

## EXTRAKČNĚ- SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FENTANYLU A JEHO DERIVÁTŮ

ROMANA JELÍNKOVÁ, EMIL HALÁMEK  
a ZBYNĚK KOBLIHA

Ústav ochrany proti zbráním hromadného ničení, Univerzita obrany Brno, Víta Nejedlého 691, 682 01 Vyškov  
romana.jelinkova@unob.cz

Došlo 22.7.13, přepracováno 27.1.14, přijato 13.2.14.

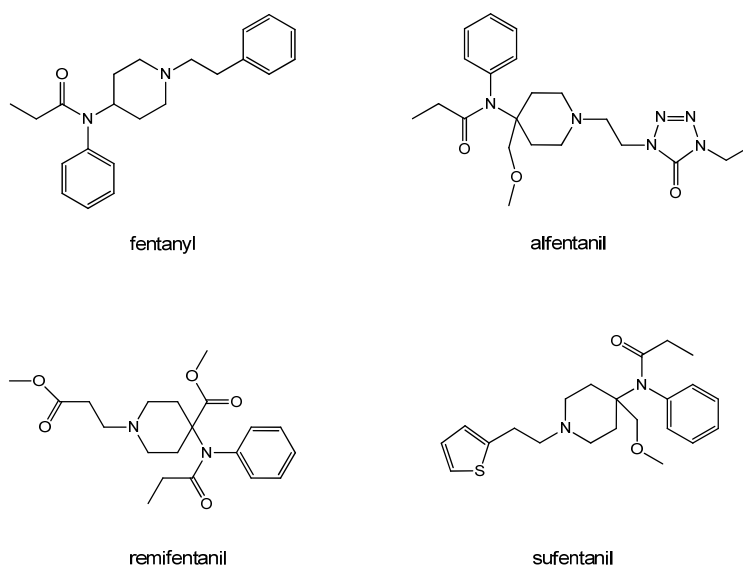
Klíčová slova: fentanyl a jeho deriváty, UV/VIS spektrofotometrie, extrakce, azobarvy

### Úvod

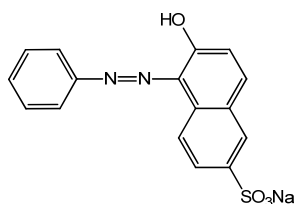
V říjnu roku 2002 čechští separatisté obsadili divadlo Dubrovka v Moskvě. Ruské jednotky zvláštního určení použily při záchranné akci ke zneschopnění útočníků psychoaktivní plyn, jehož identitu tehdejší vláda tajila<sup>1,2</sup>. Z důvodu neinformovanosti o použité látce zemřelo na následky jejího působení přes sto rukojmích včetně několika útočníků především proto, že zdravotnický personál nebyl dostatečně rychle schopen použít adekvátní antidotum. Neautorizované zdroje krátce po incidentu uváděly pravděpodobné použití látek 3-ethylfentanyl, carfentanyl

nebo alfentanil<sup>3,4</sup>. Až po několika letech byly publikovány analýzy vzorků moči a oblečení provedené v laboratořích v Porton Down dokazující, že v Moskvě byly použity deriváty fentanylu – carfentanyl a remifentanyl<sup>5</sup>.

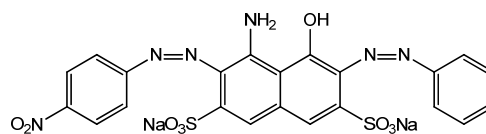
Fentanyl patří mezi velmi účinné agonisticky působící opioidy anilidopiperidinového typu. Látka *N*-fenyl-*N*-[1-(2-fenylethyl)piperidin-4-yl]propanamid byla poprvé syntetizována belgickým chemikem Janssenem v roce 1960 jako nitrožilní anestetikum s názvem Sublimaze. O několik let později už byl využíván v celosvětovém měřítku<sup>6</sup>. Jako opioidní analgetikum vykazuje až 80× vyšší účinky než morfin<sup>7</sup> a je pro svůj rychlý nástup a relativně rychlé odeznění účinku používán k neuroleptanalgezií při kratších výkonech<sup>8</sup>. Fentanyl jako látka agonisticky působící na nervové receptory CNS je obvykle aplikován několika způsoby, a to intravenózně či sublinguálně, ve formě transdermální náplasti (Durogesic) nebo nosního spreje<sup>9,10</sup>. Alfentanil známý pod obchodním názvem Alfenta® a Rapifen je silné efektní analgetikum; derivát fentanylu s podobnými účinky, rychlým nástupem a kratším trváním délky účinku<sup>8,11</sup>. Je využíván především k neuroleptanalgezií v ambulantní chirurgii. V porovnání s fentanylem vykazuje příznivější farmakokinetické vlastnosti<sup>12</sup>. Remifentanyl je využíván jako rychle a krátkodobě působící analgetikum podávané jako doplněk k anestezii ve formě hydrochloridu remifentanilu. V krvi je poměrně rychle inaktivován esterasami na neaktivní metabolity. Látka je užívána ke krátkodobé analgezií při ambulantních výkonech, naopak nulové využití má v léčbě chronické bolesti<sup>13,14</sup>. Sufentanil je bílý nebo téměř bílý prášek nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu a ethanolu (96%)<sup>15</sup>. Je známý pod značkou Sufenta® a Sufenta Forte, či R 3073 (cit.<sup>16</sup>). Je používán při epidurální a kombinované celkové anestezii. Má až 10× větší analgetický účinek



Obr. 1. Struktura analytů: fentanylu, remifentanilu, alfentanilu, sufentanilu



Obr. 2. Strukturální vzorec činidla kroceinová oranž



Obr. 3. Strukturální vzorec činidla amidočerněň

než fentanyl a je mimořádně dobře rozpustný v tucích, což umožňuje rychlou penetraci do CNS. Délka trvání jeho účinku je přibližně 10–25 min (cit.<sup>17</sup>). Nežádoucím doprovodným jevem jeho účinku je nauzea a tachykardie.

Studované analyty obsahující ve své molekule aminoskupinu vytvářejí s vhodnými barevnými činidly iontové asociáty, které jsou extrahovány rozpouštědly nemísitelnými s vodou. Jako reakční činidla byla k extrakčně spektrofotometrickému stanovení analytů použita kyselá dusíkatá barviva<sup>18</sup> kroceinová oranž a amidočerněň (obr. 2 a 3) ze skupiny azolátek, které mají v důsledku  $\pi$ -delokalizace elektronů ve dvojných vazbách intenzivní zabarvení, přičemž jejich vlastnosti výrazně ovlivňuje charakter a poloha substituentů<sup>19</sup>.

## Experimentální část

### Reagencie

Fentanyl dihydrogen citrát, CAS 990-73-8, injekční forma fy Torrex Pharma Ltd, Praha, CZ, 1 ml roztoku obsahuje 50  $\mu$ g fentanylu.

Rapifen, Alfentanili hydrochloridum, CAS 70879-28-6, Janssen-Cilag s.r.o., Praha, ČR, pro i. v. podání, 0,544 mg v 1 ml odpovídá 50  $\mu$ g alfentanilu.

Remifentanil hydrochloride, CAS 132539-07-2, léková injekční forma Ultiva TM, Glaxo Group Ltd. Greenford, Middlesex, UK, 2 mg remifentanilu v jedné ampuli.

Sufentanili dihydrogenocitras, CAS 60561-17-3, Torrex Pharma s.r.o., Praha, ČR, pro i. v. podání; 75  $\mu$ g sufentanili dihydrogenocitras odpovídá 50  $\mu$ g sufentanilum v 1 ml.

Z široké palety různých barviv<sup>20</sup> byla pro stanovení vybraných opiátů vybrána činidla:

Kroceinová oranž – CAS 1934-20-9, ( $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$ ),  $M_w = 350,324$

Amidočerněň – CAS 1064-48-8, ( $C_{22}H_{14}N_6O_9S_2Na_2$ ),  $M_w = 616,49$

Všechny ostatní chemikálie byly použity v čistotě p. a., výrobce Sigma-Aldrich.

### Přístroje

K měření byl použit dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr Unicam-Helios  $\alpha$ . Unicam Instruments, Cambridge, UK.), skleněná kyveta, typ 6030, optická délka 10 mm (HELLMA GmbH & Co, Německo).

Kontrola tlumivých roztoků byla prováděna na pH metru Hanna 213 s elektrodou typu HI 1131 B (Hanna Instruments GmbH, Německo).

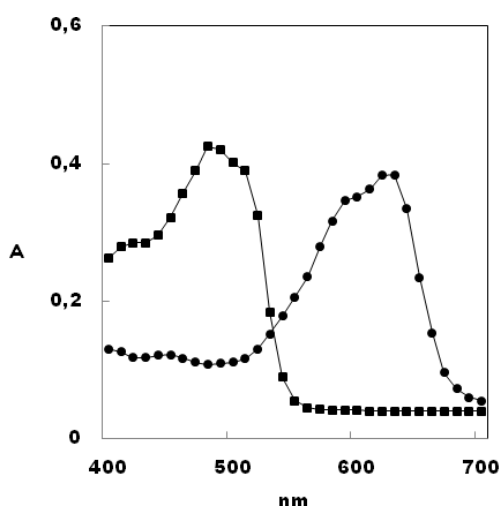
Vzhledem k nízké koncentraci použitých injekčních roztoků byly vzorky lyofilizovány za použití lyofilizátoru Hetosicc Freeze Dryer FD 3, Heto-Holten A/S, Gydevang 17-19, DK – 3450 Allerød, Dánsko.

### Pracovní postup

Do zkumavky bylo pipetováno 2,8 ml pufru o pH v rozmezí 1,1–6, přidáno 0,1 ml vodného roztoku barviva a 0,1 ml fentanylu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$ . Po přidání 3 ml chloroformu byl roztok extrahován třepáním zkumavky po dobu 2 min. Následně byla odsáta vodná vrstva a měřena spektra iontových asociátů v organické fázi proti čistému chloroformu. Z naměřeného spektra byla následně odečtena nejvyšší hodnota absorpce označena jako  $\lambda_{max}$  (cit.<sup>21,22</sup>). Změřené hodnoty maximálních absorpčních vlnových délek iontových asociátů činily 485 nm pro kroceinovou oranž a 626 nm pro amidočerněň.

Pro zjištění závislosti absorpce na hodnotách pH tlumivých roztoků bylo pipetováno 2,8 ml tlumivého roztoku o pH 1,1–6 po 0,5 jednotkách pH. Při dodržení výše uvedeného postupu pak byla změřena absorpce chloroformového extraktu iontového asociátu při vlnové délce  $\lambda_{max}$ . Ze získaných výsledků byl následně vybrán tlumivý roztok o optimálním pH, tzn. takovém, při jehož použití byly naměřeny nejvyšší hodnoty absorpce vzorku a nejnižší absorpce slepého pokusu. Experiment byl proveden s roztoky analytů o koncentracích  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$ .

Ke zjištění optimální koncentrace barviva byl do zkumavky pipetován vodný roztok barviva o koncentraci v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  s krokem  $0,1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  a doplněn vodou na objem 3 ml. Následně byla změřena chloroformová fáze při  $\lambda_{max}$  pro jednotlivá konkrétní barvi-



Obr. 4. Závislost absorbance činidel na vlnové délce v organickém rozpouštědle chloroformu – kroceinová oranž (■) a amidočerně (●) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$

va. Po vynesení hodnot do grafu byla vybrána koncentrace barviva vykazující nejvyšší hodnotu absorbance.

Kalibrační křivka byla sestavena ze závislosti absorbance na koncentraci analytů. Do zkumavky bylo pipetováno 2,8 ml tlumivého roztoku optimální hodnoty pro každé jednotlivé činidlo, dále 0,1 ml barviva a  $0,01\text{--}0,1 \text{ ml}$  roztoku analytů o koncentraci v rozmezí  $1 \cdot 10^{-4}\text{--}1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ , poté bylo přidáno 3 ml chloroformu a provedena extrakce po dobu 2 min. Po odsátí vodné fáze pak byla změřena absorbance iontového asociátu v chloroformu při optimálním pH.

Složení iontového asociátu v organické fázi bylo zjišťováno z funkční závislosti  $A = f(x/L)$ , kde  $x/L$  je molární

zlomek barviva. Do zkumavek bylo pipetováno 2,8 ml tlumivého roztoku o optimálním pH, následně pipetováno 20–180  $\mu\text{l}$  barviva s krokem 20  $\mu\text{l}$  a doplněno adekvátním množstvím vodného roztoku analytů do objemu 200  $\mu\text{l}$ . Po provedení extrakce a odsátí vodné vrstvy byla proměřena absorbance iontového asociátu v chloroformu a v místě lokálního extrému odečten slučovací poměr<sup>23,24</sup>.

## Výsledky a diskuse

Jak vyplývá z níže uvedených grafů a tabulky, míra selektivity stanovení látek odpovídá rozdílné distribuci iontových asociátů mezi vodnou a organickou fází. Z absorpčního spektra iontových asociátů byla odečtena absorpční maxima extraktů asociátů zkoumaných látek. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

Měřením závislosti absorbance na pH prostředí byly nalezeny optimální podmínky. U jednotlivých zkoumaných opioidů i činidel se tyto podmínky odlišují; pro tvorbu iontových asociátů alfentanilu s použitými činidly se jako nejvhodnější jevílo nejkyselější prostředí o pH 1,1. Ostatní analyty reagovaly v rozmezí pH 1,5–2,5, což je patrné z grafů na obr. 5 a 6.

Pro dané podmínky optimálního pH prostředí a koncentrací použitých činidel byly spočteny parametry kalibrace a ověřena přesnost spektrofotometrického stanovení. Při odpovídajících reakčních podmínkách je možné fentanyl, alfentanil, remifentanil a sufentanil detegovat už ve velmi nízkých koncentracích (viz tab. I).

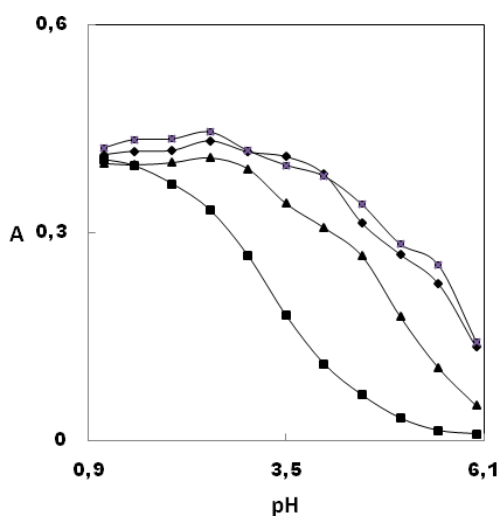
V rámci studovaných analytů byly mezi jednotlivými analyty zjištěny selektivní výsledky při použití barviva amidočerně, u něhož se vyskytují patrně vyšší rozdíly v naměřených hodnotách absorbančí při stejných hodnotách koncentrace. Provedenou metodou kontinuálních variací bylo zjištěno, že dosažené výsledky u činidel amidočerně a kroceinové oranže se výrazně odlišují. Diference výsledků je s nejvyšší pravděpodobností ovlivněna struk-

Tabulka I

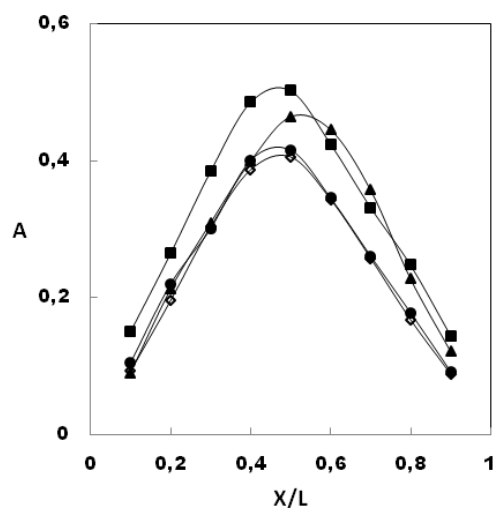
Parametry jednotlivých měření

Analyt/Činidlo/Parametr	$\lambda_{\text{max}}^{\text{a}}$	$\text{pH}_{\text{opt}}^{\text{b}}$	$R^2^{\text{c}}$	$q^{\text{d}}$	$\text{LOD}^{\text{e}}$ [ $\text{mol l}^{-1}$ ]	$\text{LOQ}^{\text{f}}$ [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
I Kroceinová oranž	486	2,5	0,9978	-0,0021	$1,70 \cdot 10^{-5}$	$5,69 \cdot 10^{-5}$
Amidočerně	626	1,5	0,9964	-0,0473	$1,30 \cdot 10^{-5}$	$4,33 \cdot 10^{-5}$
II Kroceinová oranž	485	1,1	0,9967	-0,0012	$1,68 \cdot 10^{-6}$	$5,61 \cdot 10^{-5}$
Amidočerně	626	1,1	0,9919	-0,0197	$2,67 \cdot 10^{-6}$	$8,92 \cdot 10^{-5}$
III Kroceinová oranž	485	2,5	0,9981	-0,0055	$1,73 \cdot 10^{-5}$	$5,77 \cdot 10^{-5}$
Amidočerně	626	1,5	0,9928	-0,0314	$2,37 \cdot 10^{-5}$	$7,93 \cdot 10^{-5}$
IV Kroceinová oranž	486	2,5	0,998	-0,0049	$1,59 \cdot 10^{-5}$	$5,32 \cdot 10^{-5}$
Amidočerně	626	2,5	0,998	-0,0254	$2,07 \cdot 10^{-5}$	$6,91 \cdot 10^{-5}$

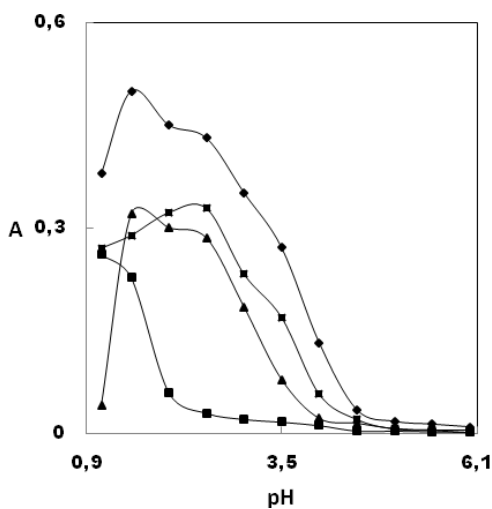
<sup>a</sup>  $\lambda_{\text{max}}$  – maximum vlnové délky, <sup>b</sup> optimální hodnota pH prostředí, <sup>c</sup>  $R^2$  – korelační koeficient, <sup>d</sup>  $q$  – posunutí počátečního bodu kalibrační přímky na ose x, <sup>e</sup> LOD – mez detekce, <sup>f</sup> LOQ – mez stanovitelnosti



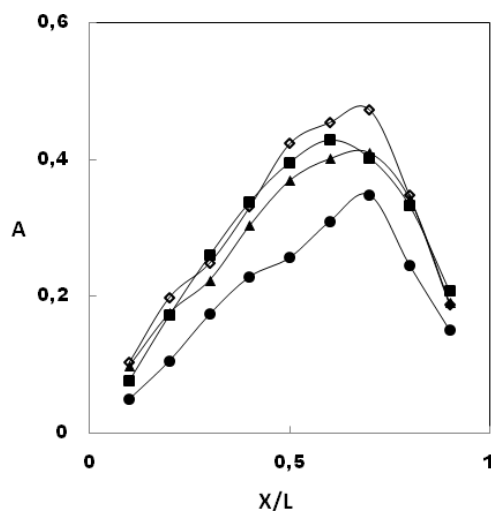
Obr. 5. Závislost absorbance iontového asociátu na pH při použití činidla kroceinová oranž;  $\diamond$  fentanyl,  $\bullet$  alfentanil,  $\blacktriangle$  remifentanil,  $\blacksquare$  sufentanil. Koncentrace analytů i činidel  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$



Obr. 7. Závislost absorbance iontového asociátu na molárním zlomku při použití činidla kroceinová oranž;  $\diamond$  fentanyl,  $\bullet$  alfentanil,  $\blacktriangle$  remifentanil,  $\blacksquare$  sufentanil. Koncentrace analytů i činidel  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$



Obr. 6. Závislost absorbance iontového asociátu na pH při použití činidla amidočerně;  $\diamond$  fentanyl,  $\bullet$  alfentanil,  $\blacktriangle$  remifentanil,  $\blacksquare$  sufentanil. Koncentrace analytů i činidel  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$



Obr. 8. Závislost absorbance iontového asociátu na molárním zlomku při použití činidla amidočerně ( $\diamond$  fentanyl,  $\bullet$  alfentanil,  $\blacktriangle$  remifentanil,  $\blacksquare$  sufentanil). Koncentrace analytů i činidel  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$

turou použitých azobarviv, z nichž amidočerně má ve své molekule vázány dvě sulfonové skupiny (obr. 3). Stechiometrický poměr reakcí analytů a amidočerně činí 2 : 1, zatímco u iontových asociátů analytů s azobarvivem kroceinová oranž byl potvrzen stechiometrický poměr 1 : 1.

## Závěr

Byly nalezeny optimální podmínky tvorby iontových asociátů fentanylu, alfentanilu, remifentanilu a sufentanilu s vybranými azobarvivy kroceinovou oranž a amidočerně

a vypracován postup pro extrakčně spektrofotometrické stanovení zvolených analytů. Detekční limity dokumentují možnost určení zkoumaných látek v řádu  $10^{-5}$  až  $10^{-6}$  mol  $l^{-1}$ . Metoda je využitelná pro přesné a časově nenáročné stanovení daných opioidů.

## LITERATURA

- Haláček E., Koblíha Z.: Chem. Listy 105, 323 (2011).
- Středa L., Patočka J.: Vojenské zdravotnické listy. LXXIII, č. 5–6 (2004).
- Wax P. M., Becker C. E., Curry S. C.: Ann. Emerg. Med. 41, 700 (2003).
- Terrorists seize Moscow theatre, BBC News, 23 October, 2002. Dostupné z URL <http://news.bbc.co.uk/2/hi/europe/2354753.stm>, staženo 13.2.2014.
- Riches R. J., Read W. R., Black M. R., Cooper J. N., Timperley M. C.: Anal. Toxicol. 36, 64 (2012).
- Stanley H. T., Egan D. T., van Aken H.: Anest. Analg. 106, 2 (2008).
- Poklis A.: J. Toxicol. 33, 439 (1995).
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie. 2. vyd., Grada Publishing, Praha 2004.
- Lejčko J.: Neurologie pro praxi. 2006, 141.
- Fricová J., Slíva, J.: Farmakoterapie 7, 19 (2011).
- Mathew J., Kendall K.: U. S. Patent 7,208,604 B2. 2007.
- Lee G. M.: Korean J. Anaesthesiol. 61, 292 (2011).
- Billard V., Servin F. S.: Remifentanil and Other Opioids. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 182, str. 283. Springer Verlag 2008.
- Hess L.: Remedia 2, 263 (1992).
- Český lékopis. Grada, MZ ČR Praha 2002.
- Savoia G., Loreto M., Gravino E.: Minerva Anesthesiol. 67, 206 (2001).
- Kizilkaya M., Yildirim O. S., Dogan N., Kursad H., Okur A.: Anaesth. Analg. (2003). Dostupné z <http://www.anesthesiaanalgesia.org/content/98/4/1062.full?related-urls=yes&legid=anesthanalg;98/4/1062>, staženo 8. 11. 2012.
- Koblíha Z., Haláček E., Souček J.: Patent ČSFR; 277616 (1992).
- Mc Murry J.: Organická chemie. 1. vyd. VUTIUM, Brno 2007.
- Haláček E., Koblíha, Z., Masaříková V.: Průběžná zpráva dílčího výzkumného záměru OOPCHZ za rok 2008. UO, Vyškov 2008.
- Jandera P.: Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. 3 vyd. Univerzita Pardubice, Pardubice 2011.
- Čůta F. a kol.: Instrumentální analýza. 1. vyd. SNTL, Praha 1986.
- Janda J., Koblíha Z., Haláček E.: Metodika spektrofotometrické analýzy vzorků obsahujících fentanyl v převozní polní chemické laboratoři AL- 2/ch. Výzkumná zpráva k projektu specifického výzkumu, 2005.
- Lašková M., Blešová M.: Čes. Slov. Farm. 52, 252 (2003).

**R. Jelínková, E. Haláček, and Z. Koblíha** (NBC, University of Defence, Vyškov, Czech Republic): **Extraction-Spectrophotometric Determination of Fentanyl and Its Derivatives**

Methods of determination of fentanyl, alfentanil, remifentanil and sufentanil were developed based on their ability to form coloured associates with acid dyes which can be extracted chloroform. Crocein Orange and Amido Black dyes produce the 1:1 and 2:1 associates at 485 nm and 626 nm, respectively.