuhiro Nomura, Genkichi Nakagawa, *J. Chromatog.* **248** (1982), 241-247.
- [10] TARN, M.D. a N. PAMME. Microfluidics. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering [online]. Elsevier, 2014, 2014, 2013(September), 2 [cit. 2022-03-14]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.05351-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.05351-8)
- [11] Cronin, M. T. D., The role of hydrophobicity in toxicity prediction. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2006, 2, 405–413.
- [12] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris 1992; No. 107
- [13] Berthod, A., Carda-Broch, S., Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 3–14.
- [14] Herbert, B. J., Dorsey, J. G., n-Octanol-water partition coefficient estimation by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* 1995, 67, 744–749.

- [15] Gavenda, A., Bednář, P., Barták, P., Adamovský, P., Ševčík, J., Tzoumas, P., Ulrichová, J., Estimation of partition coefficients by MEKC Part I: potential pharmaceuticals based on 2-guinolone and 2-indolone. *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 723–728.
- [16] TOMKOVÁ, Jana, Martin ŠVIDRNOCH, Vítězslav MAIER a Peter ONDRA. Analysis of selected designer benzodiazepines by ultra high performance liquid chromatography with high-resolution time-of-flight mass spectrometry and the estimation of their partition coefficients by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2017, 40(9), 2037-2044 [cit. 2022-03-17]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700069
- [17] Micelární chromatografie a micelární elektrokinetická chromatografie. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: Lucie Nováková, 2013, s. 174-182. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [18] Fentanyl. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2022 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fentanyl>
- [19] Fentanyl: Narcotics (opioids). *Get smart about drugs* [online]. 2021, 14. 12. 2021 [cit. 2022-03-01]. Dostupné z: <https://www.getsmartaboutdrugs.gov/drugs/fentanyl>
- [20] WILDE, Maurice, Simona PICHINI, Roberta PACIFICI, Adriano TAGLIABRACCI, Francesco Paolo BUSARDÒ, Volker AUWÄRTER a Renata SOLIMINI. Metabolic Pathways and Potencies of New Fentanyl Analogs. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2019, 10 [cit. 2022-04-21]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.00238
- [21] IULA, Dona M. What Do We Know about the Metabolism of the New Fentanyl Derivatives?. In: *Cayman chemical* [online]. USA: Cayman chemical, 2017, 2017-08-23 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/news/what-do-we-know-about-the-metabolism-of-the-new-fentanyl-derivative>
- [22] Morfin. *WikiSkripta* [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2019 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Morfin>
- [23] Morfin: účinná látka. *Linkos* [online]. Praha: Linkos-Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, c2022 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/morfin-ucinna-latka/>
- [24] Kodein-omezení používání pro léčbu kašle a nachlazení u dětí. SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. Praha, 2015 [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/kodein-omezeni-pouzivani-pro-lecibu-kasle-a-nachlazení-u-deti>
- [25] Kodein. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2022, 29. 1. 2022 [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kodein>

- [26] Control of the Immediate Precursor Norfentanyl Used in the Illicit Manufacture of Fentanyl as a Schedule II Controlled Substance. Federal register [online]. USA, 2020, 17. 4. 2020 [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.federalregister.gov/documents/2020/04/17/2020-07381/control-of-the-immediate-precursor-norfentanyl-used-in-the-illicit-manufacture-of-fentanyl-as-a>
- [27] Furanylfentanyl. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 8. 3. 2022 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Furanylfentanyl>
- [28] CHEN, Quan, You SHANG, Yong XU, Ping LI, Ping LI a Guo-Li LIU. Analgesic effect and pharmacological mechanism of fentanyl and butorphanol in a rat model of incisional pain. Journal of Clinical Anesthesia [online]. 2016, 28, 67-73 [cit. 2022-04-01]. ISSN 09528180. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclinane.2015.08.010
- [29] BAGLEY, Jerome R., Richard L. WYNN, Frieda G. RUDO, Brian M. DOORLEY, H. Kenneth SPENCER a Theodore SPAULDING. New 4-(heteroanilido)piperidines, structurally related to the pure opioidagonist fentanyl, with agonist and/or antagonist properties. Journal of Medicinal Chemistry [online]. 1989, 32(3), 663-671 [cit. 2022-04-01]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm00123a028
- [30] MOHR, Amanda L. A., Melissa FRISCHIA, Donna PAPSUN, Sherri L. KACINKO, David BUZBY a Barry K. LOGAN. Analysis of Novel Synthetic Opioids U-47700, U-50488 and Furanyl Fentanyl by LC-MS/MS in Postmortem Casework. Journal of Analytical Toxicology [online]. [cit. 2022-04-01]. ISSN 0146-4760. Dostupné z: doi:10.1093/jat/bkw086
- [31] DYBOWSKI, Michal P. a Andrzej L. DAWIDOWICZ. Furanylfentanyl in whole blood measured by GC-MS/MS after QuEChERS extraction in a fatal case. Forensic Toxicology [online]. 2020, 38(2), 496-504 [cit. 2022-04-01]. ISSN 1860-8965. Dostupné z: doi:10.1007/s11419-019-00515-9
- [32] Thiofentanyl. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-c2022, 25. 3. 2022 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiofentanyl>
- [33] Thiofentanyl. PubChem [online]. USA: U.S. National Library of Medicine, 2004 [cit.2022-04-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiofentanyl>
- [34] TAGHIZADEH, M. J., S. J. HOSSEINI, S. M. MOOSAVI a H. PARSA. Improved method for the total synthesis of thiofentanyl. Journal of Heterocyclic Chemistry [online]. [cit. 2022-04-01]. ISSN 0022-152X. Dostupné z: doi:10.1002/jhet.3983
- [35] STANLEY, Theodore H., Talmage D. EGAN a Hugo VAN AKEN. A Tribute to Dr. Paul A. J. Janssen: Entrepreneur Extraordinaire, Innovative Scientist, and Significant Contributor to Anesthesiology. Anesthesia & Analgesia [online]. 2008, 106(2), 451-462 [cit. 2022-04-04]. ISSN 0003-2999. Dostupné z: doi:10.1213/ane.0b013e3181605add

- [36] ZAWILSKA, Jolanta B., Katarzyna KUCZYŃSKA, Wiktoria KOSMAL, Katarzyna MARKIEWICZ a Piotr ADAMOWICZ. Carfentanil – from an animal anesthetic to a deadly illicit drug. *Forensic Science International* [online]. 2021, 320 [cit. 2022-04-04]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2021.110715
- [37] KINETZ, Erika a Desmond Butler. Chemical weapon for sale: China's unregulated narcotic. *AP News* [online]. New York: AP, 2016, October 7, 2016 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: <https://apnews.com/article/terrorism-ap-top-news-united-kingdom-international-news-shanghai-7c85cda5658e46f3a3be95a367f727e6>
- [38] MISAILIDI, Nektaria, Ioannis PAPOUTSIS, Panagiota NIKOLAOU, Artemisia DONA, Chara SPILIOPOULOU a Sotiris ATHANASELIS. Fentanyl continues to replace heroin in the drug arena: the cases of oxycodone and carfentanil. *Forensic Toxicology* [online]. 2018, 36(1), 12-32 [cit. 2022-04-04]. ISSN 1860-8965. Dostupné z: doi:10.1007/s11419-017-0379-4
- [39] HESS, Ladislav. Carfentanil - nejsilnější známý opioid. *Remedia* [online]. Praha, 2017, 6. 9. 2017, 27(6/2017), 582-586 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Bolest/Carfentanil-nejsilnejsi-znamy-opioid/8-T-2rU.magarticle.aspx>
- [40] Carfentanil. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2021, 11. 12. 2021 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carfentanil>