

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Analýza syntetických opioidů a produktů
jejich metabolismu s využitím
elektrochemických
a separačních metod**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Kahánková

Vedoucí práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Rok odevzdání: 2022

Studijní obor: Analytická chemie

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací na téma „Analýza syntetických opioidů a produktů jejich metabolismu s využitím elektrochemických a separačních metod“ zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. a doc. RNDr. Vítězslava Maiera, Ph.D. a že jsem použila pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, aby byla práce zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci,

Tereza Kahánková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce, RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. a doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za skvělé vedení diplomové práce, za odborné konzultace v průběhu laboratorních experimentů i sepisování závěrečné práce a možnost se podílet na velmi zajímavém a přínosném projektu.

Mé díky patří také výzkumné skupině RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. za užitečné rady, nápady, pomoc v laboratoři a příležitost naučit se mnoho nových dovedností v příjemném pracovním kolektivu.

Bibliografické identifikace:

Jméno a příjmení:	Tereza Kahánková
Název práce:	Analýza syntetických opioidů a produktů jejich metabolismu s využitím elektrochemických a separačních metod
Typ práce:	diplomová
Vedoucí práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Odborný konzultant:	doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Rok odevzdání práce:	2022

Anotace:

O fentanylu a jeho analogích, patřících do skupiny syntetických opioidů, je známo, že podléhají mikrosomálnímu metabolismu katalyzovanému enzymy cytochromu P450. Cílem této práce bylo metabolizovat fentanyl a jeho vybraná analoga, furanylfentanyl, thiofentanyl, carfentanil a sufentanil, pomocí lidských jaterních mikrosomů a produkty přeměny následně analyzovat metodou LC-MS. Zároveň byly fentanyly podrobeny elektrochemické oxidaci a produkty oxidace byly porovnány s produkty získanými metabolickou přeměnou. Snahou bylo ověřit hypotézu, že metabolické i elektrochemické přeměny, lišící se mechanismem, mohou ve výsledku poskytovat totožné produkty. Srovnáním produktů vzniklých oběma transformačními procesy bylo zjištěno, že preferovanou metabolickou i elektrochemickou cestou je *N*-dealkylace za vzniku norderivátů. V případě mikrosomální metabolizace byly zaznamenány i produkty hydroxylované. Tento výsledek byl následně potvrzen oxidačním rozkladem fentanylu Fentonovým činidlem, kde mimo norfentanyl vzniklo několik izomerních hydroxyderivátů fentanylu.

Klíčová slova: nové psychoaktivní látky, syntetické opioidy, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, voltametrie

Počet stran:	50
Počet příloh:	13
Jazyk:	čeština

Bibliografic identification:

Autor's first name and surname: Tereza Kahánková
Title: Analysis of synthetic opioids and products of their metabolism using electrochemical and separation methods
Type of thesis: master's
Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Professional consultant: doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc
The year of submission: 2022

Annotation:

Fentanyl and its analogues, which belong to the group of synthetic opioids, are known to undergo microsomal metabolism catalyzed by the cytochrome P450 enzymes. The aim of this work was to metabolize fentanyl and its selected analogues, furanylfentanyl, thiofentanyl, carfentanil and sufentanil, using human liver microsomes and subsequently analyze the transformation products using LC-MS. In addition, fentanyls were subjected to electrochemical oxidation and the oxidation products were compared with the metabolic conversion products. The aim was to verify the hypothesis that metabolic and electrochemical transformations, which proceed by different mechanisms, may result in identical products. By comparing the products formed by both transformation processes, it was found that the main metabolic and electrochemical pathway is *N*-dealkylation to norderivatives. Additionally, microsomal metabolism produces hydroxylated products. This result was confirmed by the oxidative decomposition of fentanyl by Fenton's reagent, which gave rise to norfentanyl and several isomeric hydroxy derivatives of fentanyl.

Keywords: new psychoactive substances, synthetic opioids, liquid chromatography, mass spectrometry, voltammetry

Number of pages: 50
Number of attachment: 13
Language: Czech

Seznam zkratk

AD	amperometrická detekce
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AH-7921	(3,4-dichlor-N-[(1-dimethylamino)cyklohexylmethyl]benzamid)
CNS	centrální nervová soustava
CB1	kanabinoidní receptor 1
CB2	kanabinoidní receptor 2
DOC	2,5-dimethoxy-4-chloramfetamin
DOB	1-(4-brom-2,5-dimethoxyfenyl)propan-2-amin
DOI	1-(4-jod-2,5-dimethoxyfenyl)propan-2-amin
DAD	detektor diodového pole
EMIT	enzyme Multiplied Immunoassay Technique (enzymová multiplikační imunoanalýza)
ESI	ionizace elektrosprejem
F	fentanyl
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IgG	imunoglobulin G
KIMS	kinetic interaction of microparticles in solution (kinetická interakce mikročástic v roztoku)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-HRMS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií vysokého rozlišení
LC-QTOF-MS	LC-MS s analyzátozem doby letu
LLE	extrakce kapalina-kapalina
MDA	3,4-methylendioxyamfetamin
MDMA	extáze; 3,4-methylendioxyamfetamin
MDPV	methylendioxyprovaleron
MWCNT	modifikace víceštěnými uhlíkovými nanotrubičkami
MIDA	midazolam
MeOH	methanol

MT-45	1-cyklohexyl-4-(1,2-difenylethyl)piperazin
MS	hmotnostní spektrometrie
NPL	nové psychoaktivní látky
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartátový receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OS	oxidační systém
PB	fosfátový pufr
PDA	detektor fotodiodového pole
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCE	nasyčená kalomelová elektroda
SPE	extrakce tuhou fází
THFF	tetrahydrofuranyl fen anyl
UHPLC-MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie s MS
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahydrokanabinol; (6 <i>aR</i> ,10 <i>aR</i>)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl 6 <i>a</i> ,7,8,10 <i>a</i> -tetrahydro-6 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,d</i>]pyran-1-ol
2C-I	2-(4-jod-2,5-dimethoxyfenyl)ethan-1-amin
2C-D	1-(2,5-dimethoxy-4-methylfenyl)-2-aminoethan
2C-B-Fly	2-(4-brom-2,3,6,7-tetrahydrofuro[2,3- <i>f</i>][1]benzofuran-8yl)ethanamin
2C-B	2-(4-brom-2,5-dimethoxyfenyl)ethan-1-amin
2C-E	2-(4-ethyl-2,5-dimethoxyfenyl)ethan-1-amin
2C-T-7	2-[2,5-dimethoxy-4-(propylsulfanyl)fenyl]ethan-1-amin
4-ANPP	4-anilin- <i>N</i> -fenethylpiperidin

Obsah

OBSAH	8
1 ÚVOD	10
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 NOVÉ PSYCHOAKTIVNÍ LÁTKY	12
3.1.1 <i>Rozdělení nových psychoaktivních látek</i>	12
3.1.2 <i>Syntetické kanabinoidy</i>	13
3.2 FENYLETHYLAMINY	13
3.2.1 <i>Syntetické katinony</i>	14
3.3 SYNTETICKÉ OPIOIDY	14
3.3.1 <i>U-47700</i>	15
3.3.2 <i>MT-45</i>	16
3.4 FENTANYL.....	17
3.4.1 <i>Analoga fentanylu</i>	18
3.4.2 <i>Furanylfentanyl</i>	18
3.4.3 <i>Acetylfentanyl</i>	18
3.4.4 <i>Tetrahydrofuranylfentanyl (THFF)</i>	19
3.4.5 <i>Butyrfentanyl</i>	19
3.4.6 <i>Ocfentanyl</i>	20
3.4.7 <i>Akrylfentanyl</i>	20
3.4.8 <i>Sufentanil</i>	21
3.4.9 <i>Thiofentanyl</i>	21
3.4.10 <i>Další analoga fentanylu</i>	22
3.5 ANALÝZA FENTANYLŮ A JEHO ANALOG	23
3.5.1 <i>Imunochemické metody</i>	23
3.5.2 <i>Chromatografické metody</i>	23
3.5.3 <i>Elektroanalytické metody</i>	24
3.5.4 <i>Extrakční metody</i>	25
3.6 MIKROSOMÁLNÍ METABOLIZACE	26
3.7 FENTONOVA REAKCE.....	26
3.7.1 <i>Mechanismus</i>	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	29
4.2 ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE FENTANYLU A JEHO ANALOG NA PT SÍTKOVÉ ELEKTRODĚ	30
4.3 MIKROSOMÁLNÍ METABOLIZACE FENTANYLU, JEHO ANALOG A MIDAZOLAMU	31
4.3.1 <i>Slepý vzorek inkubovaný 0 minut</i>	31
4.3.2 <i>Slepý vzorek neobsahující analyt</i>	31
4.3.3 <i>Slepý vzorek neobsahující NADPH</i>	31
4.3.4 <i>Vzorek fentanylu, jeho analog a midazolamu</i>	32
4.4 REAKCE FENTANYLU S FENTANOVÝM ČINIDLEM	32
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1 ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE FENTANYLU A JEHO DERIVÁTŮ	33
5.1.1 <i>Elektrochemická oxidace fentanylu</i>	33
5.1.2 <i>Elektrochemická oxidace carfentanilu</i>	34
5.1.3 <i>Elektrochemická oxidace sufentanilu</i>	35
5.1.4 <i>Elektrochemická oxidace furanylfentanylu</i>	36
5.1.5 <i>Elektrochemická oxidace thiofentanylu</i>	37
5.2 MIKROSOMÁLNÍ METABOLIZACE FENTANYLU, JEHO ANALOG A MIDAZOLAMU	38
5.2.1 <i>Mikrosomální metabolizace fentanylu</i>	38
5.2.2 <i>Mikrosomální metabolizace carfentanilu</i>	39

5.2.3	<i>Mikrosomální metabolizace sufentanilu</i>	40
5.2.4	<i>Mikrosomální metabolizace furanylfentanylu</i>	41
5.2.5	<i>Mikrosomální metabolizace thiofentanylu</i>	42
5.3	LC-MS ANALÝZA PRODUKTŮ FENTONOVY REAKCE S FENTANYLEM	43
5.4	SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ METOD OXIDATIVNÍ TRANSFORMACE	46
6	ZÁVĚR	47
7	POUŽITÁ LITERATURA	48
8	PŘÍLOHY	51
	<i>Příloha 1: Schéma metabolitů fentanylu</i>	51
	<i>Příloha 2: Schéma derivátů fentanylu</i>	52
	<i>Příloha 3: Schéma metabolitů furanylfentanylu</i>	53
	<i>Příloha 4: Schéma metabolitů acetylfentanylu</i>	54
	<i>Příloha 5: Schéma metabolitů akrylfentanylu</i>	55
	<i>Příloha 6: Schéma metabolitů sufentanilu</i>	55
	<i>Příloha 7: Schéma metabolitů 4-fluorisobutyrylfentanylu</i>	56
	<i>Příloha 8: Schéma metabolitů carfentanilu</i>	56
	<i>Příloha 9: Mechanismus oxidace pomocí enzymu CYP450</i>	57
	<i>Příloha 10: Záznamy cyklických voltamogramů pro jednotlivé fentanily</i>	58
	<i>Příloha 11: Tabulka nalezených produktů elektrochemických a metabolických přeměn fentanylu a jeho analog a jejich LC-MS charakteristiky</i>	59
	<i>Příloha 12: Schéma mechanismu metabolické N-dealkylace aminů</i>	60
	<i>Příloha 13: Schéma mechanismu elektrochemické N-dealkylace aminů</i>	60

1 Úvod

Nové psychoaktivní látky (NPL) se v posledních letech dostaly do popředí zájmu uživatelů drog na evropské i světové úrovni [1,2]. Jedná se o látky syntetizované jako strukturní analoga či chemické deriváty již známých omamných a psychotropních látek. NPL se mohou rozdělit do několika skupin podle chemické struktury a funkce, z nichž nejpočetnější jsou syntetické kanabinoidy, fenylethylaminy, katinony a opioidy. Další skupiny NPL spolu s farmakologickými a nežádoucími účinky jsou uvedeny v Tabulce 1. Tato diplomová práce je zaměřená především na skupinu syntetických opioidů, zejména na možnosti jejich identifikace a stanovení s využitím elektrochemických metod a s využitím kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Tab. 1 Přehledová tabulka nových psychoaktivních látek a jejich účinky [3].

Chemická třída	Farmakologické účinky	Nežádoucí (toxické) účinky
Fenethylaminy	Agonismus serotonergních receptorů a inhibice zpětného vychytávání monoaminů	Zvracení, hypertenze, hypertermie, disociace, halucinace, křeče, selhání jater a ledvin
Tryptaminy	Agonismus receptoru serotoninu 2A a inhibice zpětného vychytávání serotoninu	Serotonergní přebytek, který může vést k serotoninovému syndromu, vizuální halucinace, změny smyslového vnímání
Syntetické kanabinoidy	Agonismus receptoru CB-1 a CB-2 vykazující vyšší afinitu, účinnost a potenci než Δ -9-tetrahydrokanabinol	Euforie, paranoia, tachykardie, panika, křeče, psychóza, zrakové / sluchové halucinace, zvracení
Syntetické katinony	Sympatomimetické látky, které působí na serotoninové, dopaminové a noradrenalinové cesty	Podrážděnost, neklid, paranoia, rhabdomyolýza, křeče, smrt
Piperaziny	Stimulanty, které podporují uvolňování dopaminu a noradrenalinu a inhibují zpětné vychytávání monoaminů	Hypertermie, křeče, halucinace, selhání ledvin
Arylcyklohexylaminy	Disociační anestetika, která působí jako agonisté receptoru serotoninu 2A a antagonisté NMDA receptorů a vykazují vysokou afinitu k opioidním receptorům	Zkreslené vnímání zraku a zvuku, disociace od prostředí, halucinace

2 Cíle diplomové práce

Diplomová práce je zaměřena na studium oxidativních přeměn syntetického opioidu fentanylu a čtyř jeho analog, furanylfentanylu, thiofentanylu, carfentanilu a sufentanilu. Hlavním cílem je identifikovat produkty těchto látek vznikajících při metabolických přeměnách při inkubaci s lidskými jaterními mikrosomy, elektrochemické oxidaci za konstantního potenciálu na platinové síťkové elektrodě, degradaci reakcí s Fentonovým činidlem a ověřit hypotézu, že metabolické, elektrochemické a chemické oxidační procesy mohou poskytovat stejné reakční produkty. K identifikaci produktů je využita metoda LC-MS.

3 Teoretická část

3.1 Nové psychoaktivní látky

NPL jsou substance syntetizované jako strukturní analoga či chemické deriváty již zákonem kontrolovaných látek (omamné a psychotropní látky, drogy, deriváty drog, prekurzory drog apod.) [4,5]. Jedná se o široké spektrum psychoaktivních látek s rozsáhlou škálou fyziologických účinků, jako jsou zejména účinky stimulační, halucinogenní, tlumivé a euforizující. Ve většině případů tyto sloučeniny vznikají náhradou některých ze substituentů již známých struktur psychoaktivních drog [1,2]. Tyto syntetické drogy se užívají především kvůli účinkům, ceně, čistotě a dostupnosti.

3.1.1 Rozdělení nových psychoaktivních látek

NPL lze dělit dle funkce a struktury do 5 skupin – syntetické katinony, syntetické kanabinoidy, fenethylaminy, tryptaminy, piperaziny. S výjimkou syntetických kanabinoidů se jedná o stimulantia působící na monoaminergní systémy centrální nervové soustavy (CNS). Jedná se tedy především o účinky stimulační (povzbuzující), entaktogenní (dodávající pocit velké sdílnosti) a halucinogenní. Fyziologické účinky NPS jsou shrnuty v Tabulce 2.

Jejich somatická toxicita souvisí se stimulací sympatického nervového systému, což vede k hypertenzi (zvýšení krevního tlaku), hypertermii (stav zvýšené teploty organismu vlivem poruchy termoregulace) a tachykardii (zrychlená srdeční činnost) [2].

Na trhu se od roku 2013 objevují syntetické opioidy, např. AH-7921 (AH = „Allen & Hanburys“, firma patentující drogu) [6], MT-45 (také I-C6 = C6 cyklohexanový kruh) [7], nebo také deriváty fentanylu – butyrfentanyl, acetylfentanyl a carfentanil.

Tab. 2 Převažující fyziologické účinky podle jednotlivých skupin NPL.

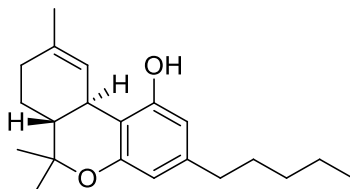
Skupina psychoaktivních látek	Hlavní fyziologický účinek
Tryptaminy	halucinogenní
Piperaziny	halucinogenní
Syntetické kanabinoidy	připomínající konopí/marihuanu
Fenethylaminy	stimulační
Katinony	stimulační
Ostatní (opioidy, amino-indany, piperidiny, arylalkylaminy, arylcyklo-hexylaminy)	stimulační, halucinogenní, popř. tlumivý (podle typu látky)

3.1.2 Syntetické kanabinoidy

Představují největší procentuální zastoupení známých NPL o nejrůznějším chemickém složení. Jedná se o agonisty kanabinoidních receptorů (CB1 a CB2) a strukturně jsou odvozeny od Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC, psychoaktivní látka marihuany). Struktura Δ^9 -THC je uvedena na Obr 1.

U těchto syntetických drog chybí komplexní údaje o toxicitě (akutní i chronické) i farmakologické údaje. Syntetické kanabinoidy vykazují vyšší afinitu k CB1 a CB2 receptorům.

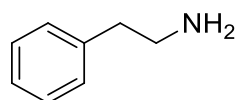
Nežádoucími psychoaktivními účinky syntetických kanabinoidů jsou psychózy, problémy s koncentrací, poruchy paměti, úzkostné stavy a změny vnímání času a prostoru. Fyziologické účinky jsou odlišné, byly popsány např. sedativní účinky, suchost v ústech, bušení srdce a třes, neklid, nevolnost, návaly horka a pálení očí [8,9].



Obr. 1 Strukturální vzorec Δ^9 -tetrahydrokanabinolu, psychoaktivní látky marihuany.

3.2 Fenylethylaminy

Druhou skupinou nových psychoaktivních látek jsou deriváty fenylethylaminu (Obr. 2). Jedná se o širokou skupinu látek, které jsou zneužívány na celém světě. Samotný fenylethylamin je endogenní sloučenina nevykazující psychoaktivní účinky. Vzniká metabolickou přeměnou z fenylalaninu a následně podléhá metabolickým přeměnám působením enzymů (monoaminooxidasy, dopamin- β -hydroxylasy) [1].



Obr. 2 Strukturální vzorec fenylethylaminu.

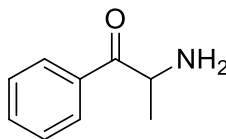
Fenylethylaminy své vlastnosti a účinky získávají při modifikacích, jako např. modifikací samotného aromatického jádra, substituentů vázaných na aromatickém kruhu či postranních řetězců [1].

Mezi fenylethylaminy patří nejrozšířenější stimulanty - 3,4-methylendioxyamfetamin (MDMA) a 3,4-methylendioxyamfetamin (MDA) a také amfetamin a metamfetamin. V poslední době se začaly objevovat na ilegální drogové scéně další deriváty odvozené od fenylethylaminu, tzv. 2C's (2C-I, 2C-D, 2C-B-Fly, 2C-B, 2C-E, 2C-T-7) a také deriváty amfetaminu (DOC, DOB, DOI) [1].

Deriváty fenylethylaminu vyvolávají změny vnímání barev, zvuků a pachů, proměnné a protichůdné změny psychiky, třes, zvracení a stavy slabosti [1].

3.2.1 Syntetické katinony

Další velmi rozšířenou skupinou návykových látek jsou deriváty odvozené od přírodního monoaminového alkaloidu, katinonu (Obr. 3).



Obr. 3 Strukturální vzorec katinonu.

Katinon je strukturálně podobný amfetaminům, stimuluje uvolňování a inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu, serotoninu a dopaminu.

Obměňování struktury katinonu vedlo k široké škále účinků. Tyto obměny zahrnují změnu délky alkylových řetězců, substituci aromatického jádra halogeny, záměnu benzenu např. za thiofén nebo naftalen. Uvedené změny vedly k syntéze mefedronu, butylonu, MDPV, methylonu nebo felfedronu [10].

Syntetické katinony mohou být užívány orálně, intranazálně (dutinou nosní), intravenózně nebo rektálně. V důsledku užívání může docházet k halucinacím, neklidu, euforii, sebevražedným myšlenkám, poruchám srdečního rytmu, hypertenzi nebo špatnému prokrvení periferních tkání [11].

3.3 Syntetické opioidy

Syntetické opioidy jsou uměle vytvořené látky schopné vazby na opioidní receptor. Tento receptor patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem a jeho ligandem jsou opioidy. Vyskytuje se převážně v membránách nervových buněk, v neuronech CNS, trávicím systému i ve svalových buňkách [12].

Syntetické opioidy zahrnují především látky odvozené od struktury fentanylu, v menším množství sloučeniny, které se svou strukturou od fentanylu liší. Je obtížné odhadnout, kolik takto synteticky připravených opioidů je uživatelům k dispozici, protože existuje nespočet úprav samotné struktury fentanylu. Tyto látky se nejčastěji prodávají jako směsi s heroinem, nebo jako padělaná léčiva připomínající tablety na předpis – hydrokodon, oxykodon.

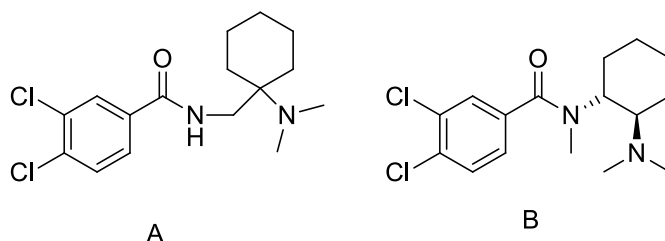
Způsoby užívání těchto syntetických opioidů jsou různé, mohou se užívat orálně, intravenózně, rektálně, pomocí inhalátoru s užitím kapalného roztoku, popř. kouřením.

Většina takto syntetizovaných léčiv nemá triviální názvy a jejich systematické názvy jsou komplikované pro běžné používání. Často jsou tedy označovány jejich registračními čísly (např. U-47700, MT-45).

Mezi běžně užívané syntetické opioidy se řadí buprenorfin, methadon, pethidin, tapentadol, tramadol a fentanyl [13].

3.3.1 U-47700

U-47700 (Obr. 4B) je nejsilnějším analogem sloučeniny AH-7921 (Obr. 4A), jejíž typické účinky se podobají morfinu a kvůli rozšířenému globálnímu zneužívání byla AH-7921 zahrnuta do Jednotné úmluvy o omamných látkách roku 2015 [14,15].

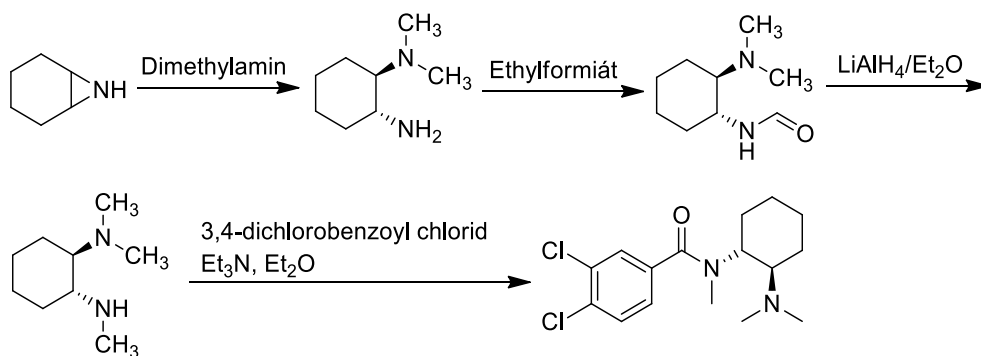


Obr. 4 Strukturální vzorce syntetických opioidů AH-7921 (A) a U-47700 (B).

U-47700 lze získat ve formě bílého prášku nebo kapaliny a díky tomu má mnoho možností podání formou inhalace, intravenózně či rektálně.

Mezi vedlejší účinky této sloučeniny se řadí pocity euforie, sedace (uklidnění), zácpy, svědění, deprese dýchání a tachykardie.

Chemická syntéza (Obr. 5) tohoto opioidu je bezproblémová a lze ji jednoduše provést. K jeho detekci ze vzorku moči či krve se využívá především tandemová hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS).

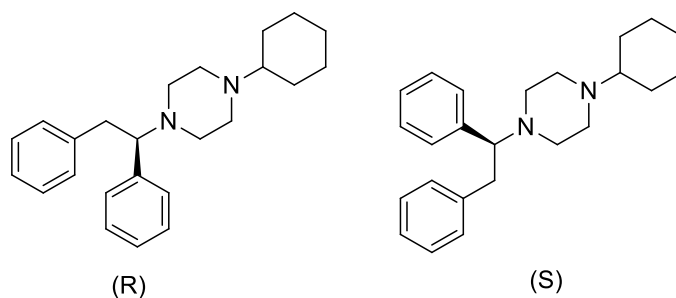


Obr. 5 Schéma chemické syntézy U-47700.

U-47700 má za následek již mnoho úmrtí v kombinaci s fentanylem a flubromazepamem. Koncentrace u intoxikovaných pacientů v krvi se pohybuje v rozmezí 10 – 250 $\mu\text{g/l}$, u zemřelých obětí akutního předávkování 100 – 1500 $\mu\text{g/l}$. Od roku 2017 je pod kontrolou Jednotné úmluvy o omamných látkách [13,14].

3.3.2 MT-45

MT-45 (Obr. 6), systematicky 1-cyklohexyl-4-(1,2-difenylethyl)piperazin, je *N,N*-disubstituovaná piperazinová sloučenina s cyklohexanovým kruhem připojeným k jednomu dusíku a 1,2-difenylethylovou skupinou vázanou k druhému dusíku. Jak je zobrazeno na obrázku 6, tento opioid je chirální molekulou s jedním centrem asymetrie a vytváří dva enantiomery.

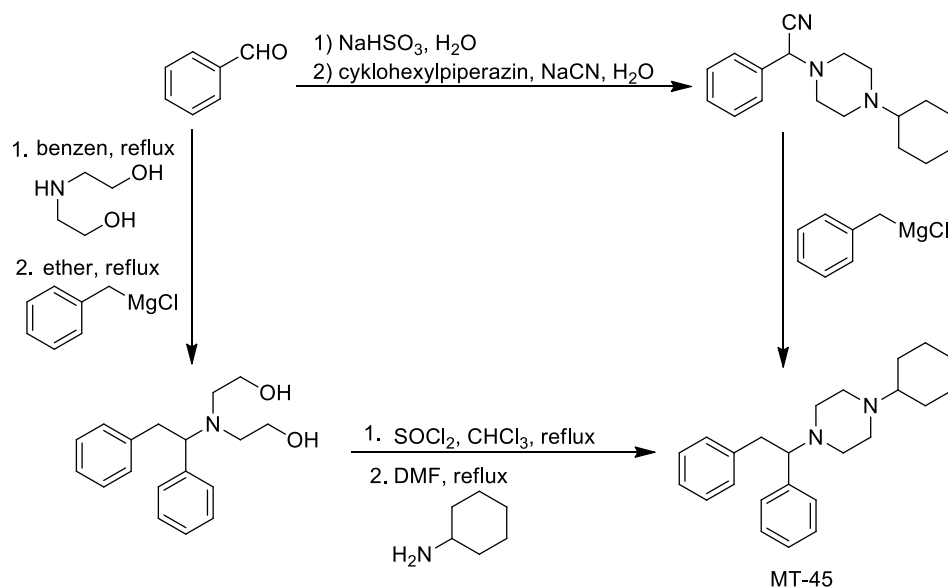


Obr. 6 Strukturální vzorce enantiomerů 1-cyklohexyl-4-(1,2-difenylethyl)piperazinu.

Jedná se o pevnou látku tvořící bezbarvé krystalky, podávající se především orálně, existují však případy podání intranazálního (nosní dutinou), intrarektálního, nebo kouřením.

1-Cyklohexyl-4-(1,2-difenylethyl)piperazin je analgetické léčivo působící nejen na opioidní receptory. V racemické podobě má přibližně 80% účinnost morfinu. Téměř veškerá aktivita opioidu spočívá v (*S*)-enantiomeru. Užíváním MT-45 může docházet k antinocicepci (tlumení nepříjemných vjemů), gastrointestinální inhibici nebo depresi dýchání [7].

Pro MT-45 existují hned dvě syntetické cesty. První syntéza vychází z reakce benzaldehydu, 2,2'-azandioldiethanolu a benzenu. Jedná se o poměrně náročnou vícekrokovou syntézu. Proto byla nalezena reakční cesta jednodušší, avšak ze stejné výchozí látky (Obr. 7).

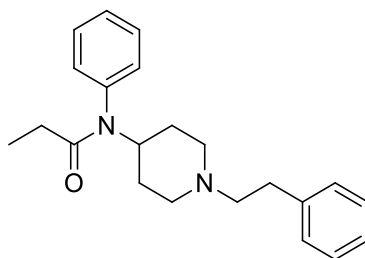


Obr. 7 Schéma dvou syntetických cest přípravy MT-45.

K identifikaci tohoto syntetického opioidu v biologických materiálech byly využity různé analytické metody včetně plynové chromatografie, LC-MS nebo imunochemických metod [13].

3.4 Fentanyl

Fentanyl (Obr. 8) je opioidní látka s vysokou účinností, 100krát účinnější než morfin a 40krát silnější než heroin. Užívá se pro léčebné účely jako anestetikum, sedativum a analgetikum [15,16]. Fentanyl podléhá metabolizaci prostřednictvím systému izoenzymů lidského cytochromu P450, konkrétně CYP3A4 [17,18] (Příloha 1). Běžná dávka fentanylu podaného formou transdermální náplasti je 25 – 50 µg/h, intranazálně pak 25 – 50 µg [19].



Obr. 8 Strukturní vzorec fentanylu.

3.4.1 Analoga fentanylu

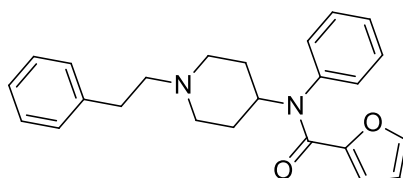
Deriváty fentanylu se obvykle získávají modifikací nebo nahrazením fentanylového propionylvého řetězce (acetylfentanyl, butyrfentanyl, furanylfentanyl, ofentanyl, akrylfentanyl, isobutyrylfentanyl) nebo nahrazením ethylfenylové skupiny (β -hydroxythiofentanyl, isofentanyl) [20]. V následujících podkapitolách jsou popsány některé známé deriváty fentanylu (Příloha 2).

3.4.2 Furanylfentanyl

N-(1-(2-fenylethyl)-4-piperidiny)-*N*-fenylfuran-2-karboxamid (Obr. 9) je analog fentanylu, který jako jeden z mála podléhá v mnohem menší míře *N*-dealkylaci. Jeho hlavní metabolickou reakcí je amidová hydrolyza za vzniku intaktní fenetyl-piperidinové skupiny, k čemuž dochází díky heterocyklickému furanu, který prochází charakteristickými bioaktivačními reakcemi [21].

Furanylfentanyl má 14 metabolitů, které vznikají zejména hydroxylací, tvorbou dihydrodiolu následovanou hydroxylací nebo *N*-dealkylací, či amidovou hydrolyzou následovanou hydroxylací s glukuronidací nebo sulfatací (Příloha 3) [20].

Při pitvě bylo prokázáno, že při intoxikaci furanylfentanylem může dojít k otokům plic či mozku [22].



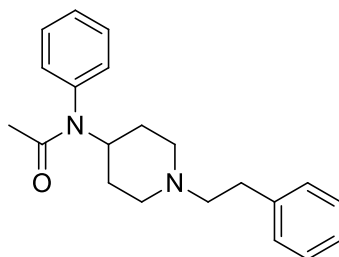
Obr. 9 Struktura furanylfentanylu.

3.4.3 Acetylfentanyl

Acetylfentanyl (Obr. 10) je derivát fentanylu vzniklý substitucí *N*-propionylvé skupiny skupinou acetylovou [23]. Tato látka je podobná heroinu v barvě, konzistenci i farmakologických účincích. Má silnější afinitu k μ -receptorům než morfin nebo heroin a je slabší než fentanyl a jeho další deriváty [24,25]. Běžná dávka orálním podáním je 3 – 5 mg [19].

Acetylfentanyl má 32 již známých metabolitů vzniklých *N*-dealkylací následovanou hydroxylací, monohydroxylací probíhající na ethylovém řetězci, následovanou glukuronidací nebo sulfatací. Další metabolity vznikají dihydroxylací s methylací na fenylvé jádře s následnou glukuronidací nebo sulfatací či amidovou hydrolyzou a

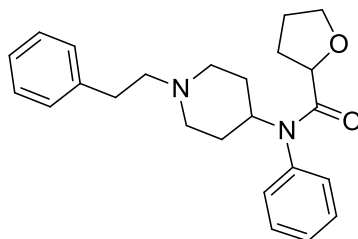
hydroxylací. Hlavním metabolitem se zdá být noracetylfentanyl generovaný *N*-dealkylací piperidinového dusíku (Příloha 4). Tato reakce vede ke ztrátě fenetylové skupiny [20].



Obr. 10 Struktura acetylfentanylu.

3.4.4 Tetrahydrofuranylfentanyl (THFF)

Na obrázku 11 je tetrahydrofuranylfentanyl nebo také *N*-fenyl-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]oxolan-2-karboxamid. Tento derivát fentanylu patří do skupiny 4-anilidopiperidinové a je agonistou μ -opioidních receptorů. THFF je strukturně velmi podobný furanylfentanylu, jen má furanové jádro nasycené [24]. Tetrahydrofuranylfentanyl má 7 známých metabolitů – 4-ANPP, OH-4-ANPP, THF-norfentanyl, hydroxylací vznikají dva další metabolity, jeden pomocí dihydroxylace a poslední hydrolýzou [24].

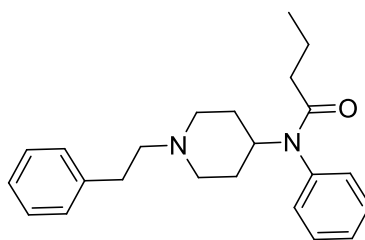


Obr. 11 Strukturní vzorec tetrahydrofuranylfentanylu.

3.4.5 Butyrfentanyl

N-[1-(2-fenethyl)-4-piperidiny]-*N*-fenylbutyramid zobrazený na obrázku 12 je silný krátkodobě působící analog fentanylu [15]. Bylo prokázáno, že by butyrfentanyl měl být sedmkrát silnější než morfin, ale pouze 0,13krát účinnější než fentanyl. U butyrfentanylu jsou známy dva metabolity – hydroxybutyrfentanyl a karboxybutyrfentanyl [26].

Možné nežádoucí účinky jsou hemoptýza, difúzní alveolární krvácení, akutní poranění plic, hypoxické respirační selhání [26].

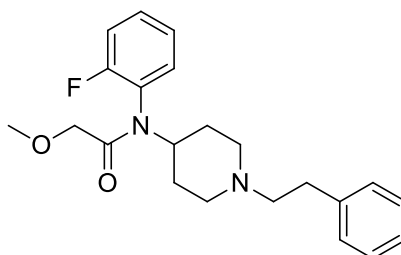


Obr. 12 Struktura butyrfentanylu.

3.4.6 Ocfentanyl

Známý také jako *N*-(2-fluorfenyl)-2-methoxy-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]acetamid, nebo A-3217 (Obr. 13) [15] je strukturně podobný fentanylu, kde místo methylové skupiny obsahuje methoxy skupinu a fluor vázaný na benzenovém jádře. U tohoto derivátu je účinek ovlivněn dávkou. Množství 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vyvolá u člověka stejnou analgezií jako 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanylu [27]. Ocfentanyl je v analgetických účincích 2,5krát silnější než fentanyl a 200krát účinnější než morfin [28].

Ocfentanyl podléhá *O*-demethylaci a/nebo hydroxylaci fenethylové skupiny a *O*-demethylaci následované glukuronidací. Hlavním metabolitem je zřejmě *O*-desmethylocfentanyl [27].

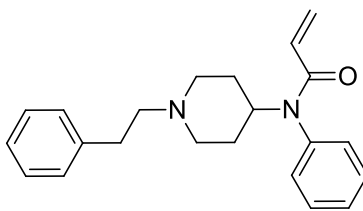


Obr. 13 Strukturní vzorec ocfentanylu.

3.4.7 Akrylfentanyl

N-fenyl-*N*-[1-(2-fenethyl)piperidin-4-yl]prop-2-enamid (Obr. 14), nebo také akryloylfentanyl je derivát fentanylu 160krát účinnější než morfin, s vysokou afinitou k μ -opioidním receptorům. Ve srovnání s morfinem nebo fentanylem vyvolává dlouhodobou analgezií [28]. Běžná dávka akrylfentanylu insuflačním podáním je 12,5 – 25 μg [19].

Nežádoucí účinky se projevují jako respirační deprese, částečná nebo úplná ztráta vědomí, zástava dechu [29]. Akrylfentanyl má mnoho druhů metabolitů, např. monohydroxylované, vzniklé *N*-dealkylací, dihydroxy metabolity, dále dihydrodiolové nebo glukuronické metabolity (Příloha 5) [20].



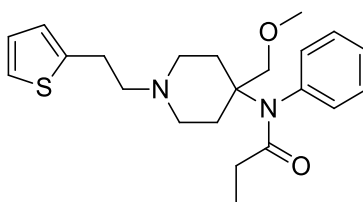
Obr. 14 Vzorec akrylfentanylu.

3.4.8 Sufentanil

N-[4-(methoxymethyl)-1-(2-thiofen-2-ylethyl)piperidin-4-yl]-*N*-fenzylpropanamid (Obr. 15) je nejúčinnějším opioidním analgetikem užívaným v lékařství. Sufentanil může být podán v různých dávkách, v nízké koncentraci (< 2 µg/kg) pro menší chirurgické zákroky, střední dávce (2 – 8 µg/kg) ve složitějších operacích a vysokém množství (8 – 50 µg/kg) v kardiochirurgii a neurochirurgii [30].

Je přibližně 5 – 10krát účinnější než fentanyl a 500krát účinnější než morfin. U pacientů byly potvrzeny respirační deprese až možná zástava dechu, nepravidelnost srdečního rytmu, změny krevního tlaku a nevolnost/zvracení. Jako antidotum je podáván naloxon.

Metabolické cesty u člověka nebyly dosud stanoveny, ale u zvířat se jedná o *N*-dealkylaci a *O*-demethylaci (Příloha 6) [31]. Alespoň jeden z metabolitů si zachovává část aktivity původní molekuly, avšak v tak nízké koncentraci, že je klinicky málo významný. Metabolity sufentanilu jsou vylučovány močí a stolicí a jejich poločas eliminace se pohybuje v rozmezí 2 – 10 hodin [30].

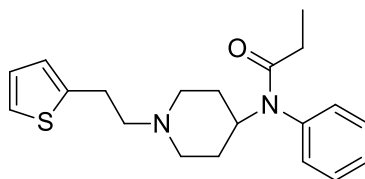


Obr. 15 Strukturní vzorec sufentanilu.

3.4.9 Thiofentanyly

Thiofentanyly, systematicky *N*-fenzyl-*N*-(1-[2-(thiofen-2-yl)ethyl]piperidin-4-yl)propanamid (Obr. 16), je farmakologicky klasifikován jako relativně selektivní agonista μ -opioidního receptoru s profilem podobným samotnému fentanylu. Nejsou k dispozici žádné studie důsledků u lidí, avšak analgetická účinnost u hlodavců se odhaduje na 60 – 100krát vyšší než u morfinu.

Nežádoucí účinky thiofentanylu jsou podobné jako u fentanylu, tedy nevolnost, svědění a respirační deprese [32].

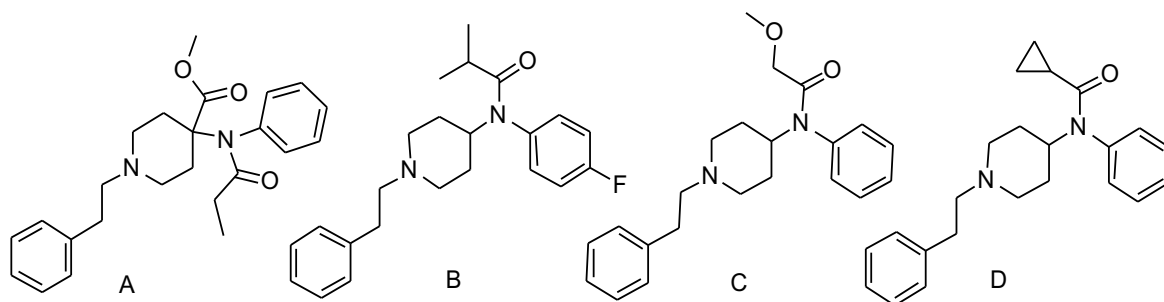


Obr. 16 Vzorec thiofentanylu.

3.4.10 Další analoga fentanylu

Mezi další deriváty (Obr. 17) patří cyklopropylfentanyl (D), také *N*-fenyl-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]cyklopropankarboxamid vzniklý náhradou propionamidové skupiny skupinou cyklopropankarboxamidovou [33]. V piperidinovém kruhu obsahuje bazický atom dusíku, který snadno tvoří soli s organickými i anorganickými kyselinami. Cyklopropylfentanyl podléhá rozsáhlému metabolismu a je u něj známo 11 metabolitů. Hlavními metabolity jsou 4-hydroxyfenethylcyklopropylfentanyl, 4-hydroxy-3-methoxyfenethylcyklopropylfentanyl, norcyklopropylfentanyl a fenethyldihydrodiol [34,35].

Methoxyacetyl fentanyl (2-methoxy-*N*-fenyl-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]acetamid) (C) je strukturně podobný ocfentanyl a rovněž obsahuje 2-methoxyacetamidovou skupinu namísto propionamidové [33]. Jako pevná látka se vyskytuje ve formě volné báze nebo jejího hydrochloridu či citrátové soli. Jedná se o stabilní látku nepodléhající polymeraci [36]. V neposlední řadě *p*-fluorisobutyrylfentanyl (B), systematicky *N*-(4-fluorfenyl)-*N*-(1-fenethylpiperidin-4-yl)isobutyramid, je opioidní analgetikum, analog butyrfentanylu a strukturní izomer 4-fluorbutyrfentanylu. Je vysoce selektivním agonistou μ -opioidního receptoru a jeho analgetická účinnost je téměř 10krát vyšší než u morfinu (Příloha 7) [37]. Carfentanil (A) je syntetický opioid užívaný ve veterinární medicíně k anestezii velkých zvířat, jako jsou sloni a medvědi. Nežádoucími účinky může být euforie, ospalost, zpomalená srdeční frekvence. Při předávkování se podává naloxon a naltrexon, i když je většinou nutné užití vícenásobné dávky než obvykle [38]. Pomocí lidských jaterních mikrosomů bylo nalezeno 12 metabolitů, z nichž *N*-demethylace byla potvrzena MS analýzou jako hlavní biotransformace (Příloha 8) [34,39].



Obř. 17 Strukturní vzorce dalších derivátů fentanylu: (A) carfentanil, (B) *p*-fluorisobutyrylfentanyl, (C) methoxyacetylfentanyl, (D) cyklopropylfentanyl.

3.5 Analýza fentanylu a jeho analog

V posledních letech bylo zavedeno mnoho analytických metod pro stanovení fentanylu a jeho analog. Můžeme zmínit plynovou a kapalinovou chromatografii, imunochemické metody využívané v první fázi analýzy a s velkým rostoucím potenciálem i elektroanalytické metody [34]. Dalšími metodami využívanými pro detekci i stanovení fentanylu mohou být infračervená a Ramanova spektroskopie či nukleární magnetická rezonance (NMR).

3.5.1 Imunochemické metody

Imunochemickou metodou užívanou v běžném provozu laboratoře je EMIT. Principem metody EMIT je soutěž analytu nebo metabolitu ve vzorku (moč, sérum) s analytem/metabolitem značeným enzymem o vazbu na protilátku. Vlivem vyšší koncentrace léčiva se zvýší koncentrace volného enzymu, který svou aktivitou způsobí změnu zbarvení. Koncovkou tohoto stanovení je Warburgův optický test [40].

Druhá metoda KIMS využívá principu aglutinace. IgG (protilátka) reaguje s analytem v kompetici se značeným analytem. Jako značka se používá latex. Dochází k aglutinaci (agregaci) mezi protilátkou a analytem značeným i neznačeným. Čím je vyšší obsah neznačeného analytu, tím menší množství aglutinátu vzniká. Množství vzniklého aglutinátu se stanovuje turbidimetricky [41].

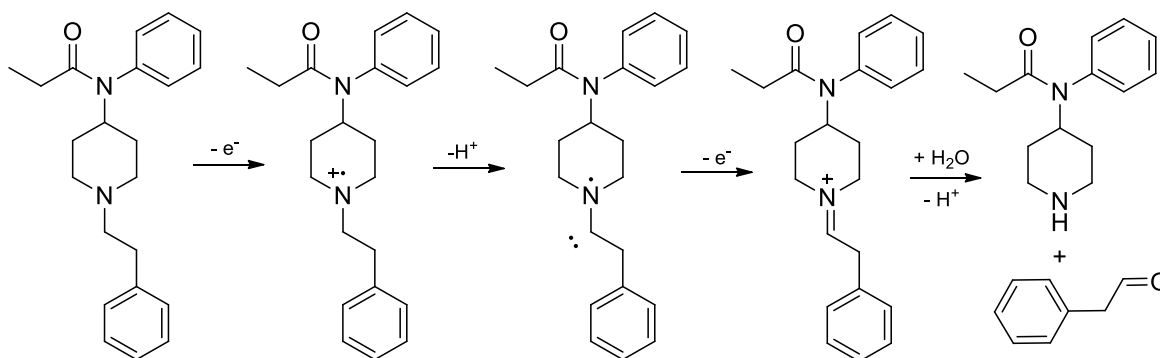
3.5.2 Chromatografické metody

Nejčastěji užívanou technikou je chromatografie, která ve spojení s hmotnostní spektrometrií slouží pro stanovení fentanylu v reálných vzorcích (vlasy, krev, sliny, moč nebo jaterní mikrosomy v případě metabolických studií). Její výhodou je především možnost stanovení složek komplikovaných vzorků pomocí vhodné separace, selektivní i citlivé detekce. LC je v separaci fentanylu užívanější než GC, jejíž nevýhodou je možná chemická degradace metabolitů při zahřívání a dále nutnost derivatizace fentanylu pro dosažení

selektivní a citlivé detekce [34]. Jako nejvhodnější stacionární fáze v LC je využívána reverzní (nepolární) stacionární fáze C18. Pro detekci a identifikaci separovaných fentanylů se používá hmotnostní spektrometrie nejčastěji s ionizací elektrosprejem (ESI), nebo chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) [42]. Mezi neužívanější LC metody patří HPLC-MS, LC-HRMS, LC-QTOF-MS, popř. LC-MS/MS [43,44].

3.5.3 Elektroanalytické metody

Mechanismus elektrochemické oxidace fentanylu je založen na faktu, že v jeho struktuře je alifatický terciární amin s nepárovými elektrony, který slouží jako donor elektronů. Nejprve dochází ke ztrátě elektronu na dusíku piperidinového kruhu za vzniku kationtového radikálu, který při ztrátě protonu a elektronu v následujících krocích vytvoří kvartérní Schiffovu bázi. Ta se rychle hydrolyzuje na sekundární amin (Obr. 18) [45].



Obr. 18 Schéma mechanismu oxidace fentanylu [45].

Elektroanalytické metody představují alternativní metody pro jinak zavedenou a nepoužívanější metodu LC-MS v analýze fentanylů. Umožňují zvýšení selektivity a citlivosti úpravou povrchu elektrod a lze je využít pro analýzu fentanylů samostatně nebo v průtokovém uspořádání ve spojení s LC nebo kapilární elektroforézou.

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) je metoda mnohých výhod, včetně rychlé, levné a jednoduché výroby elektrod. Proto byla také zvolena pro zkoumání oxidačního procesu fentanylu (Obr. 18) a poskytla dobrou selektivitu a opakovatelnost [45].

Cyklická voltametrie na nemodifikované elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) a na elektrodě modifikované mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT) může být použita pro zkoumání elektrochemického chování fentanylu v roztoku fosfátového pufru. Modifikovaná elektroda vykazuje významnou katalytickou aktivitu vůči oxidaci fentanylu a poskytuje vyšší proudové píky ve srovnání s voltametrií na nemodifikované GCE. Metoda byla použita pro stanovení fentanylu ve vzorcích lidské moči a krevního séra [46].

Diferenční normální pulzní voltametrie byla použita pro *in vivo* zkoumání metabolismu katecholaminů u potkanů. Je známo, že fentanyl nebo léčiva podobná morfinu mohou vyvolat změny v oxidaci katecholů, které můžeme sledovat elektrochemicky. Měření bylo provedeno pomocí elektrody z uhlíkových vláken a výsledkem bylo potvrzení, že fentanyl způsobuje významný pokles oxidačního proudu katecholů v *lokus coeruleus* (jádro můstku mozkového kmene ovlivňující fyziologické reakce na stres a paniku) potkanů. Je možné tedy tuto metodu využít pro *in vivo* monitorování metabolismu katecholaminů [47].

Potenciometrie s iontově selektivními membránovými elektrodami byla vyvinuta pro selektivní stanovení fentanylu v injekčních roztocích bez předchozího separačního kroku. Metoda využívá tvorby iontových párů fentanylu s tetrakis[3,5-bis-(trifluormethyl)fenyl]borátem v PVC matrici [48] nebo s fosfowolframanem v PVC s dibutylftalátem jako plastifikátorem [49] a umožňuje rozlišit pouze jeden cílový ion od ostatních. Jedná se o rychlou, jednoduchou metodu s dostatečnou přesností pro použití ve farmaceutické analýze [48,49].

HPLC kombinovaná s detektorem diodového pole (DAD) a s amperometrickou detekcí (AD) na sítotiskové grafitové elektrodě byla použita na výzkum elektrochemických reakcí ve vzorcích drog. Metodou cyklické voltametrie bylo potvrzeno, že oxidace fentanylu je nevratný proces. Amperometrickou detekci nebylo možné použít na reálné vzorky bez předchozí separace, jelikož se signály různých fentanylů překrývaly vzájemně, i s heroinem ve směsi. Bylo zjištěno, že HPLC-DAD je citlivější než systém HPLC-AD, avšak obě metody jsou dostatečně selektivní a odlišily běžně se vyskytující látky v pouličních drogách od fentanylu [50].

Nepřímá metoda použitelná pro charakterizaci účinků heroinu a fentanylu na lidský mozek založená na vysokorychlostní ampérometrii byla zaměřena na stanovení hladiny kyslíku v mozku po příjmu heroinu a fentanylu. Bylo zjištěno, že v obou případech léky způsobily pokles hladiny kyslíku v mozku [50].

3.5.4 Extrakční metody

Pro extrakci z biologických materiálů (krve, moči, séra a plasmy) jsou nejčastěji voleny extrakce tuhou fází (SPE) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) [51].

Častěji užívanou metodou je LLE s n-butylchloridem, diethyletherem nebo dichlormethanem jako rozpouštědlem. Při extrakci by mělo být pH v bazické oblasti, což zajistíme přidáním NaOH [52].

Pro SPE fentanylů z moči nebo krve lze použít kolonky Bond Elut Certify (Agilent) naplněné nepolárním sorbentem C8 a silným katexem [53] nebo SPE kolonky Oasis HLB (Waters) plněné univerzálním vodou smáčitelným kopolymerem pro reverzní fáze s vyváženými hydrofilními a lipofilními vlastnostmi [54].

3.6 Mikrosomální metabolizace

Biotransformace xenobiotik v organismu probíhá nejčastěji ve dvou fázích – nesyntetické (I. fáze) a syntetické (II. fáze). Nesyntetická fáze zahrnuje oxidační reakce (hydroxylace, *N*-oxidace a *N*-dealkylace, *O*-deaminace), méně pak redukční či hydrolytické. Během této fáze dochází ke změnám v molekule cizorodé látky, kdy je zavedena do její struktury hydroxylová skupina. Metabolizace xenobiotik je doprovázena insercí kyslíku do substrátu a nízkou substrátovou specifitou enzymů. Naproti tomu metabolismus endogenních látek je založen na transferu vodíku a vysoké substrátové specifitě enzymů. Přenos kyslíku je dále katalyzován monooxygenázovým systémem cytochromu P450 (Příloha 9) [55,56]. Dochází ke vzniku funkčních skupin, které umožňují zvýšení hydrofility v syntetické fázi biotransformace. Běžně dochází ke snížení farmakologické či toxikologické aktivity látek, ale může být i zvýšena (kodein → morfin) či nezměněna (diazepam → nordiazepam). Tato biotransformační fáze zahrnuje několik enzymatických systémů podílejících se na přeměně. Patří mezi ně oxidační systém (OS) rodiny cytochromu P450, mikrosomální OS, peroxidázy, reduktázy a hydrolázy, cytoplazmatické alkohol- a aldehyddehydrogenázy, atd. Cytochrom P450, jeden z nejdůležitějších enzymových systémů katalyzujících nesyntetickou fázi, se nachází na membránách mikrosomů.

V syntetické fázi již dochází ke vzniku neaktivních hydrofilních sloučenin, které mohou být vyloučeny močí. Tato fáze je založena na vazbě hydrofilní funkční skupiny k původní látce nebo k produktu přeměny této látky v I. fázi biotransformace. Může docházet např. ke glukuronidaci, konjugaci s glutathionem, glycinem, acetylaci či tvorbě éterických sulfátů [55,56].

3.7 Fentonova reakce

Pro rozklad složitých organických sloučenin nebo přečištění odpadních vod se využívá pokročilých oxidačních procesů založených na oxidaci látek na jednodušší sloučeniny. Tyto procesy využívají tvorby volných radikálů [57]. Volný radikál je z chemického hlediska molekula, atom či iont s nepárovými elektrony nacházející se ve valenční vrstvě a schopný

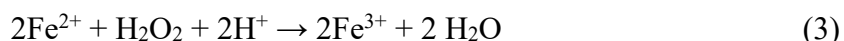
samostatné existence. Volné radikály kyslíku (ROS = reactive oxygen species) jsou meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Pokud nedojde k redukci kyslíku čtyřmi elektrony a čtyřmi protony na dvě molekuly vody, může dojít k jevu, kdy kyslík získá elektron a stává se superoxidem (kyslíkový radikál $O_2^{\bullet-}$). Ve velkém množství vzniká v dýchacím řetězci mitochondrií a také pomocí aktivovaných fagocytů, které pomocí enzymu NADPH oxidázy vytváří superoxid pro ochranu před mikroby a při zánětlivé reakci. Superoxid přechází na peroxid vodíku, který je sám o sobě stabilní, ale vysoce reaktivní s redukovánými redoxně aktivními přechodnými kovy (Fe^{2+} , Cu^+). Tato tzv. Fentonova reakce poskytuje vysoce reaktivní hydroxylový radikál OH^{\bullet} , který způsobuje oxidační poškození biomolekul. Toto poškození má řetězový charakter, protože pro svou stabilizaci radikál potřebuje elektron, který vytrhne z jiné molekuly a tím vytvoří jiný radikál [58].

3.7.1 Mechanismus

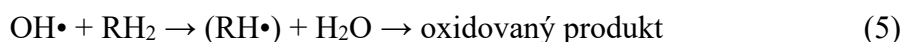
Fentonova reakce využívá směsi peroxidu vodíku a železnatých solí, která má silné oxidační vlastnosti. Existují však i varianty reakce, ve kterých jsou železnaté ionty nahrazeny měďnými nebo titanitými ionty [59].



Produkty reakce jsou železitý iont, hydroxylový radikál a hydroxidový iont. V nepřítomnosti přidaného substrátu bude hydroxylový radikál oxidovat další železnatý iont.

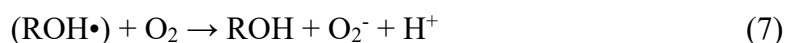
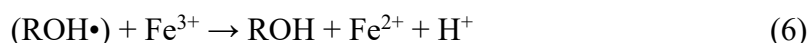


Oxidace organických substrátů Fentonova typu probíhá adicí OH^{\bullet} skupiny nebo abstrakcí atomů vodíku.

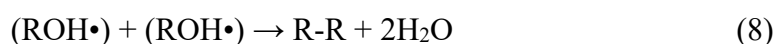


V obou rovnicích (4) a (5) vznikají organické volné radikály jako přechodné meziprodukty. Meziproduktové radikály jsou dále oxidovány Fe^{3+} , kyslíkem, peroxidem vodíku, OH^{\bullet} nebo jinými meziprodukty, popř. přidanými činidly za vzniku konečného, stabilního oxidovaného produktu.

Složitosti ve smyslu dalších vedlejších reakcí mohou vznikat jak při tvorbě OH^{\bullet} , tak při přeměně meziproduktů na produkt. Vytvořený meziprodukt může být oxidován na produkt buď železitým iontem nebo kyslíkem.



Pokud je oxidačním činidlem kyslík, pak se v závislosti na pH vytváří buď superoxidový anion (7) nebo jeho konjugovaná kyselina, hydroperoxylový radikál. Hydroperoxylový radikál je silné oxidační činidlo, které může vést ke vzniku dalších produktů nebo meziproductů v závislosti na povaze pufru a dalších složkách reakčního média. Hydrocyklohexadienylový radikál může také dimerizovat eliminací vody za vzniku bifenyly.



Pokud se přidají pouze stopová množství železnatých solí vzhledem k peroxidu vodíku, pak může superoxidový anion působit jako redukční činidlo pro regeneraci železnatých iontů a tím zahájit novou reakční sekvenci. Při oxidaci organického substrátu pomocí abstrakce vodíku může přechodný meziproduct reagovat s kyslíkem za vzniku hydroperoxylového radikálu a generovat stabilní organickou sloučeninu, nebo se může k meziproductu přidat kyslík za vzniku nového radikálového meziproductu [59].



4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a přístroje

Fentanyl, furanylfentanyl, sufentanil (Lipomed, Švýcarsko), thiofentanyl a carfentanil (Chiron, Norsko) byly dodány firmou Chromservis (Praha, Česká republika). Midazolam Torrex (5 mg/ml, injekční roztok obsahující midazolam hydrochlorid 5,56 mg/ml, NaCl, 1 mmol/l HCl a vodu na injekci) byl poskytnut Ústavem fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR v Praze. Mikrosomy byly zakoupeny do firmy ThermoScientific (human microsomes 50 donor pool, 0,5 ml, koncentrace 20 mg/ml), NADPH (97%) a mravenčí kyselina (>99%) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Stabilizovaný roztok peroxidu vodíku (30%, Sigma-Aldrich), hexahydrát síranu amonno-železnatého (Lachema, Česká republika), chlorid lithný (Fluka), kyselina fosforečná (Penta, Česká republika), octová kyselina, kyselina trihydrogenboritá (obě Lachema, Česká republika), chloroform (Lach-Ner, Česká republika), NaOH (Penta, Česká republika) a amoniak (Lach-Ner, Česká republika) byly čistoty p.a. Rozpouštědla acetonitril a methanol čistoty pro HPLC-MS byla od firmy Honeywell, USA. Vodné roztoky pro všechny experimenty byly připraveny z deionizované vody (18,2 M Ω cm, Millipore, Merck).

LC-MS analýzy vzorků po elektrochemické oxidaci a inkubaci s jaterními mikrosomy byly provedeny na přístroji UHPLC Elute (Bruker) ve spojení s UHR-QTOF Maxis Impact II (Bruker) za následujících podmínek: k analýzám byla využita metoda založená na přesné hmotě, zastoupení charakteristických fragmentů a retenčním čase analyzovaných látek. Kalibrace přesné hmoty byla provedena na mravenčan sodný o koncentraci 10 mmol/l. Kolona: reverzní fáze Intensity Solo HPLC Column, C18-2, 1,8 μ m, 100 \times 2,1 mm, velikost pórů 90 Å (Bruker), $t = 40$ °C. Gradientová eluce (složka A: voda/methanol 99 : 1 + 5 mmol/l mravenčan amonný + 0,01 % mravenčí kyseliny, složka B: methanol + 5 mmol/l mravenčan amonný + 0,01 % mravenčí kyseliny; 0 min 99 % A a 1 % B; 0,1–2,5 min nárůst na 50 % A a 50 % B; 2,6–14,0 min nárůst na 1 % A a 99 % B; 14,1–15,5 min 1 % A a 99 % B). Průtok mobilní fáze 0,2 ml/min, nástřik 1 μ l.

K LC-MS analýze produktů Fentonovy reakce byla použit přístroj UPLC Acquity spojený s hmotnostním spektrometrem Synapt G2-S (vše Waters). Chromatografická separace byla provedena na koloně Raptor ARC-18 LC, 100 \times 2,1 mm, velikost částic 2,7 μ m, stacionární fáze C18 (Restek). Gradientová eluce (A: voda + 0,1 % mravenčí kyseliny, B: acetonitril + 0,1 % mravenčí kyseliny; 0 min 70 % A a 30 % B; 2 min 70 % A a 30 % B; 10 min 0 % A

a 100 % B; 11,5 min 0 % A a 100 % B; 13 min 70 % A a 30 % B). Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 0,4 ml/min, objem nástřiku byl 5 μ l. ESI-MS podmínky byly nastaveny takto: ionizace elektrosprejem byla provedena v kladném módu, napětí na kapiláře bylo nastaveno na 2,0 kV, teplota ve zdroji na 120 °C, teplota desolvatace na 200 °C, průtok plynu v konusu na 50 l/h, průtok desolvatačního plynu na 400 l/h a průtok plynu ve zmlžovači byl 6 bar. Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozsahu m/z od 50 do 1200 Da s nastavením TOF v Res-modu a dobou skenu 0,5 s. Kolizní MS/MS experimenty byly provedeny s kolizní energií 20 eV.

Elektrochemické experimenty byly realizovány s potenciostatem Autolab PGSTAT128N řízeným softwarem NOVA 1.12 (Metrohm Autolab, Nizozemsko) v tříelektrodovém zapojení elektrochemického článku.

Acidita roztoků byla upravována pomocí pH-metru InoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (WTW, Německo). Extrakce byly prováděny s využitím třepačky Wibramax 100 (Heidolph, Německo) a centrifugy Eppendorf 5702 (Eppendorf, Německo). Inkubace vzorků v metabolické studii byla prováděna v termostátované vodní lázni Haake B3 (Haake, Karlsruhe, Německo). K vážení miligramových množství látek byly využity pětimístné analytické váhy XSE205 (Mettler-Toledo, USA), větší množství reagentů se navažovala na čtyřmístných analytických vahách Kern ALS 220-4 (Kern, Německo).

4.2 Elektrochemická oxidace fentanylu a jeho analog na Pt síťkové elektrodě

Pro tento experiment byl využit fentanyl a čtyři jeho analogy – furanylfentanyl, sufentanil, carfentanil, thiofentanyl. Elektrochemický článek byl složen z pracovní Pt síťkové elektrody, referenční nasycené kalomelové elektrody (SCE), pomocné Pt elektrody v prostoru odděleném fritou a naplněném 0,2M-CH₃COONH₄.

Slepý vzorek byl připraven smísením 1 ml 0,2M-CH₃COONH₄ ve vodě, 2,6 ml redestilované vody a 0,4 ml MeOH. Oxidace byla provedena při konstantním potenciálu 1,1 V a bylo odebráno 200 μ l vzorku po 30 minutách do mikrozkušavky. Před samotnou LC-MS analýzou byl vzorek 100x naředěn methanolem.

Roztok pro oxidaci fentanylu byl připraven ze směsi 1 ml 0,2M-CH₃COONH₄ ve vodě, 2,6 ml redestilované vody a 0,4 ml roztoku 1 mmol/l fentanylu v methanolu (výsledná koncentrace fentanylu $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l). V časech od započetí reakce 0, 5, 10, 15, 30 a 60

minut bylo odebráno vždy 200 μ l vzorku pro LC-MS analýzu. Stejným postupem jako fentanyl byly zpracovány furanylfentanyl, sufentanil, carfentanil a thiofentanyl.

4.3 Mikrosomální metabolizace fentanylu, jeho analog a midazolamu

Pro tento experiment byly použity roztoky 0,1 mol/l fosfátového pufru (PB) v redestilované vodě (pH = 7,4), 0,02 mol/l NADPH v 0,1 mol/l fosfátovém pufru (pH 7,4), 0,4 mmol/l midazolamu (MIDA), 0,4 mmol/l fentanylu (F) a lidské jaterní mikrosomy (konc. proteinu 20 mg/ml).

Midazolam byl zvolen modelovou sloučeninou, která se metabolizuje na 1-hydroxymidazolam a jehož přítomností v reakční směsi byla poté indikována správná metabolická přeměna v dané sadě vzorků.

Vzorky před měřením pomocí LC-MS byly 10x naředěny methanolem.

Pro rozlišení produktů metabolických reakcí od případných produktů jiných, vedlejších reakcí byly připraveny tři rozdílné slepé vzorky: BLC 1 s inkubací 0 min, BLC 2 bez analytu a BLC 3 bez NADPH.

4.3.1 Slepý vzorek inkubovaný 0 minut

V plastové mikrozkušavce bylo smícháno 180 μ l PB + 5 μ l 0,4 mmol/l MIDA nebo F (výsledná $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) + 5 μ l 20 mg/ml mikrosomů (konc. 0,5 mg/ml) + 10 μ l 20 mmol/l NADPH + 100 μ l ledového MeOH. Směs byla protřepána, zcentrifugována a 200 μ l supernatantu bylo přeneseno do mikrozkušavky a zamraženo na -20 °C do LC-MS analýzy.

4.3.2 Slepý vzorek neobsahující analyt

Byl připraven smísením 180 μ l PB + 5 μ l deionizované H₂O + 5 μ l 20 mg/ml mikrosomů (konc. 0,5 mg/ml). Směs byla inkubována 5 min při 37 °C. Následně bylo přidáno 10 μ l 20 mmol/l NADPH a inkubováno 30 min. Poté byl roztok prudce zchlazen a bylo přidáno 100 μ l ledového MeOH. Směs byla zcentrifugována, 200 μ l supernatantu bylo přeneseno do mikrozkušavky a zamraženo na -20 °C.

4.3.3 Slepý vzorek neobsahující NADPH

Poslední slepý vzorek byl nachystán smícháním roztoků 180 μ l PB + 5 μ l 0,4 mmol/l MIDA nebo F (výsledná koncentrace $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) + 5 μ l 20 mg/ml mikrosomů (konc. 0,5 mg/ml). Směs byla inkubována 5 min při 37 °C. Poté bylo přidáno 10 μ l PB a inkubováno 5 min (MIDA) resp. 15 a 90 min (F). Směs byla následně prudce zchlazena a po přidávku 100

μl ACN a protřepání byla zcentrifugována. Objem 200 μl supernatantu byl přenesen do mikrozkušavky a zamrazen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.4 Vzorek fentanylu, jeho analog a midazolamu

Vzorky pro metabolizaci fentanylu, jeho analog (furanylfentanylu, sufentanilu, carfentanilu a thiofentanylu) a midazolamu se připravily smícháním 180 μl PB + 5 μl 0,4 mmol/l roztoku příslušného léčiva (výsledná koncentrace $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) + 5 μl 20 mg/ml mikrosomů (konc. 0,5 mg/ml). Vzorky se inkubovaly 5 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 10 μl 20 mmol/l NADPH a vzorky se nechaly inkubovat 5 min (MIDA) resp. 15, 30, 60 a 90 min (fentanyly). Po této době byl každý roztok prudce zchlazen, přidalo se 100 μl ledového MeOH. Po protřepání a centrifugaci bylo 200 μl supernatantu přeneseno do mikrozkušavky a zamrazeno na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do LC-MS analýzy.

4.4 Reakce fentanylu s Fentanovým činidlem

Do skleněné vialky se šroubovacím víčkem bylo připraveno 10 ml roztoku obsahujícího 1 mmol/l LiCl, 0,2 mmol/l Mohrovy soli a 0,1 mmol/l fentanylu. Z tohoto roztoku byl odebrán do plastové mikrozkušavky předem vyčištěné chloroformem 1 ml směsi. Tento vzorek představoval stav Fentonovy reakce v čase 0 min. Poté bylo ke zbývajícím 9 ml roztoku fentanylu přidáno 0,044 mol/l H_2O_2 , reakční směs se promíchala a v časech 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 a 300 minut se z ní odebralo po 1 ml vzorku do chloroformem vypláchnutých plastových mikrozkušavek. K odebraným vzorkům bylo ihned přidáno 7 μl 0,2M NaOH (pro vysrážení Fe^{3+} iontů a alkalizaci směsi na pH 11), 1 ml chloroformu a vzorek byl třepán 10 min na třepačce při 1350 rpm. Poté byl vzorek odstředěn, objem 0,75 ml chloroformové (spodní) fáze byl odebrán do skleněné vialky a rozpouštědlo bylo odpařeno proudem dusíku. Před LC-MS analýzou byl odparek rozpuštěn v 0,75 ml MeOH a následně analyzován.

Stejným postupem byly připraveny a zpracovány slepé vzorky reakční směsi (1 mmol/l LiCl, 0,2 mmol/l Mohrovy soli a 0,044 mol/l H_2O_2) bez fentanylu. Z tohoto roztoku byl odebírán objem 1 ml do plastových mikrozkušavek v čase 0 (ihned po přidavku H_2O_2) a pak po 5, 60 a 300 minutách.

5 Výsledky a diskuze

V souladu s cíli diplomové práce byly experimenty rozděleny do třech oblastí:

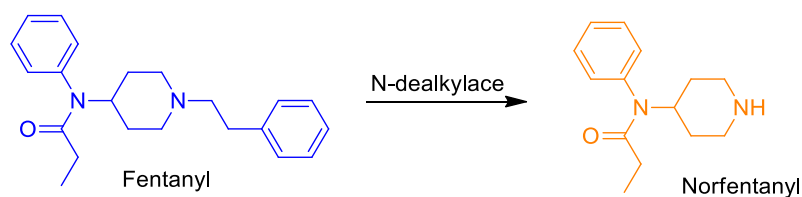
- Studium oxidace fentanylu a jeho analog na Pt síťkové elektrodě a LC-MS analýza produktů elektrochemických reakcí v závislosti na době elektrolýzy;
- Studium mikrosomální metabolizace fentanylu a jeho analog, LC-MS analýza metabolitů v závislosti na době inkubace s mikrosomy;
- Sledování časového průběhu reakce fentanylu s Fentonovým činidlem a LC-MS analýza produktů.

5.1 Elektrochemická oxidace fentanylu a jeho derivátů

Pro elektrochemickou oxidaci fentanylu a jeho analog byl jako základní elektrolyt zvolen vodný roztok octanu amonného (0,05 mol/l), vhodný pro následnou LC-MS analýzu. Zásobní roztoky fentanylu a jeho analog byly připraveny v methanolu a byly přidávány k základnímu elektrolytu tak, že jejich výsledná koncentrace v roztoku byla 0,1 mmol/l a obsah MeOH činil 10 % (v/v). Pro určení potenciálu pro tyto experimenty byla nejprve provedena cyklická voltametrie. Z voltamogramů uvedených v příloze 10 můžeme říct, že všechny zkoumané fentanyly se vyznačují podobným voltametrickým chováním za poskytnutí píku v anodické oblasti. Maximum píku se nachází v rozmezí 0,9 – 0,95 V, proto byl zvolen pracovní potenciál 1,1 V, který odpovídá limitnímu proudu oxidace fentanylů. LC-MS analýza roztoků elektrolyzovaných po dobu 0, 5, 10, 15, 30 a 60 min poskytla jak kvantitativní informace o množství zreagovaných výchozích látek, tak kvalitativní údaje o vzniklých produktech. Plochy píků fentanylu a jeho analog, úměrné množství reaktantu, byly získány integrací z chromatogramů extrahovaných pro $[M+H]^+$ jednotlivých fentanylů. Příslušné hodnoty m/z protonovaných molekul jsou uvedeny v tabulce (Příloha 11) s LC-MS charakteristikou studovaných látek.

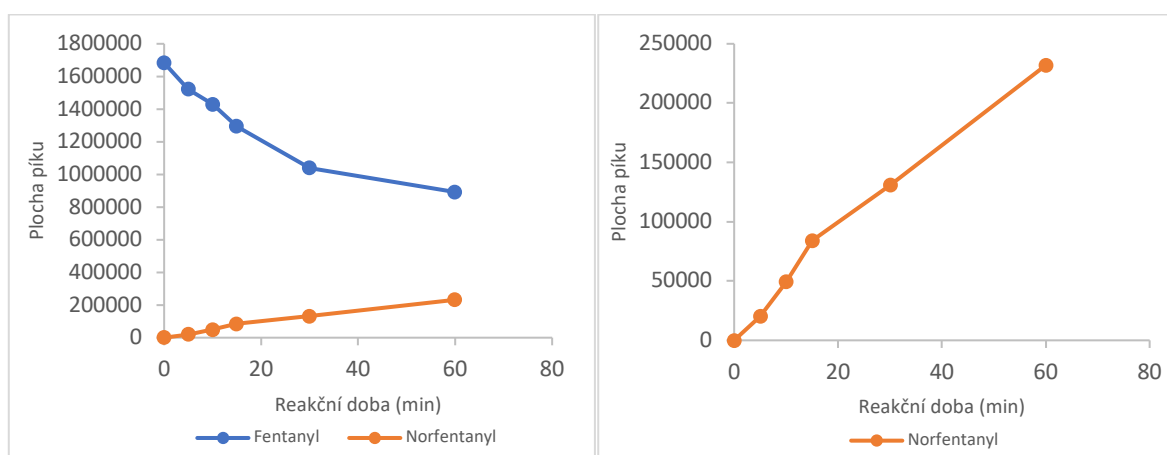
5.1.1 Elektrochemická oxidace fentanylu

LC-MS analýzou roztoků fentanylu po elektrochemické oxidaci bylo zjištěno, že hlavní produkt vznikající během jeho elektrochemické oxidace je norfentanyl. Norfentanyl vzniká *N*-dealkylací piperidinového dusíku za odštěpení alifatického řetězce (Obr. 20).



Obr. 20 Reakční schéma fentanylu při jeho elektrochemické oxidaci.

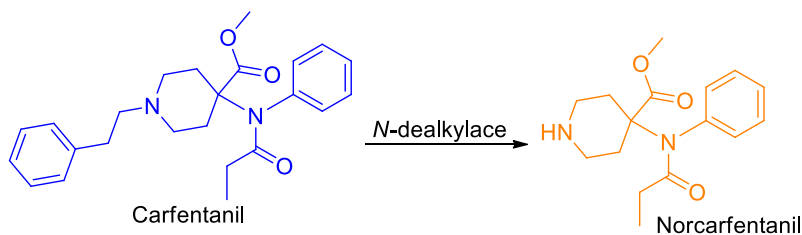
Ze závislosti plochy píků fentanylu a norfentanylu získaných integrací z chromatogramů extrahovaných pro $[M+H]^+ = 337,2342 \text{ m/z}$ (fentanyl) a $[M+H]^+ = 233,1664 \text{ m/z}$ (norfentanyl) na době elektrolýzy (Obr. 21) vyplývá, že dochází k poklesu množství fentanylu v závislosti na době elektrolýzy. Od páté minuty oxidace dochází k nárůstu množství norfentanylu, který je hlavním produktem oxidace fentanylu. Norfentanyl byl v reakční směsi identifikován na základě přesné hmoty a retenčního času (Příloha 11). Fentanyl byl elektrochemicky oxidován po dobu 60 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 53 %.



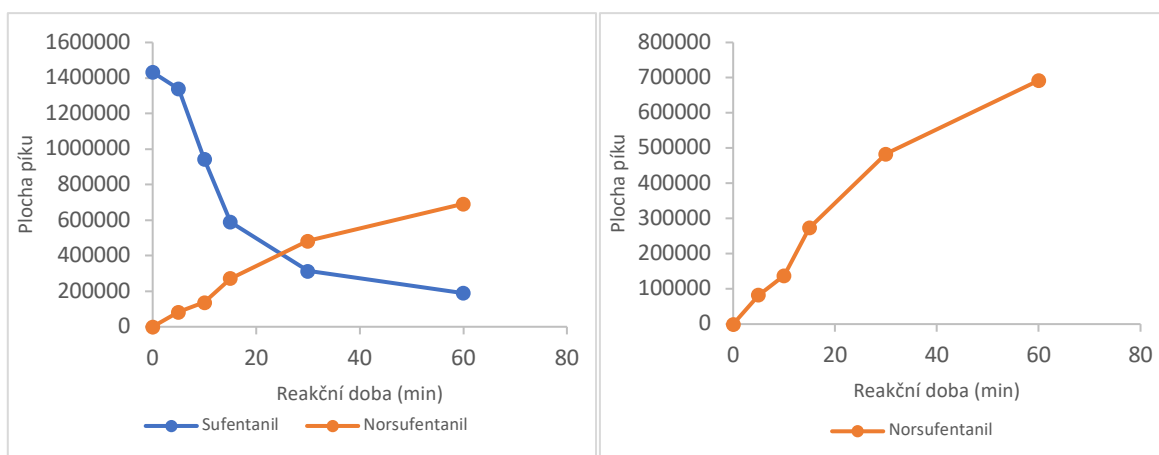
Obr. 21 Závislost plochy píků fentanylu a jeho produktu norfentanylu na čase během elektrochemické oxidace.

5.1.2 Elektrochemická oxidace carfentanilu

Carfentanil se elektrochemickou oxidací dealkyluje na norcarfentanil (Obr. 22). Průběh je velmi podobný jako v případě elektrochemické oxidace fentanylu.



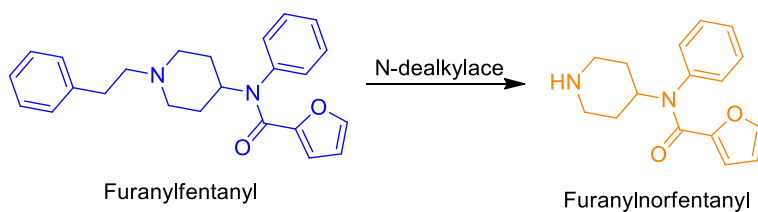
Obr. 22 Reakční schéma carfentanilu při jeho elektrochemické oxidaci.



Obr. 25 Závislost plochy píku sufentanilu a jeho produktu (norsufentanilu) na čase během elektrochemické oxidace.

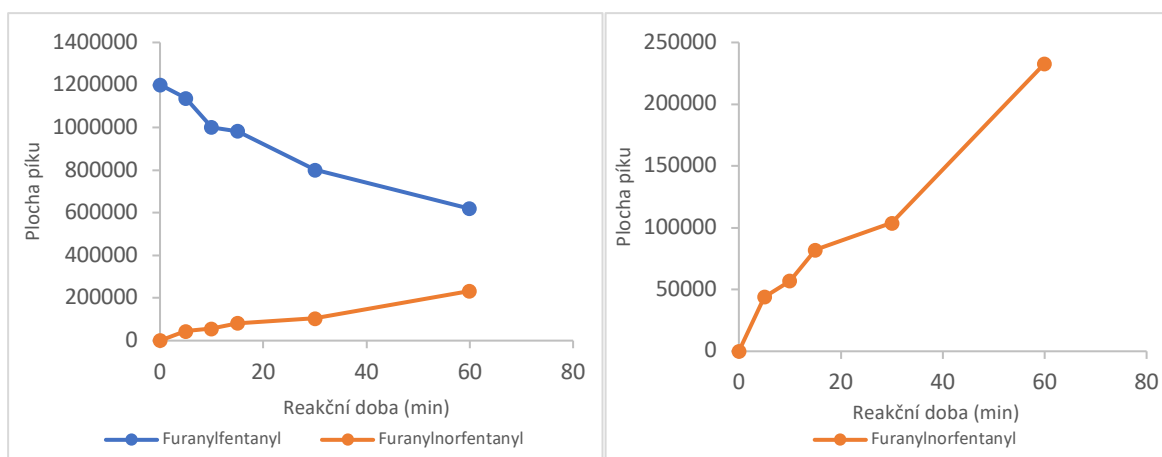
5.1.4 Elektrochemická oxidace furanylfentanylu

Jako u ostatních derivátů fentanylu tak i u furanylfentanylu je preferovanou elektrooxidační přeměnou právě tvorba norfentanylového analoga. Při dealkylaci piperidinového dusíku se vytváří furanylnorfentanil (Obr. 26).



Obr. 26 Reakční schéma hlavní přeměny furanylfentanylu při jeho elektrochemické oxidaci.

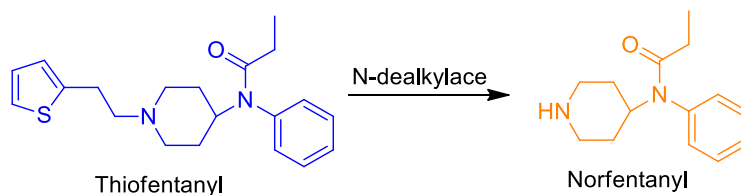
Z Obr. 27 vyplývá, že dochází k poklesu množství furanylfentanylu v závislosti na době trvání elektrolýzy. Od počátku oxidační přeměny dochází k nárůstu množství furanylnorfentanylu, který je hlavním oxidačním produktem furanylfentanylu. Furanylnorfentanil byl v reakční směsi identifikován na základě přesné hmoty a retenčního času (Příloha 11). Furanylfentanil byl elektrochemicky oxidován po dobu 60 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 52 %.



Obr. 27 Závislost plochy píku furanylfentanylu a jeho produktu (norfanylfentanylu) na čase během elektrochemické oxidace.

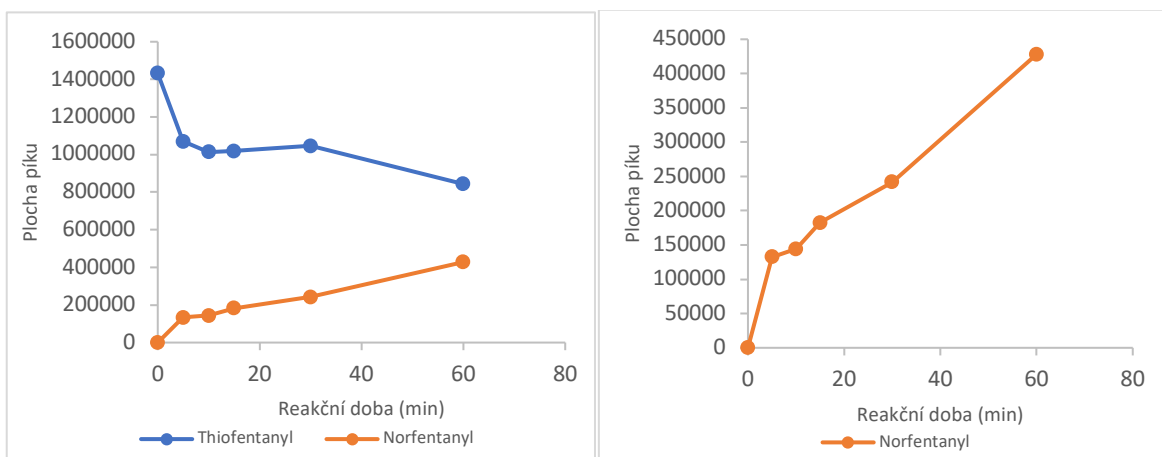
5.1.5 Elektrochemická oxidace thiofentanylu

Thiofentanyl se dealkyluje na norfentanyl podle obrázku 28. Dochází k oxidaci v místě vazby alkylového řetězce na piperidinový dusík.



Obr. 28 Reakční schéma hlavní přeměny thiofentanylu při jeho elektrochemické oxidaci.

I v případě elektrochemické přeměny thiofentanylu (Obr. 29) dochází k poklesu jeho množství v závislosti na době elektrolýzy. Od počátku oxidace dochází k nárůstu množství norfentanylu, který je hlavním produktem oxidace thiofentanylu. Norfentanyl byl v reakční směsi identifikován na základě retenčního času a přesné hmoty (Příloha 11). Thiofentanyl byl elektrolyzován 60 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 59 %.



Obr. 29 Závislost plochy píku thiofentanylu a jeho produktu (norfentanylu) na čase během elektrochemické oxidace.

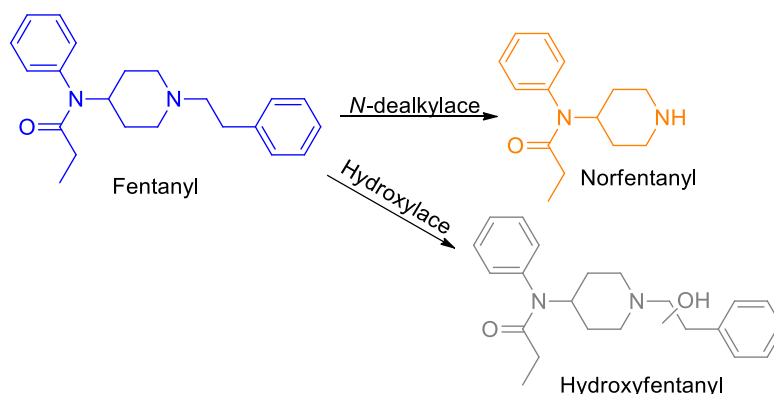
5.2 Mikrosomální metabolizace fentanylu, jeho analog a midazolamu

Mikrosomální metabolizace byla také založena na oxidativní přeměně fentanylu a jeho analog, konkrétně carfentanilu, sufentanilu, furanylfentanylu a thiofentanylu. Midazolam byl zvolen modelovou sloučeninou, která se metabolizuje na 1-hydroxymidazolam a jehož přítomností v reakční směsi byla poté indikována správná metabolická přeměna v dané sadě vzorků.

Plochy píků fentanylu a jeho analog byly získány integrací z chromatogramů extrahovaných pro $[M+H]^+$ jednotlivých fentanylů. Příslušné hodnoty m/z protonovaných molekul jsou uvedeny v tabulce (Příloha 11) s LC-MS charakteristikou studovaných látek.

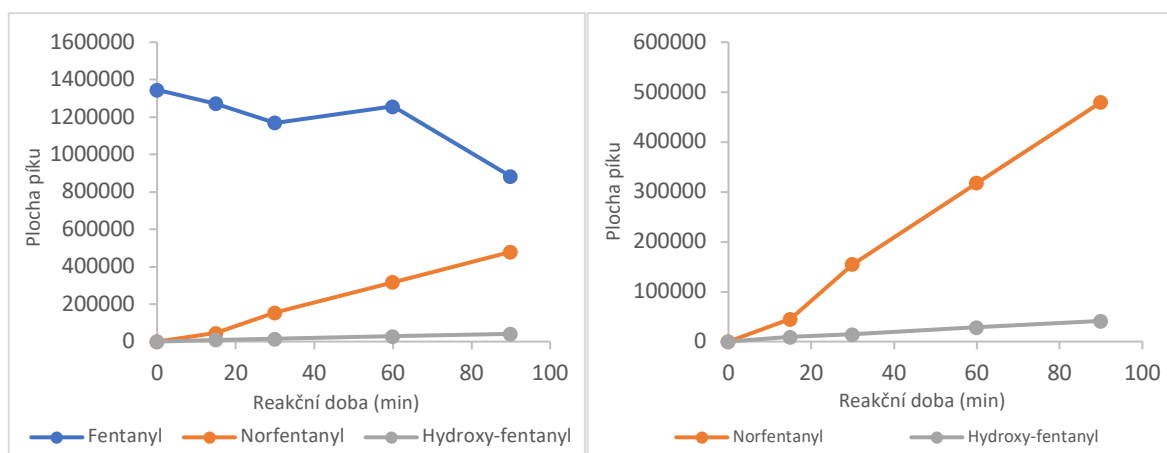
5.2.1 Mikrosomální metabolizace fentanylu

U mikrosomální metabolizace vzniká mimo hlavní metabolit norfentanyl i hydroxylovaný analog, u kterého není možné pomocí MS analýzy přesně určit umístění OH skupiny. Fentanyl podléhá dvěma hlavním metabolickým cestám, a to *N*-dealkylaci a hydroxylaci (Obr. 30).



Obr. 30 Hlavní metabolická přeměna fentanylu *N*-dealkylací a hydroxylací na příslušné metabolity.

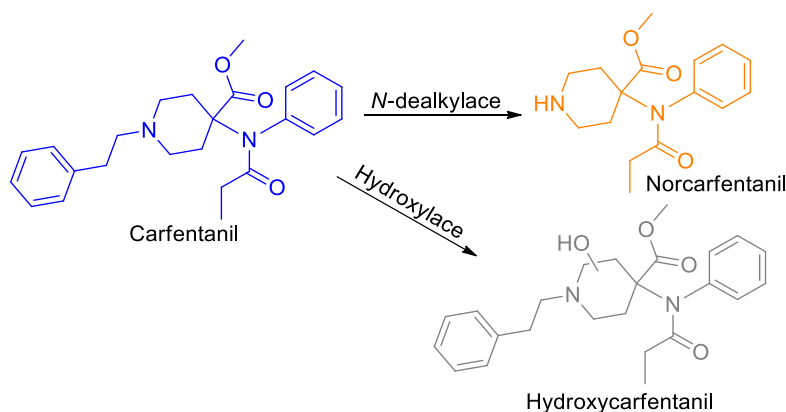
Z Obr. 31 vyplývá, že dochází k poklesu množství fentanylu v závislosti na době trvání metabolické přeměny. Od 15. minuty inkubace dochází k nárůstu množství norfentanylu, který je hlavním metabolitem fentanylu a stejně tak dochází k nárůstu druhého metabolitu, hydroxyfentanylu. Norfentanyl a hydroxyfentanyl jsou metabolity, které byly identifikovány i v případě *in vivo* metabolizace [43,60]. Oba metabolity byly v reakční směsi identifikovány na základě přesné hmoty a retenčního času (Příloha 11). Fentanyl byl mikrosomy metabolizován po dobu 90 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 66 %.



Obr. 31 Závislost plochy píku na čase pro fentanyl, norfentanyl a hydroxyfentanyl během mikrosomální metabolizace.

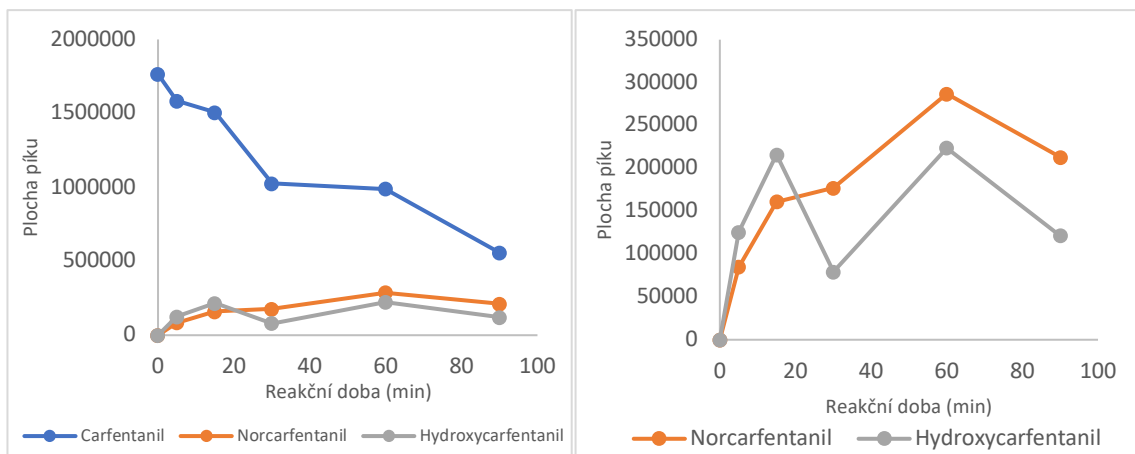
5.2.2 Mikrosomální metabolizace carfentanilu

Carfentanil podobně jako fentanyl také podléhá dvěma hlavním metabolickým přeměnám při mikrosomální metabolizaci. Vzniká norcarfentanil a hydroxycarfentanil, u kterého není možné pomocí MS analýzy přesně určit umístění OH skupiny (Obr. 32).



Obr. 32 Hlavní metabolická přeměna carfentanilu N-dealkylací a hydroxylací na příslušné metabolity.

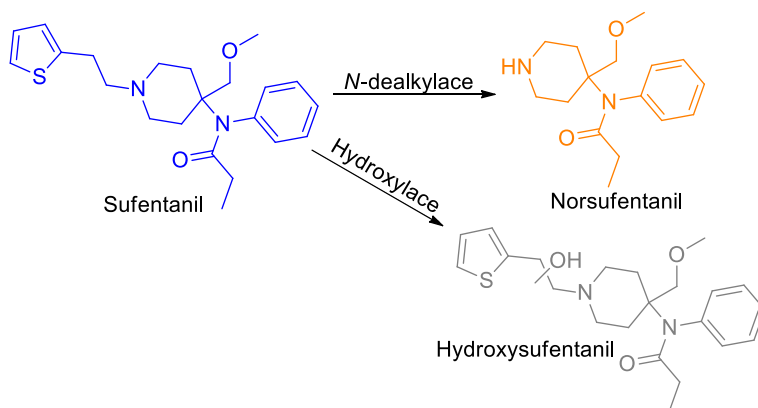
Z obrázku 33 vyplývá, že k poklesu množství carfentanilu dochází v závislosti na době trvání metabolické přeměny, což je v našem případě 90 minut. Od počátku přeměny dochází k nárůstu množství obou metabolitů, norcarfentanilu a hydroxycarfentanilu [39], které byly v reakční směsi identifikovány na základě přesné hmoty a retenčního času (Příloha 11). V 90. minutě byl sledován mírný pokles plochy píků obou produktů, který by mohl být přisouzen následným přeměnám obou metabolitů. Po uplynutí 90 minut došlo k poklesu množství carfentanilu na přibližně 32 % výchozí hodnoty.



Obr. 33 Závislost plochy píku na čase pro carfentanil, norcarfentanil a hydroxycarfentanil během mikrosomální metabolizace.

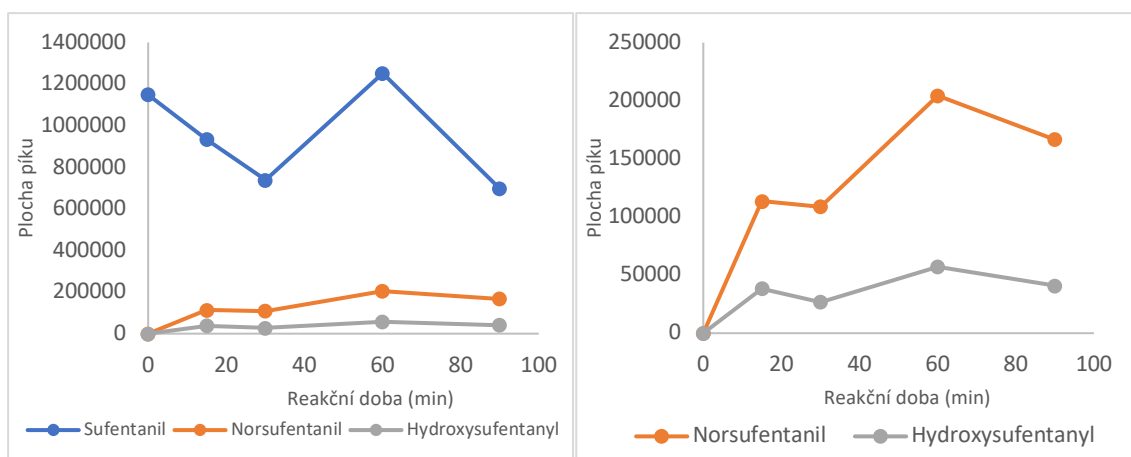
5.2.3 Mikrosomální metabolizace sufentanilu

Sufentanil se mikrosomálně metabolizuje na norsufentanil a hydroxysufentanil (Obr. 34).



Obr. 34 Hlavní metabolická přeměna sufentanilu *N*-dealkylací a hydroxylací na příslušné metabolity.

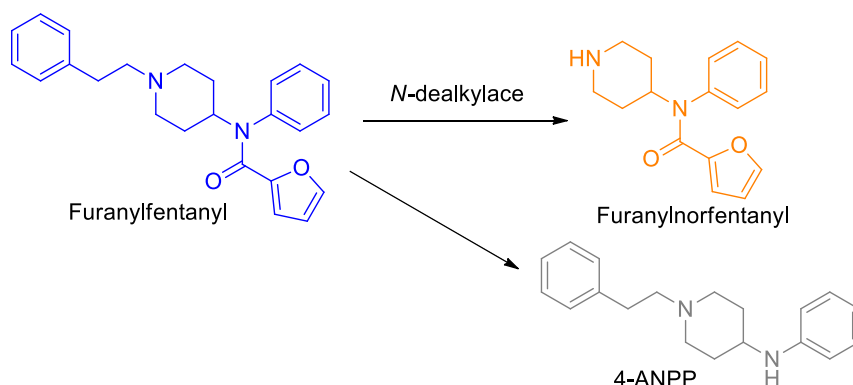
V případě sufentanilu (Obr. 35) dochází k poklesu jeho množství v závislosti na době trvání metabolické přeměny. Již v 15. minutě byly detekovány norsufentanil a hydroxysufentanil, což jsou hlavní metabolity sufentanilu [31]. Jejich množství s dobou inkubace narůstalo do 60 minut. Podobně jako u carfentanilu byl v 90. minutě pozorován mírný pokles plochy píků obou produktů, který by mohl být přisouzen následným přeměnám obou metabolitů, ale nelze ani vyloučit vliv experimentální chyby. Norsufentanil i hydroxysufentanil byl v reakční směsi identifikován na základě přesné hmoty a retenčního času (Příloha 11). Sufentanil byl mikrosomy metabolizován po dobu 90 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 61 %.



Obr. 35 Závislost plochy píku na čase pro sufentanil, norsufentanil a hydroxysufentanil během mikrosomální metabolizace.

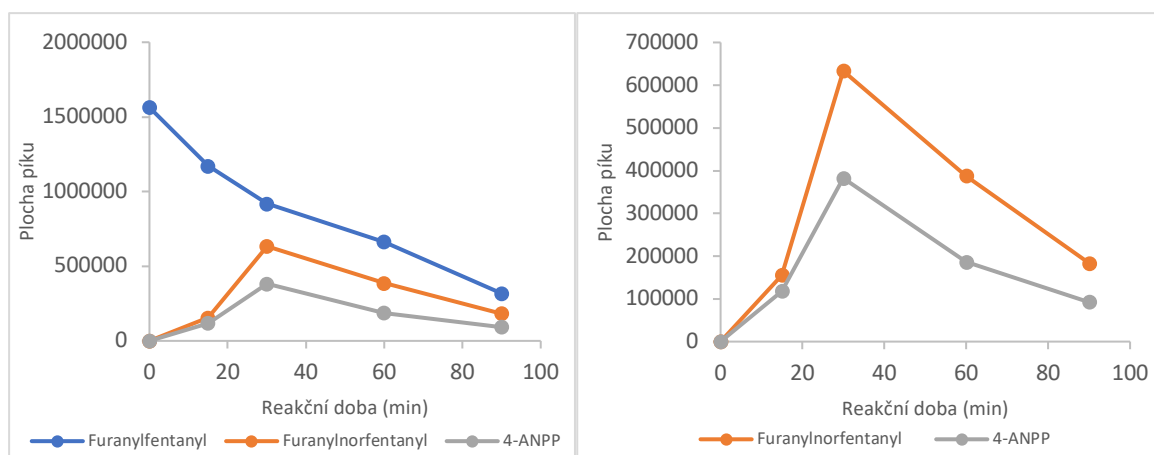
5.2.4 Mikrosomální metabolizace furanylfentanylu

Furanylfentanyl se metabolizuje *N*-dealkylací na furanylnorfentanyl a jako druhý produkt vzniká 4-anilin-*N*-fenethylpiperidin (4-ANPP), jak je znázorněno na obrázku 36. Tímto metabolickým produktem se furanylfentanyl odlišuje od jiných analog fentanylu.



Obr. 36 Hlavní metabolická přeměna furanylfentanylu *N*-dealkylací na furanylnorfentanyl a na 4-ANPP.

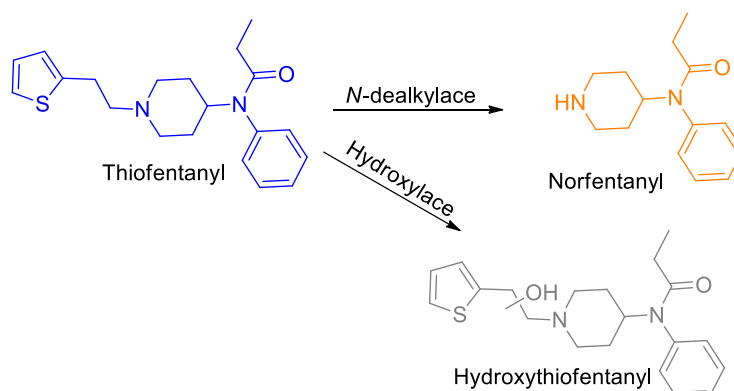
Z Obr. 37 vyplývá, že dochází k poklesu množství furanylfentanylu v závislosti na době trvání metabolické přeměny. Od počátku metabolické reakce dochází k nárůstu množství furanylnorfentanylu a 4-ANPP, které jsou hlavními metabolity furanylfentanylu [43], až do 30. minuty. Pokles jejich množství registrovaný po 60 a 90 minutách inkubace s mikrosomy je pravděpodobně způsoben následnými metabolickými přeměnami obou hlavních metabolitů. Furanylnorfentanyl i 4-ANPP byly v reakční směsi identifikovány na základě přesné hmoty a retenčního času (Příloha 11). Furanylfentanyl byl mikrosomy metabolizován po dobu 90 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 20 %.



Obr. 37 Závislost plochy píku na čase pro furanyl fentanyl, furanyl norfentanyl a 4-ANPP během mikrosomální metabolizace.

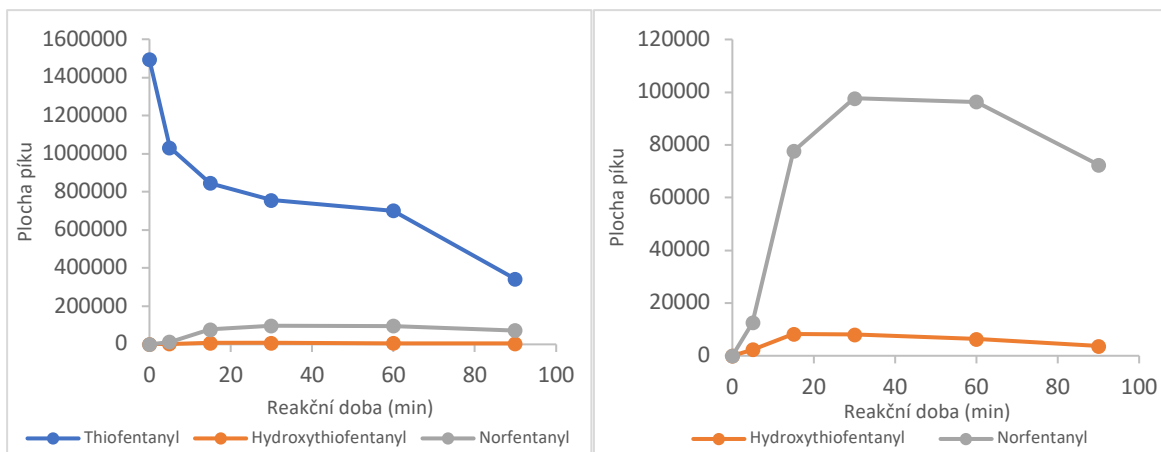
5.2.5 Mikrosomální metabolizace thiofentanylu

V obrázku 38 je znázorněná hlavní metabolická cesta thiofentanylu. Ten podléhá *N*-dealkylaci na norfentanyl, podobně jako u elektrochemické oxidace, a hydroxylaci na hydroxythiofentanyl.



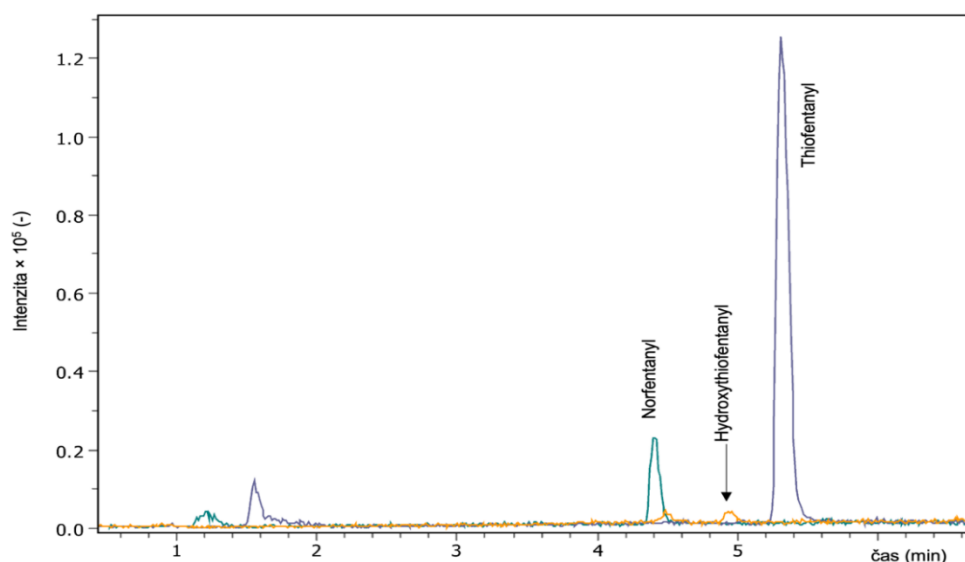
Obr. 38 Hlavní metabolická přeměna thiofentanylu *N*-dealkylací na norfentanyl a hydroxythiofentanyl.

V případě metabolické přeměny thiofentanylu (Obr. 39) dochází k poklesu množství thiofentanylu v závislosti na době trvání metabolické přeměny. Od počátku metabolizace dochází k nárůstu množství norfentanylu, který je hlavním metabolitem thiofentanylu i fentanylu. Hydroxythiofentanyl byl LC-MS analýzou detekován, ale jen v minoritním množství. Pokles množství norfentanylu i hydroxythiofentanylu registrovaný po 60 a 90 minutách inkubace s mikrosomy je pravděpodobně způsoben následnými metabolickými přeměnami obou hlavních metabolitů. Norfentanyl i hydroxythiofentanyl byl v reakční směsi identifikován na základě retenčního času a přesné hmoty (Příloha 11). Thiofentanyl byl metabolizován pomocí mikrosomů 90 minut, přičemž došlo k poklesu jeho množství přibližně na 23 %.



Obr. 39 Závislost plochy píku na čase pro thiofentanyl, hydroxythiofentanyl a norfentanyl během mikrosomální metabolizace.

Na obrázku 40 je příklad separace jednotlivých metabolitů thiofentanylu po mikrosomální metabolizaci. Separace ostatních fentanyků probíhá velmi podobným způsobem.

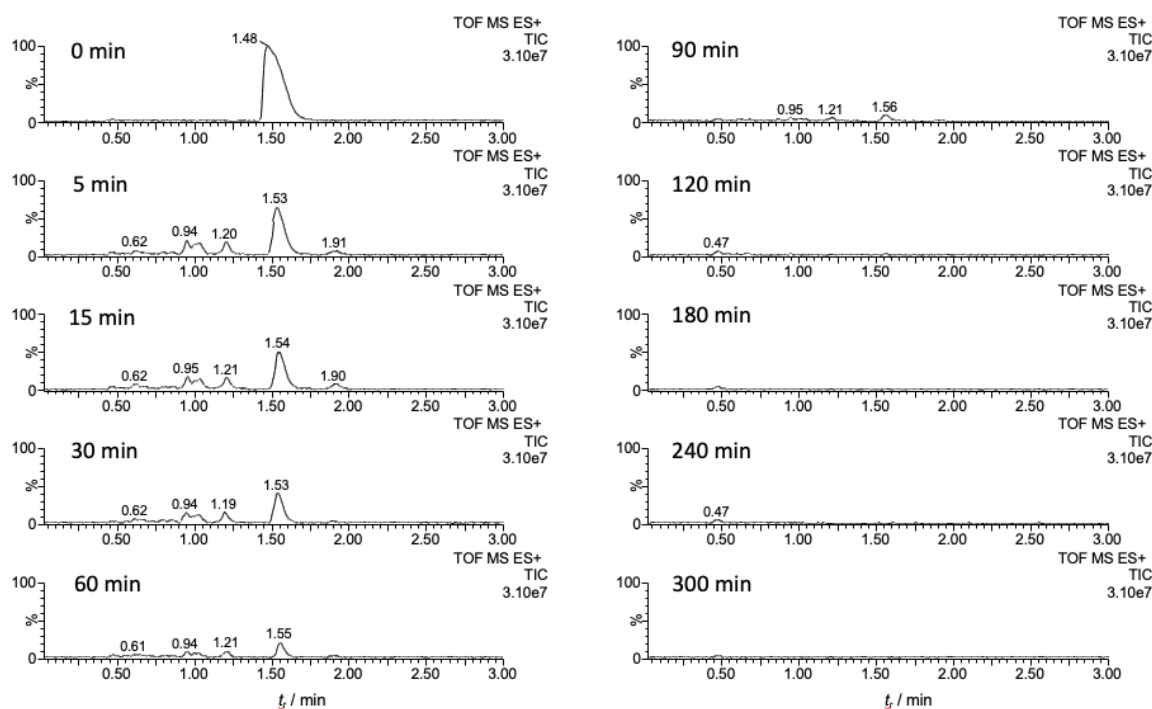


Obr. 40 Rekonstruované extrahované chromatogramy pro separaci thiofentanylu a jeho metabolitů po mikrosomální metabolizaci 90 min. (m/z [norfentanyl+H]⁺ 233,1664; m/z [hydroxythiofentanyl+H]⁺ 359,1790; m/z [thiofentanyl+H]⁺ 343,1855).

5.3 LC-MS analýza produktů Fentonovy reakce s fentanylem

Obrázek 41 znázorňuje celkové iontové chromatogramy vzorků reakční směsi fentanylu s Fentonovým činidlem (Fe^{2+} a H_2O_2) odebrané po 0, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 a 300 minutách reakční doby a extrahované do chloroformu. Plocha píku v retenčním čase 1,5 min, který odpovídá fentanylu, s reakční dobou exponenciálně klesá (Obr. 42). Kromě samotného fentanylu bylo v reakční směsi identifikováno velké množství hydroxylovaných derivátů v různých izomerních formách, které se na chromatogramech projeví převážně při kratších

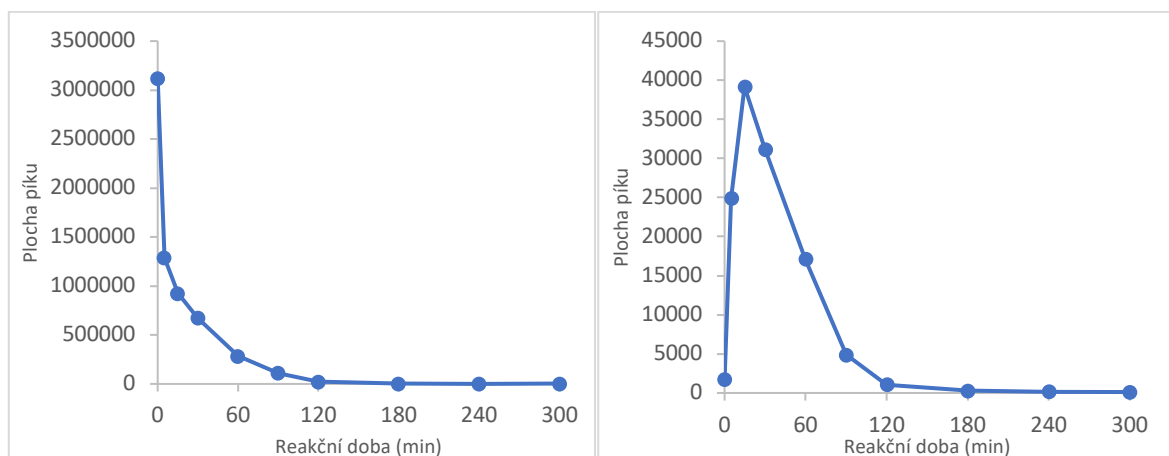
retenčních časech. MS/MS analýza ukázala, že hydroxylace probíhá především na fenethylové části molekuly fentanylu a na piperidinovém kruhu, může však docházet v menší míře i k hydroxylaci koncového methylu esterově vázané propionové skupiny. Relativně intaktní částí molekuly se jeví anilinový kruh. Mimo mono-, di- a trihydroxylované deriváty byla prokázána tvorba norfentanylu porovnáním se standardem. Norfentanyl je hlavním metabolitem enzymatických reakcí katalyzovaných cytochromem P450 a produktem dalších degradačních procesů (např. elektrochemické oxidace). Po 5 hodinách reakce byl v reakční směsi pozorován jediný produkt extrahovatelný do chloroformu, ionizovatelný v pozitivním módu elektrospreje a poskytující iont s hodnotou m/z vyšší než 50. Podle přesné hodnoty m/z protonované molekuly $[M+H]^+ = 166,1339$ by mělo jít o látku s elementárním složením $C_{11}H_{16}N$. Z grafů plochy pod chromatografickými píky z chromatogramů extrahovaných pro příslušné ionty protonovaných molekul v závislosti na reakčním čase můžeme pozorovat změnu koncentrace fentanylu a jeho degradačních produktů. Můžeme si všimnout, že koncentrace degradačních produktů (norfentanyl) nejprve vzroste z nuly na maximum a poté dochází k poklesu v důsledku následného rozpadu na menší molekuly či ionty.



Obr. 41 Celkové iontové chromatogramy vzorků reakční směsi odebrané po 0, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 a 300 minutách reakční doby během Fentonovy reakce.

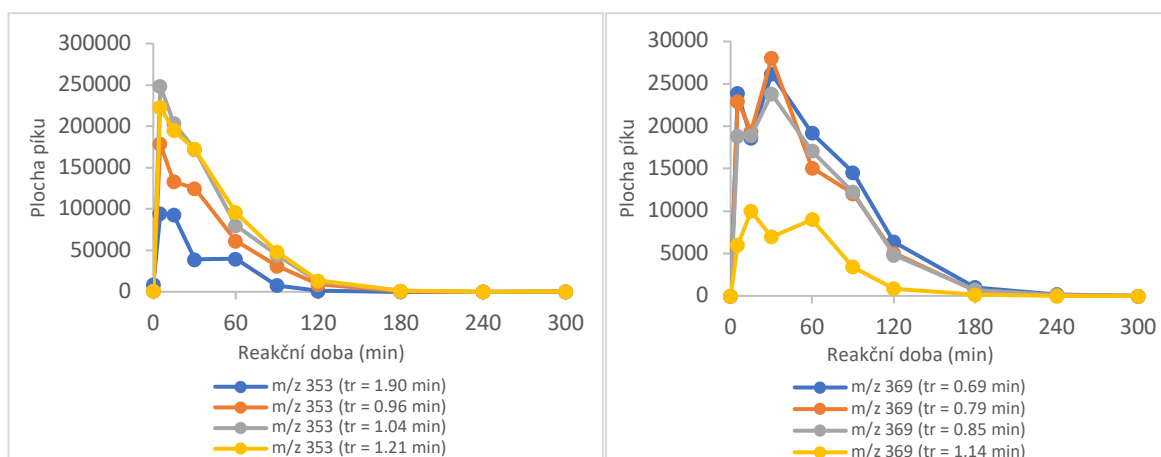
Z Obr. 42 vlevo vyplývá, že dochází k poklesu množství fentanylu v závislosti na době trvání reakce s Fentonovým činidlem. Po dvou hodinách reakce již nebyl zaznamenán žádný

signál fentanylu pomocí LC-MS analýzy. Z obrázku vpravo je patrné, že při Fentonově reakci došlo nejprve k prudkému nárůstu množství norfentanylu mezi počátkem a 20. minutou reakčního času a poté došlo k poklesu jeho množství v důsledku následných reakcí s Fentonovým činidlem. Od počátku působení Fentonova činidla dochází k nárůstu množství mnoha izomerních forem hydroxyfentanylu v reakční směsi, který byl zaznamenán jako metabolit fentanylu při mikrosomální metabolizaci fentanylu. Fentanyl reagoval s Fentonovým činidlem po dobu 300 minut, přičemž došlo k jeho úplnému rozkladu.



Obr. 42 Závislost plochy píku na čase pro fentanyl s m/z $[M+H]^+$ 337,2362 (vlevo) a norfentanyl s m/z $[M+H]^+$ 233,1658 (vpravo) po rozkladu Fentonovou reakcí.

Obr. 43 vlevo ukazuje, že od počátku působení Fentonova činidla dochází k nárůstu množství hydroxyfentanylu v reakční směsi za vzniku čtyř izomerních monohydroxylovaných produktů. Maximální množství těchto látek bylo zaznamenáno po 5 minutách reakce a dále s reakční dobou klesalo. Po 240 minutách došlo k úplnému rozkladu hydroxylovaných derivátů ve vzorku. Z obrázku vpravo vyplývá, že od počátku působení Fentonova činidla dochází také k nárůstu množství dihydroxyfentanylu, který se v reakční směsi nacházel ve čtyřech různých izomerních formách. Maximální množství dihydroxyderivátů bylo registrováno ve 30. minutě od počátku reakce, poté klesalo a v čase 300 minut již nebyly tyto produkty v reakční směsi detekovány.



Obr. 43 Závislost plochy píku na čase pro monohydroxylované produkty s m/z $[M+H]^+$ 353,2292 (vlevo) a dihydroxylované produkty s m/z $[M+H]^+$ 369,2235 (vpravo).

5.4 Srovnání výsledků metod oxidativní transformace

Srovnáním získaných výsledků z provedených experimentů (elektrochemická oxidace, mikrosomální metabolizace, Fentonova reakce) pro fentanyl, můžeme konstatovat, že hlavním oxidačním produktem (metabolitem) u všech studovaných reakcí je norfentanyl. Preferovanou reakční cestou je tedy *N*-dealkylace výchozí sloučeniny. V případě mikrosomální metabolizace i Fentonovy reakce dochází navíc k hydroxylaci fentanylu [43,60]. Nelze vyloučit vznik hydroxyfentanylu i během elektrochemické oxidace fentanylu, ale s využitím metody LC-MS nebyl při elektrochemické oxidaci hydroxyfentanyl detekován. Během Fentonovy reakce vzniká větší počet hydroxylovaných produktů fentanylu, v reakční směsi byly nalezeny polohové izomery mono- a dihydroxyfentanylu. V lidském těle by mikrosomální metabolizace nekončila odbouráním na norfentanyl a hydroxyfentanyl, ale docházelo by k rychlé přeměně na příslušný glukuronid či jiný sekundární metabolit (konjugát).

Srovnáním průběhu elektrochemické oxidace a mikrosomální metabolizace studovaných derivátů fentanylu, je možné dovodit, že průběhy obou přeměn jsou velmi podobné. Obecné porovnání obou mechanismů *N*-dealkylace je uvedeno v příloze 12 a 13. Hlavní oxidační i metabolickou cestou je *N*-dealkylace na odpovídající norderivát, méně preferovanou reakcí je poté hydroxylace na alifatický řetězec. U furanylfentanylu mimo *N*-dealkylaci dochází při mikrosomálním metabolismu ke štěpení amidové vazby za vzniku 4-anilin-*N*-fenethylpiperidin (4-ANPP). Při elektrochemické oxidaci furanylfentanylu 4-ANPP nevznikal. U dalších analog ani u samotného fentanylu nebyly pozorovány produkty štěpení amidové vazby při inkubaci s mikrosomy ani při elektrochemické oxidaci.

6 Závěr

V této diplomové práci byla studována elektrochemická oxidace a mikrosomální metabolizace pěti látek – fentanylu, carfentanilu, sufentanilu, furanylfentanylu a thiofentanylu a rozklad fentanylu za pomoci Fentonova činidla. Cílem bylo ověřit teoretické souvislosti mezi podobnostmi mechanismů elektrochemické oxidace a mikrosomální metabolizace fentanylů. K dosažení cíle bylo nutné identifikovat produkty těchto procesů pomocí LC-MS a porovnat oba procesy z hlediska užitečnosti v praxi. Z provedených experimentů a jejich porovnání pro fentanyl bylo zjištěno, že preferovanou reakční cestou je *N*-dealkylace na metabolit norfentanyl. V případě mikrosomální metabolizace i Fentonovy reakce dochází také k tvorbě hydroxyfentanylu. U studovaných derivátů fentanylu byl průběh velmi podobný. Hlavní metabolickou i oxidační cestou je *N*-dealkylace za vzniku příslušných nor-derivátů. U furanylfentanylu byla zjištěna odlišnost od ostatních fentanylů, neboť jeho dalším metabolitem je produkt štěpení amidové vazby 4-anilin-*N*-fenethylpiperidin (4-ANPP).

Těmito experimenty byla potvrzena hypotéza, že při elektrochemické oxidaci fentanylu dochází k tvorbě *N*-dealkylovaného produktu, podobně jako při inkubaci s jaterními mikrosomy. LC-MS charakteristiky metabolitů fentanylu a jeho analog mohou dále sloužit jako předloha při zjišťování přítomnosti těchto látek v lidském organismu.

Elektrochemická oxidace se potvrdila jako účinná, ale zároveň jednoduchá, rychlá a levná metoda pro získání oxidačních produktů, u které výsledek není ohrožen teplotní nestabilitou mikrosomů.

7 Použitá literatura

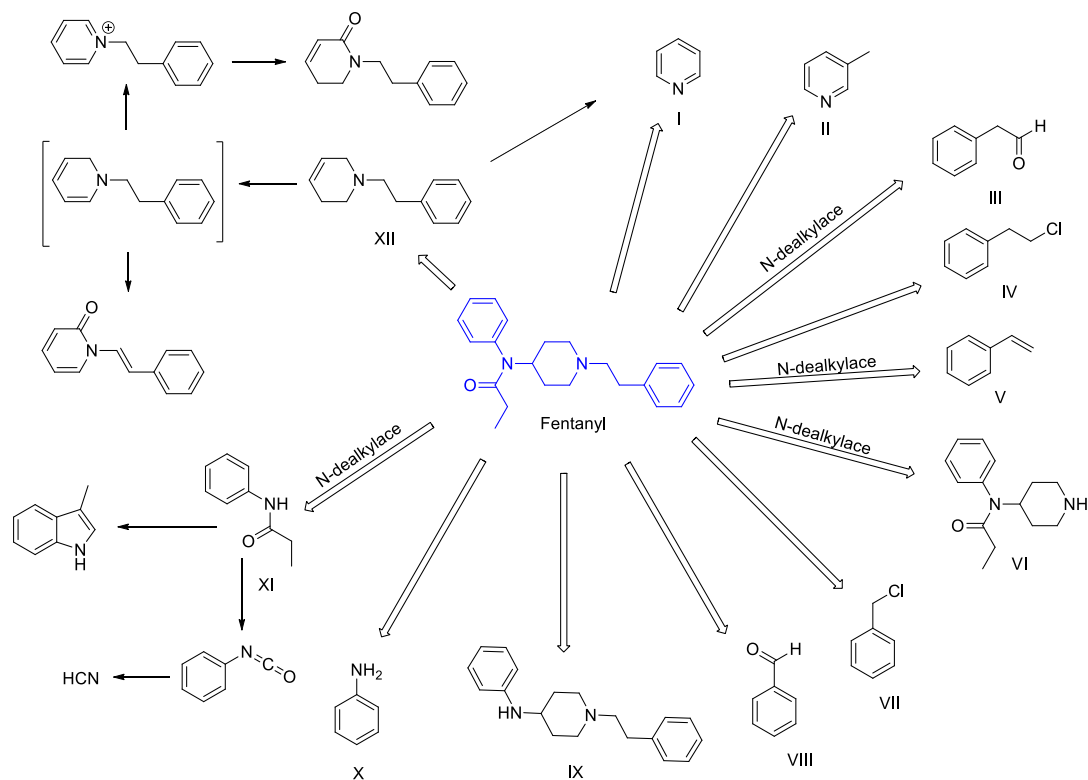
- [1] L. Fojtíková, B. Holubová, M. Kuchař, Nové psychoaktivní látky I, *Chem. List.* (2017) 234–238.
- [2] V. Mravčík, V. Běláčková, et al., Nové psychoaktivní látky a jejich výskyt v České republice, (2015) 216–221.
- [3] J. V. Rivera, E. G. Vance, et al., Novel Psychoactive Substances and Trends of Abuse, *Crit. Care Nurs. Q.* 40 (2017) 374–382. <https://doi.org/10.1097/CNQ.0000000000000174>.
- [4] L. A. King, A. T. Kicman, et al., A brief history of „new psychoactive substances”, *Drug Test. Anal.* 3 (2011) 401–403. <https://doi.org/10.1002/dta.319>.
- [5] Evropská zpráva o drogách 2016: Trendy a vývoj, 2016.
- [6] C.R. Report, AH-7921 Critical Review Report, (2014).
- [7] E.M.C. for D. and D. Addiction, Europol, EMCDDA - Europol Joint Report on a new psychoactive substance: 1-cyclohexyl-4-(1,2-diphenylethyl)piperazine ('MT-45'), *Jt. Reports.* (2014) 1–15.
- [8] K. A. Seely, J. Lapoint, J. H. Moran, Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 39 (2012) 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.04.017>.
- [9] Ch. D. Rosenbaum, S. P. Carreiro, et al., Here Today, Gone Tomorrow... and Back Again? A Review of Herbal Marijuana Alternatives (K2, Spice), Synthetic Cathinones (Bath Salts), Kratom, *Salvia divinorum*, Methoxetamine, and Piperazines, *J. Med. Toxicol.* 8 (2012) 15–32. <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0202-2>.
- [10] M. Hegrová, K. Řezanková, Separation of enantiomers of cathinones by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors, *Chem. List.* 110 (2016) 200–203.
- [11] V. Khullar, A. Jain, et al., Emergence of new classes of recreational drugs - Synthetic cannabinoids and cathinones, *J. Gen. Intern. Med.* 29 (2014) 1200–1204. <https://doi.org/10.1007/s11606-014-2802-4>.
- [12] M. Gebauer, J. Novotný, Potenciální význam opioidů v neuroprotekcii, bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, (2010).
- [13] P. M. Beardsley, Y. Zhang, et al., Synthetic opioids, *Handb. Exp. Pharmacol.* 252 (2018) 353–381. https://doi.org/10.1007/164_2018_149.
- [14] EMCDDA, European Drug Report 2015, 2015.
- [15] (UNODC) United Nations Office on Drugs and Crime, Global Smart Update: Fentanyl and its analogues-50 years on, (2017) 3–12. https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_17_web.pdf.
- [16] N. Fairbairn, P. O. Coffin, et al., Naloxone for heroin, prescription opioid, and illicitly made fentanyl overdoses: Challenges and innovations responding to a dynamic epidemic, *Int. J. Drug Policy.* 46 (2017) 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2017.06.005>.
- [17] M. G. Feasel, A. Wohlfarth, et al., Metabolism of Carfentanil, an Ultra-Potent Opioid, in Human Liver Microsomes and Human Hepatocytes by High-Resolution Mass Spectrometry, *AAPS J.* 18 (2016) 1489–1499. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9963-5>.
- [18] T. H. Stanley, The fentanyl story, *J. Pain.* 15 (2014) 1215–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.08.010>.
- [19] J. B. Zawilska, An expanding world of novel psychoactive substances: Opioids, *Front. Psychiatry.* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00110>.
- [20] S. Watanabe, S. Vikingsson, et al., In Vitro and In Vivo Metabolite Identification Studies for the New Synthetic Opioids Acetylfentanyl, Acrylfentanyl, Furanylfentanyl, and 4-Fluoro-Isobutyrylfentanyl, *AAPS J.* 19 (2017) 1102–1122. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0070-z>.
- [21] P. Armenian, K. T. Vo, et al., Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review, *Neuropharmacology.* 134 (2018) 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.016>.
- [22] D. Guerrieri, E. Rapp, et al., Postmortem and toxicological findings in a series of furanylfentanyl-related deaths, *J. Anal. Toxicol.* 41 (2017) 242–249. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw129>.
- [23] B. K. Logan, A. L. A. Mohr, et al., Reports of Adverse Events Associated with Use of Novel Psychoactive Substances, 2013-2016: A Review, *J. Anal. Toxicol.* 41 (2017) 573–610. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx031>.
- [24] A. J. Krotulski, D. M. Papsun, et al., Fatality following ingestion of tetrahydrofuranylfentanyl, U-49900 and methoxy-phencyclidine, *J. Anal. Toxicol.* 42 (2018) e27–e32. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx092>.
- [25] Agenda Item 4.10, Tetrahydrofuranyl fentanyl (THF-F) - Critical Review Report, WHO Expert Committee Drug Depend. (2006) 1–30. [papers3://publication/uuid/C0F2D662-7151-4F7C-834D-F3C6631A8B20](https://publications.who.int/publication/uuid/C0F2D662-7151-4F7C-834D-F3C6631A8B20).

- [26] S. N. Staeheli, M. R. Baumgartner, et al., Time-dependent postmortem redistribution of butyrfentanyl and its metabolites in blood and alternative matrices in a case of butyrfentanyl intoxication, *Forensic Sci. Int.* 266 (2016) 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.05.034>.
- [27] N. Allibe, C. Richeval, et al., Fatality involving ocfentanil documented by identification of metabolites, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 995–1000. <https://doi.org/10.1002/dta.2326>.
- [28] F. E. Dussy, S. Hangartner, et al., An acute ocfentanil fatality: A case report with postmortem concentrations, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 761–766. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw096>.
- [29] D. Guerrieri, E. Rapp, et al., Acrylfentanyl: Another new psychoactive drug with fatal consequences, *Forensic Sci. Int.* 277 (2017) e21–e29. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.05.010>.
- [30] J. P. Monk, R. Beresford, et al., Sufentanil, *Drugs*. 36 (1988) 286–313. <https://doi.org/10.2165/00003495-198836030-00003>.
- [31] T. Tateishi, Y. Krivoruk, et al., Identification of human liver cytochrome P-450 3A4 as the enzyme responsible for fentanyl and sufentanil N-dealkylation, *Anesth. Analg.* 82 (1996) 167–172. <https://doi.org/10.1097/00000539-199601000-00031>.
- [32] World Health Organization, WHO Expert Committee on Drug Dependence, 1989.
- [33] A. Almeida, R. Christie, et al., EMCDDA–Europol Joint Report on a new psychoactive substance: N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl] cyclopropanecarboxamide (cyclopropylfentanyl), (2005) 1–16. http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/7926/20181014_TDAS18001ENN_PDF.pdf.
- [34] M. Choiniska, J. Langmaier, et al., Electrochemical investigation of fentanyl and analogues, (b.r.) 1–40.
- [35] R. Jelínková, Zneužívání opioidů methoxyfentanylu a cyklopropylfentanylu, (2018) 147–158.
- [36] M. Evans-Brown, A. Gallegos, R. Sedefov, et al., Report on the risk assessment of 2-methoxy- N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]acetamide (methoxyacetylfentanyl) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances, *Risk assessments.* (2018) 30. [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/9606/Risk assessment methoxyacetylfentanyl.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/9606/Risk%20assessment%20methoxyacetylfentanyl.pdf).
- [37] M. Evans-Brown, A. Gallegos, R. Sedefov, et al., Report on the risk assessment of N-(4-fluorophenyl)-2-methyl-N-[1-(2-phenylethyl) piperidin-4-yl]propanamide in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances, (b.r.).
- [38] I. Tabarra, S. Soares, et al., Novel synthetic opioids - toxicological aspects and analysis, *Forensic Sci. Res.* 4 (2019) 111–140.
- [39] J. B. Zawilska, K. Kuczyńska, et al., Carfentanil – from an animal anesthetic to a deadly illicit drug, *Forensic Sci. Int.* 320 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110715>.
- [40] R. J. Phipps, J. J. Smith, et al., Chapter 2 Current methods for the separation and analysis of cocaine analytes, *Second Edi, Elsevier B.V.*, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1567-7192\(06\)06002-5](https://doi.org/10.1016/S1567-7192(06)06002-5).
- [41] RF-II, RF-II (Rheumatoid Factors II), (2020) 2–5.
- [42] R. Verplaetse, J. Tytgat, et al., Development and validation of a sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of fentanyl and its major metabolite norfentanyl in urine and whole blood in forensic context, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1987–1996. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.05.033>.
- [43] J. C. Patel, S. Parveen, et al., In Vitro and in Vivo Analysis of Fentanyl and Fentanyl Metabolites using Hyphenated Chromatographic Techniques: A Review, *Chem. Res. Toxicol.* 35 (2022) 30–42. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00225>.
- [44] A. Pelander, I. Ojanperä, et al., Toxicological Screening with Formula-Based Metabolite Identification by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5710–5718. <https://doi.org/10.1021/ac030162o>.
- [45] E. Naghian, E. Marzi Khosrowshahi, et al., A new electrochemical sensor for the detection of fentanyl lethal drug by a screen-printed carbon electrode modified with the open-ended channels of Zn(ii)-MOF, *New J. Chem.* 44 (2020) 9271–9277. <https://doi.org/10.1039/d0nj01322f>.
- [46] E. Sohoulı, A. H. Keihan, et al., A glassy carbon electrode modified with carbon nanooxions for electrochemical determination of fentanyl, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 110684. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110684>.
- [47] B. Milne, L. Quintin, et al., Fentanyl decreases catecholamine metabolism measured by in vivo voltammetry in the rat locus coeruleus, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67 (1989) 532–536. <https://doi.org/10.1139/y89-085>.
- [48] L. J. Peng, M. L. Wen, et al., Construction and performance characteristics of new fentanyl-selective plastic membrane electrode, *Anal. Sci.* 17 (2001) 815–818. <https://doi.org/10.2116/analsci.17.815>.
- [49] L. J. Peng, M. L. Wen, et al., Potentiometric determination of fentanyl in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 667–673. <https://doi.org/10.1016/S0731->

- 7085(02)00345-X.
- [50] H. M. Elbardisy, Ch. W. Foster, et al., Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection, *Anal. Methods*. 11 (2019) 1053–1063. <https://doi.org/10.1039/c9ay00009g>.
- [51] M. K. Choińska, I. Šestáková, et al., Electroanalysis of Fentanyl and Its New Analogs: A Review, *Biosensors*. 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12010026>.
- [52] A. Skulska, M. Kała, et al., Fentanyl and its analogues in the forensic laboratory. Medical and analytical problems, *Z Zagadnień Nauk Sadowych*. 59 (2004).
- [53] F. Freni, S. Pezzella, et al., A case report on potential postmortem redistribution of furanyl fentanyl and 4-ANPP, *Forensic Sci. Int.* 304 (2019) 109915. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.109915>.
- [54] M. A. Gardner, S. Sampsel, et al., Analysis of fentanyl in urine by DLLME-GC-MS, *J. Anal. Toxicol.* 39 (2015) 118–125. <https://doi.org/10.1093/jat/bku136>.
- [55] P. Anzenbacher, E. Anzenbacherová, Cellular and Molecular Life Sciences Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 737–747. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/PL00000897>.
- [56] L. Stejskalová, A. Rulcová, *Metabolismus léčiv - indukční potenciál látek a interakce s nukleárními receptory*, (2013).
- [57] L. Tomešová, S. Smrček, *Využití Fentonovy reakce pro rozklad farmak v ekosystému*, bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, 2011.
- [58] J. Pláteník, Volné radikály, antioxidanty a stárnutí, *Interní medicína pro praxi*. 11 (2009) 30–33.
- [59] R. A. Greenwald, *Handbook Methods For Oxygen Radical Research*, 2018.
- [60] L. Li, X. Yu, et al., Determination of Fentanyl, Alpha-Methylfentanyl, Beta-Hydroxyfentanyl and the Metabolite Norfentanyl in Rat Urine by LC–MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab021>.
- [61] M. M. Bazley, M. Logan, et al., Decontamination of fentanyl and fentanyl analogues in field and laboratory settings: A review of fentanyl degradation, *Aust. J. Chem.* 73 (2020) 868–879. <https://doi.org/10.1071/CH19669>.
- [62] L. R. Hall, R. T. Iwamoto, R. P. Hanzlík, Electrochemical Models for Cytochrome P-450. N-Demethylation of Tertiary Amides by Anodic Oxidation, (1989) 2446–2451.

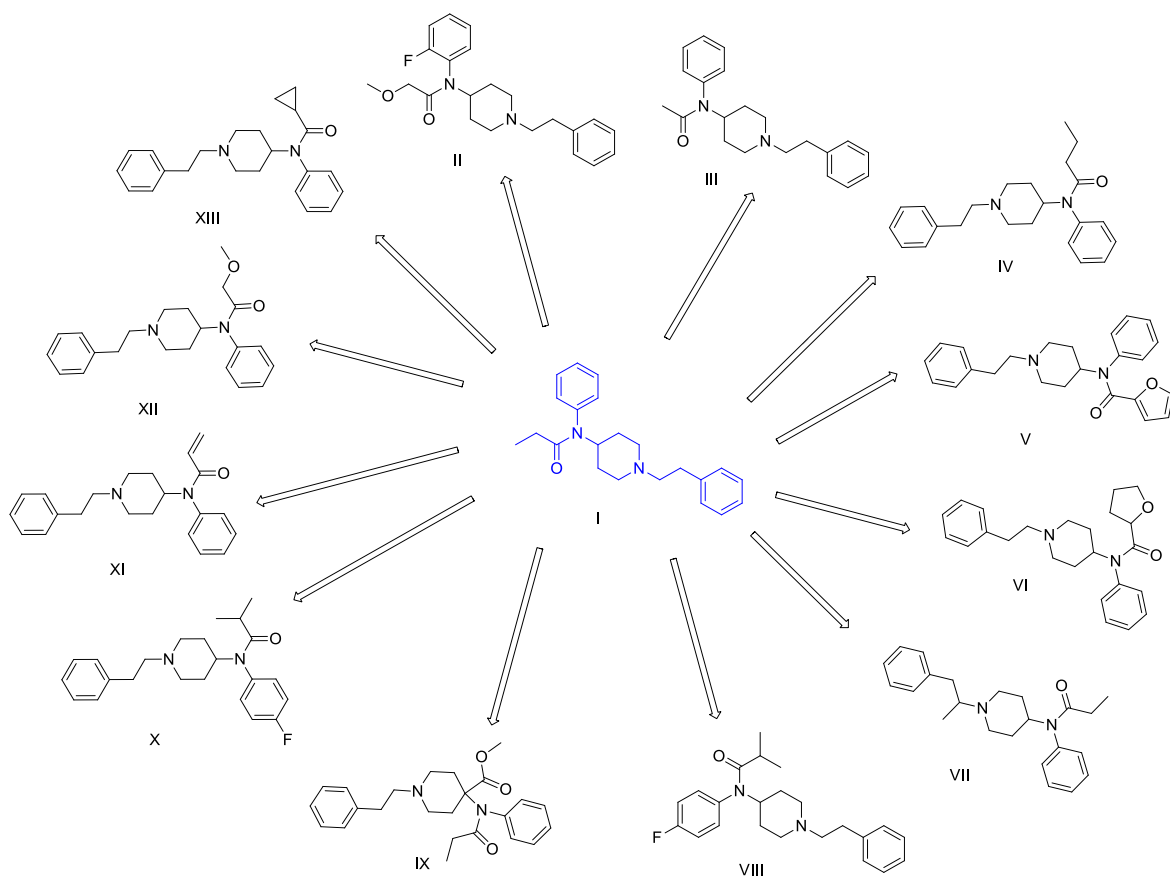
8 Přílohy

Příloha 1: Schéma metabolitů fentanylu



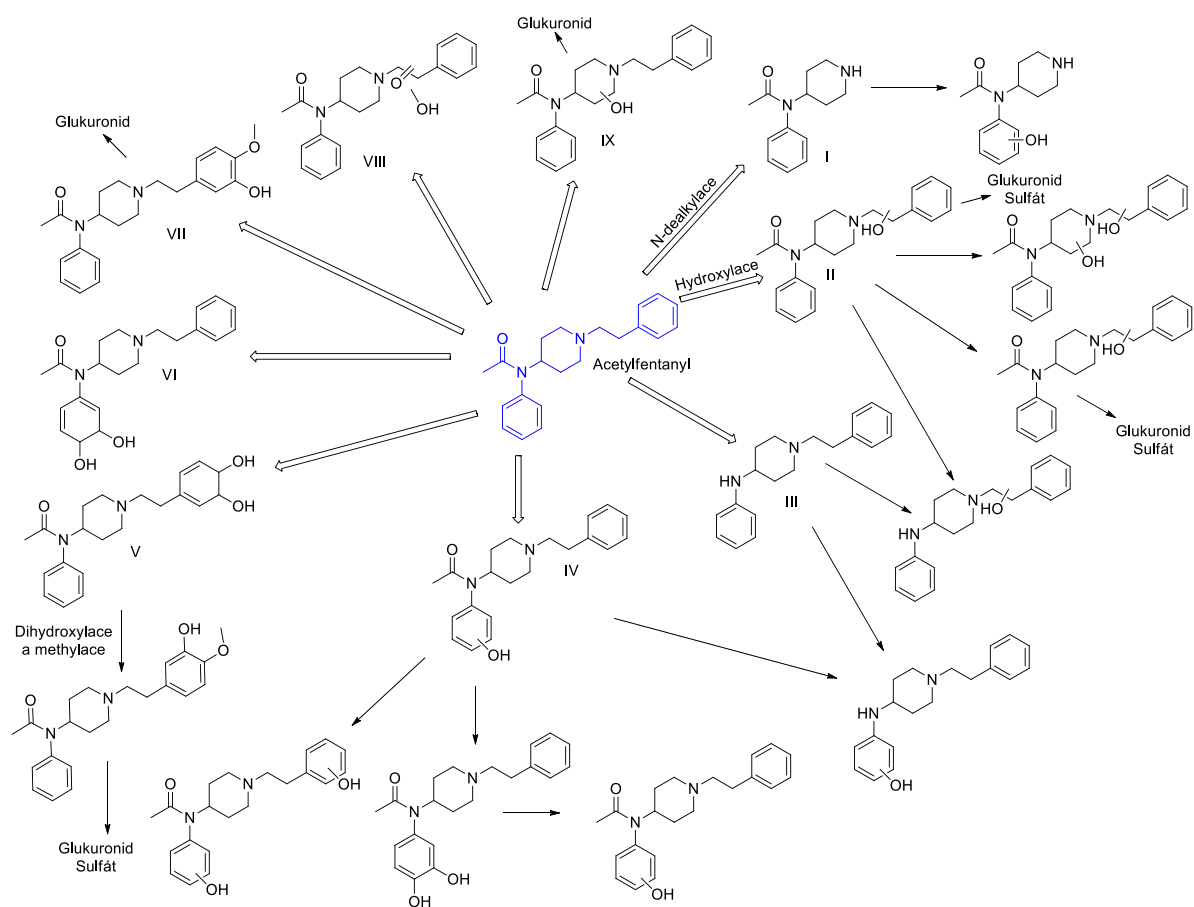
(I) pyridin, (II) 3-methylpyridin, (III) 2-fenylacetaldehyd, (IV) (2-chlorethyl)benzen, (V) styren, (VI) norfentanyl, (VII) benzylchlorid, (VIII) benzaldehyd, (IX) despropionylfentanyl, (X) anilin, (XI) *N*-fenylpropionamid, (XII) 1-fenethyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin [61].

Příloha 2: Schéma derivátů fentanylu



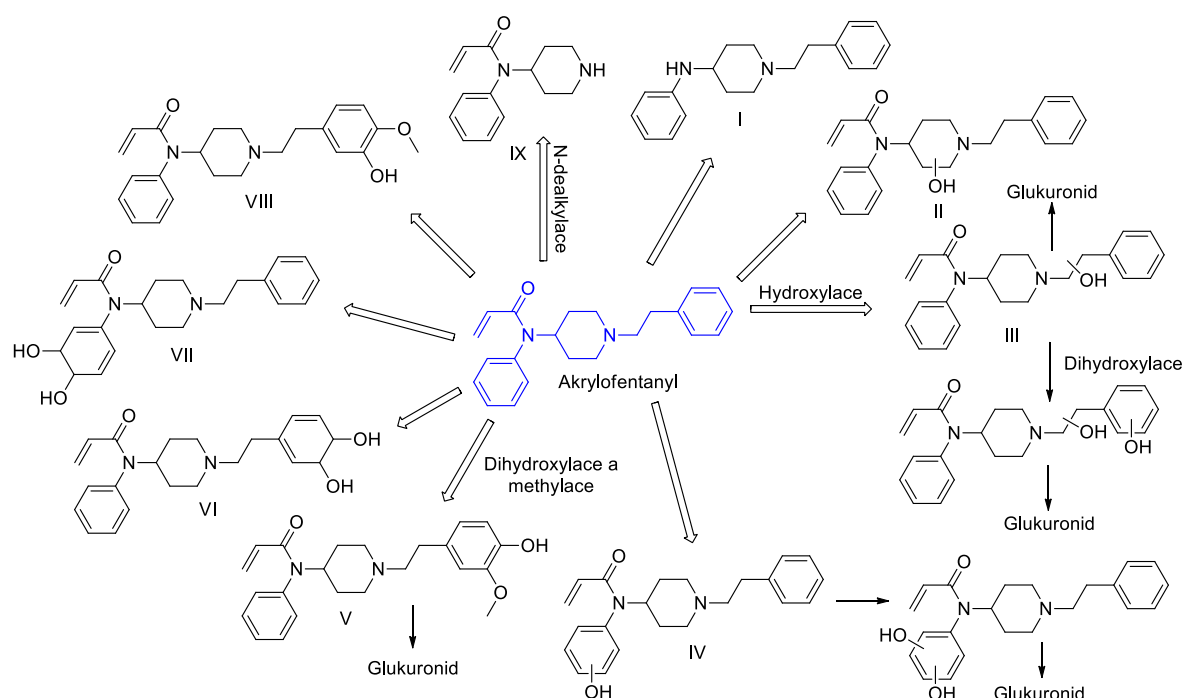
(I) fentanylu, (II) ocfentanylu, (III) acetylfentanylu, (IV) butyrfentanylu, (V) furanylfentanylu, (VI) tetrahydrofuranlylfentanylu, (VII) α -metylfentanylu, (VIII) *p*-fluorisobutyrylfentanylu, (IX) carfentanylu, (X) *p*-fluorisobutyrylfentanylu, (XI) akrylfentanylu, (XII) metoxyacetylfentanylu, (XIII) cyklopropylfentanylu [38].

Příloha 4: Schéma metabolitů acetylfentanylu



(I) *N*-fenyl-*N*-piperidin-4-yl)acetamid, (II) acetylfentanylu s hydroxylovaným alifatickým řetězcem, (III) 1-fenetyl-*N*-fenylpiperidin-4-amin, (IV) acetylfentanylu s hydroxylovaným aromatickým jádrem, (V) *N*-(1-(2-(3,4-dihydroxycyklohexa-1,5-dien-1-yl)ethyl)piperidin-4-yl)-*N*-fenylacetamid, (VI) *N*-(3,4-dihydroxycyklohexa-1,5-dien-1-yl)-*N*-(1-fenethylpiperidin-4-yl)acetamid, (VII) *N*-(1-(3-hydroxy-4-methoxyfenethyl)piperidin-4-yl)-*N*-fenylacetamid, (VIII) hydroxylovaný acetylfentanylu, (IX) acetylfentanylu s hydroxylovaným piperidinovým kruhem [20].

Příloha 5: Schéma metabolitů akrylfentanylu



(I) 1-fenethyl-*N*-fenylpiperidin-4-amin, (II) akrylfentanylu s hydroxylovaným piperidinovým jádrem, (III) akrylfentanylu s hydroxylovaným alifatickým řetězcem, (IV) akrylfentanylu s hydroxylovaným aromatickým jádrem, (V) *N*-1-(4-hydroxy-3-methoxyfenethyl)piperidin-4-yl)-*N*-fenylakrylamid, (VI) *N*-1-(2-(3,4-dihydroxycyklohexa-1,5-dien-1-yl)ethyl)piperidin-4-yl)-*N*-fenylakrylamid, (VII) *N*-(3,4-dihydroxycyklohexa-1,5-dien-1-yl)-*N*-(1-fenethylpiperidin-4-yl)akrylamid, (VIII) *N*-(1-(3-hydroxy-4-methoxyfenethyl)-piperidin-4-yl)-*N*-fenylakrylamid, (IX) *N*-fenyl-*N*-(piperidin-4-yl)akrylamid [20].

Příloha 6: Schéma metabolitů sufentanilu

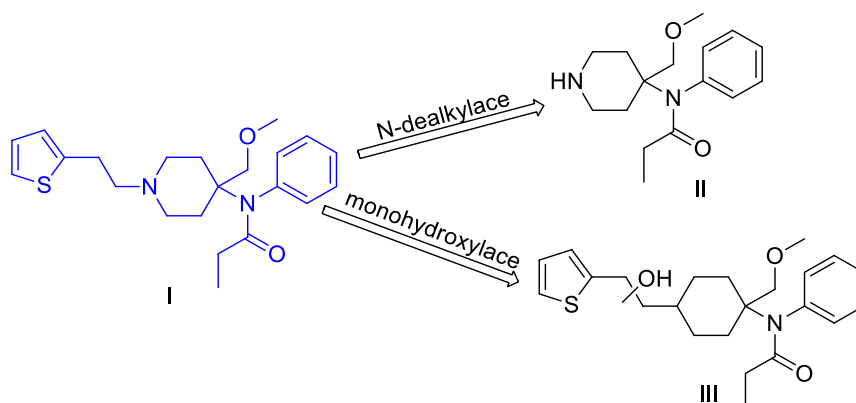
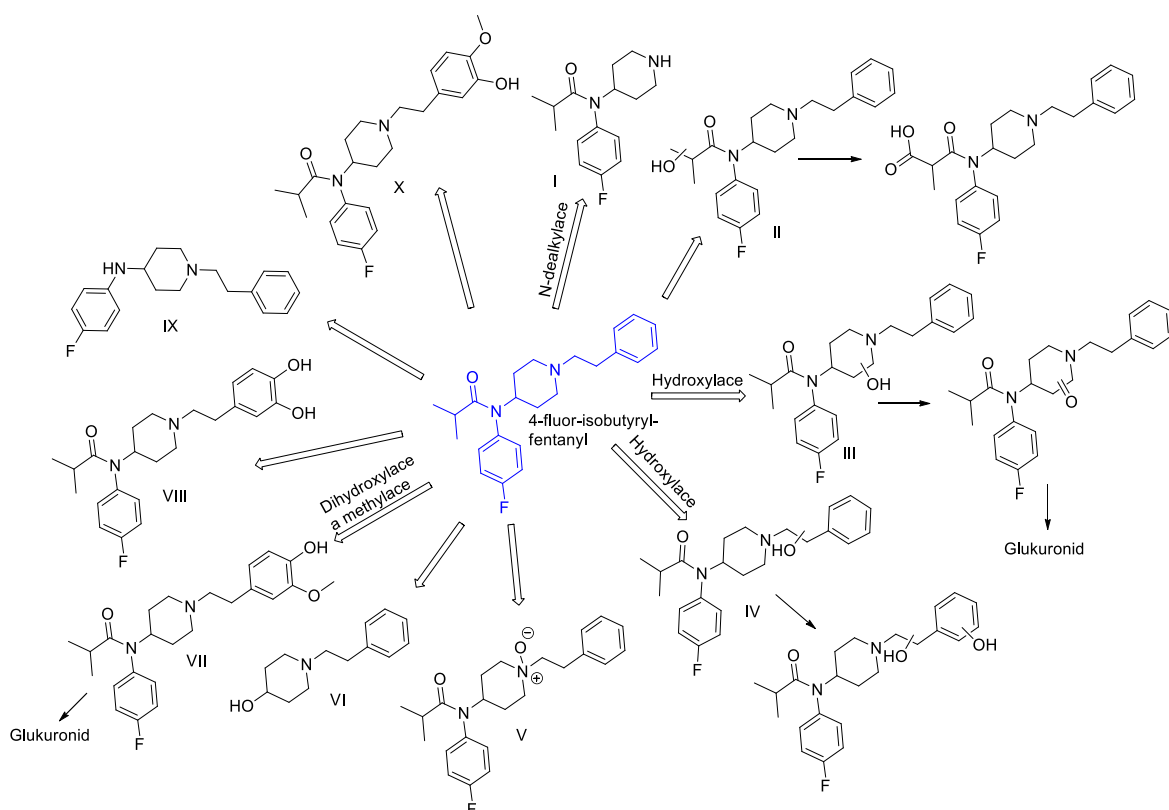


Schéma metabolitů sufentanilu: (I) sufentanil, (II) norsufentanil, (III) hydroxysufentanil [31].

Příloha 7: Schéma metabolitů 4-fluorisobutyrylfentanylu



(I) *N*-(4-fluorfenyl)-*N*-(piperidin-4-yl)isobutyramid, (II) 4-fluorisobutyrylfentanyln hydroxylovaný na alifatickém řetězci, (III) 4-fluorisobutyrylfentanyln s hydroxylovaným piperidinovým kruhem, (IV) 4-fluorisobutyrylfentanyln hydroxylovaný na alifatickém řetězci, (V) 4-(*N*-(4-fluorfenyl)isobutyramid)-1-fenethylpiperidin-1-oxid, (VI) 1-fenethylpiperidin-4-ol, (VII) *N*-(4-fluorfenyl)-*N*-(1-(4-hydroxy-3-methoxyfenethyl)piperidin-4-yl)isobutyramid, (VIII) *N*-(1-(3,4-dihydroxyfenethyl)piperidin-4-yl)-*N*-(4-fluorfenyl)isobutyramid, (IX) *N*-(4-fluorfenyl)-1-fenethylpiperidin-4-amin, (X) *N*-(4-fluorfenyl)-*N*-(1-(3-hydroxy-4-methoxyfenethyl)piperidin-4-yl)isobutyramid [20].

Příloha 8: Schéma metabolitů carfentanilu

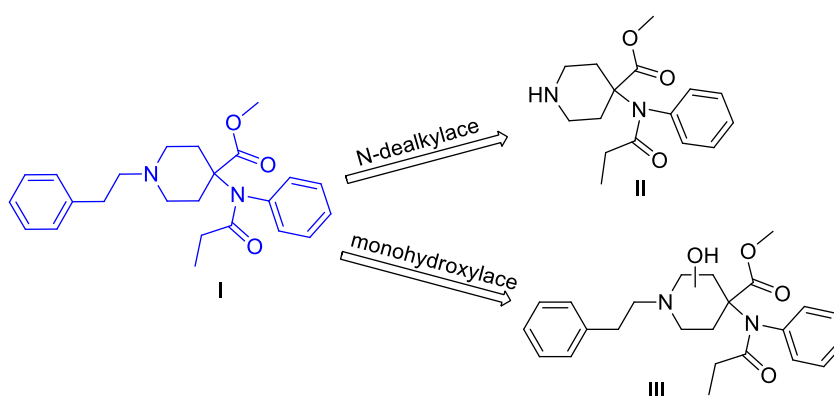
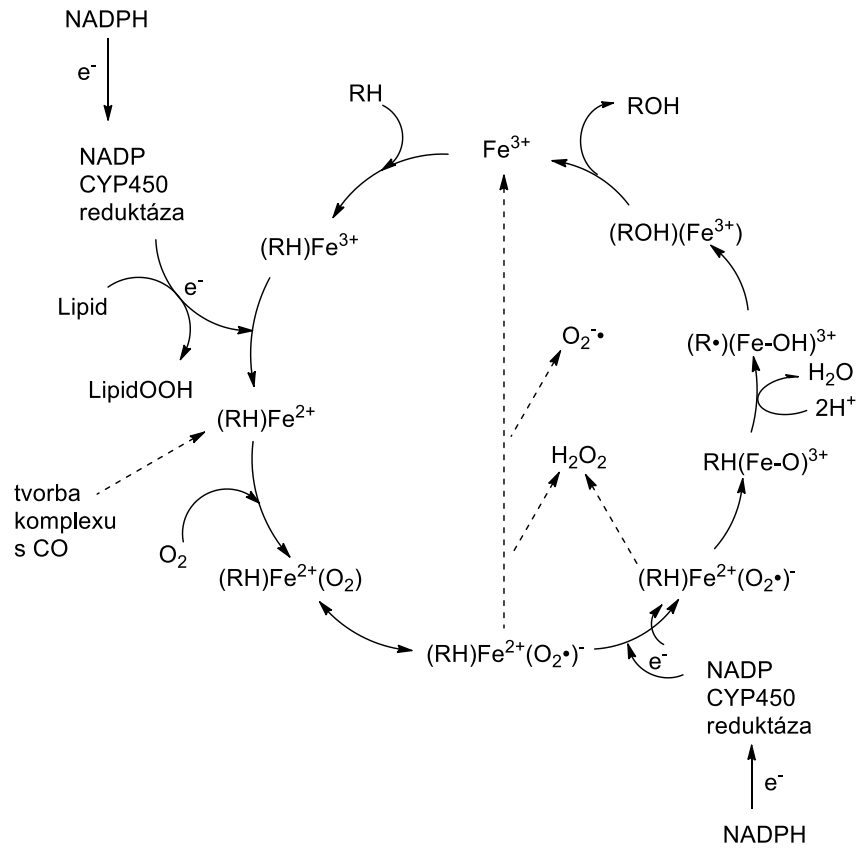


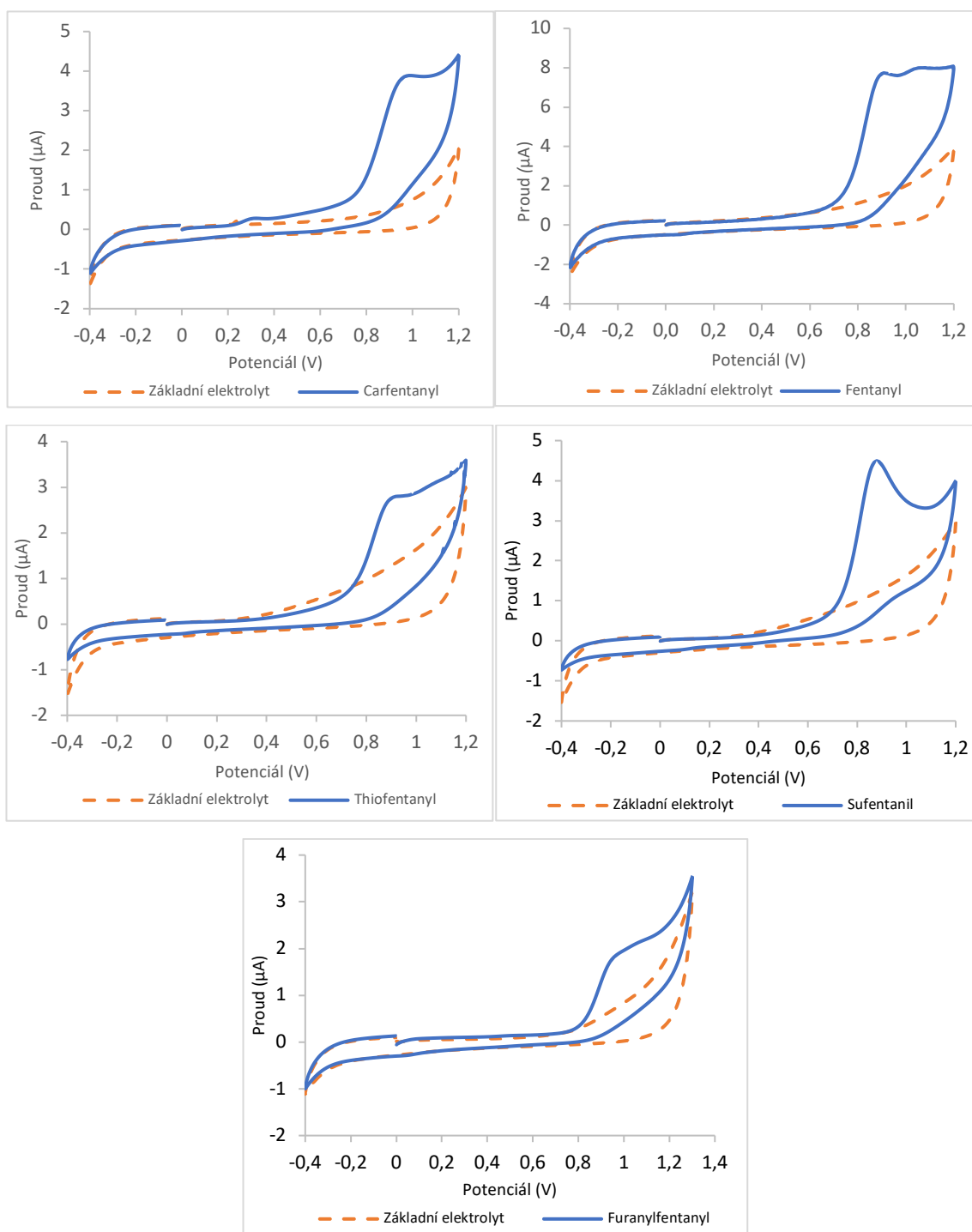
Schéma metabolitů carfentanilu: (I) carfentanil, (II) norcarfentanil, (III) hydroxycarfentanil [39].

Příloha 9: Mechanismus oxidace pomocí enzymu CYP450



Mechanismus oxidace endogenních látek a xenobiotik pomocí enzymu CYP450 [55].

Příloha 10: Záznamy cyklických voltamogramů pro jednotlivé fentanyly

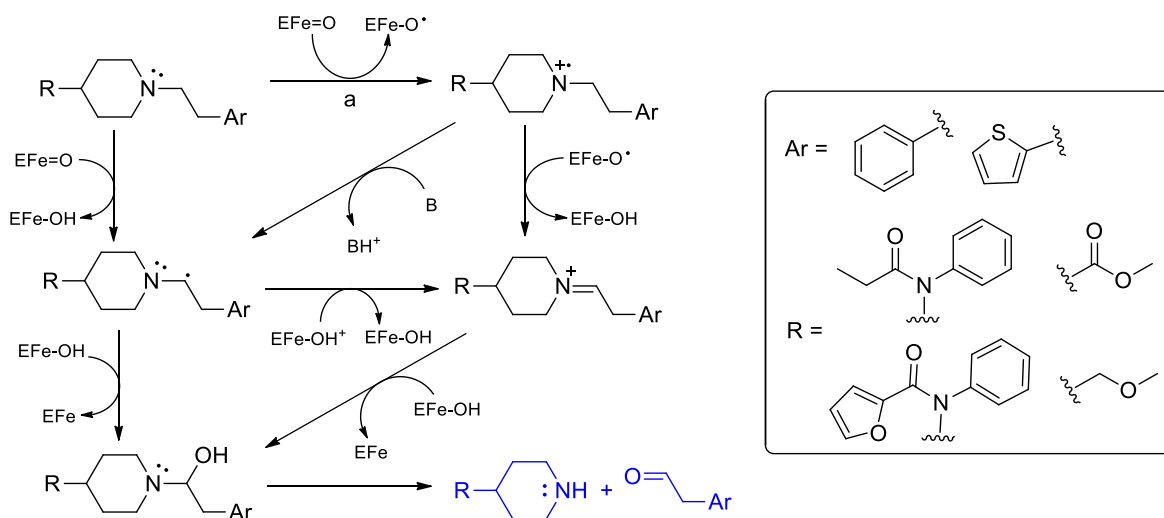


Koncentrace fentanylu 0,25 mmol/l, koncentrace carfentanilu, thiofentanilu, sufentanilu a furanylfentanilu 0,1 mmol/l, základní elektrolyt 0,05 M-CH₃COONH₄ v H₂O s 10 % MeOH (v/v), pracovní GCE, referentní SCE, rychlost polarizace 50 mV/s.

Příloha 11: Tabulka nalezených produktů elektrochemických a metabolických přeměn fentanylu a jeho analog a jejich LC-MS charakteristiky

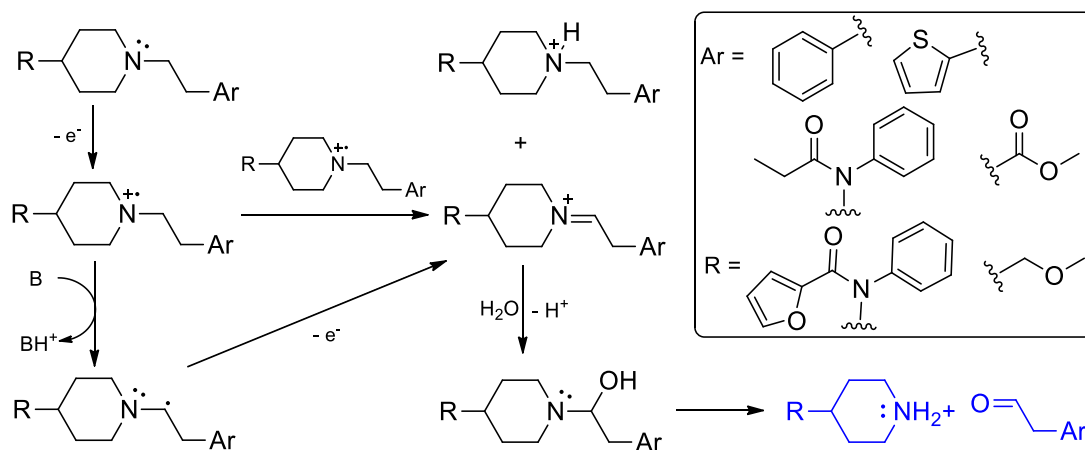
Fentanyl nebo jeho analog	Elementární složení [M+H] ⁺	Teoretická <i>m/z</i>	Nalezená <i>m/z</i>	Odchyly od teoretické <i>m/z</i> (mDa)	Retenční čas (min)
Fentanyl	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ⁺	337,2280	337,2342	6,20	5,89
Norfentanyl	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ⁺	233,1654	233,1664	1,00	4,50
Hydroxyfentanyl	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₂ ⁺	353,2229	353,2229	0,00	4,90
Carfentanil	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₃ ⁺	395,2335	395,2337	0,20	5,90
Norcarfentanil	C ₁₆ H ₂₃ N ₂ O ₃ ⁺	291,1709	291,1709	0,00	4,58
Hydroxycarfentanil	C ₂₄ H ₃₁ N ₂ O ₄ ⁺	411,2284	411,2284	0,00	5,43
Sufentanil	C ₂₂ H ₃₁ N ₂ O ₂ S ⁺	387,2106	387,2201	9,50	6,60
Norsufentanil	C ₁₆ H ₂₅ N ₂ O ₂ ⁺	277,1916	277,1969	5,30	5,24
Hydroxysufentanil	C ₂₂ H ₃₁ N ₂ O ₃ S ⁺	403,2055	403,2055	0,00	6,09
Furanylfentanyl	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₂ ⁺	375,2073	375,2083	1,00	5,12
Furanyl norfentanyl	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₂ ⁺	271,1447	271,1776	32,90	4,78
4-ANPP	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ ⁺	281,2018	281,2018	0,00	4,21
Thiofentanyl	C ₂₀ H ₂₇ N ₂ OS ⁺	343,1844	343,1855	1,10	5,32
Norfentanyl	C ₁₄ H ₂₁ N ₂ O ⁺	233,1654	233,1664	1,00	4,41
Hydroxythiofentanyl	C ₂₀ H ₂₇ N ₂ O ₂ S ⁺	359,1793	359,1790	-0,30	4,52

Příloha 12: Schéma mechanismu metabolické *N*-dealkylace aminů



Mechanismus *N*-dealkylace aminů působením enzymu cytochromu P450. Reakční schéma představuje abstrakčně-rekombinanční mechanismus, ve kterém EFe=O představuje oxoželezo vázané v hemoproteinu a EFe železitou formu enzymu, která má formálně o dva ekvivalenty nižší oxidační stav než EFe=O. Dráha (a) ilustruje mechanismus tvorby aminiových iontů. Předpokládá se, že akceptor elektronu je komplex oxo-železa v cytochromu P450 (EFe=O) a B je akceptorem protonu (např. kyslík jednoelektronově redukované formy EFe=O) [62].

Příloha 13: Schéma mechanismu elektrochemické *N*-dealkylace aminů



Mechanismus elektrochemické *N*-dealkylace aminů využívá nepárových elektronů terciárního aminu, který může poskytnout elektron pro oxidaci. Dusík tedy nejprve ztrácí elektron z piperidinového kruhu za vzniku kationradikálu, který se následně vlivem ztráty protonu a elektronu přemění na Schiffovu bázi. Druhá, pravděpodobnější cesta předpokládá disproportionační přenos vodíku mezi dvěma kationradikály. Vzniklá Schiffova báze se poté rychle hydrolyzuje na sekundární amin [45,62].