



## **DETERMINATION OF FENTANYL IN HAIR AND URINE OF A PERSON USING TRANSDERMAL PATCHES**

Piotr ADAMOWICZ, Agnieszka SKULSKA

*Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

### **Abstract**

Fentanyl is a synthetic opioid used to treat intense chronic pain. This compound can be administered in the form of transdermal patches (among other ways). This paper describes the analysis of fentanyl in the hair and urine of a patient who had been using the Durogesic transdermal therapeutic system for several years. The materials were sent to the Institute of Forensic Research (IFR) in order to verify the use of opioid analgesics by the man and thus the credibility of his testimony. Collected hair samples of length 4.5 cm allowed us to confirm the use of fentanyl in recent months, while the urine analysis related only to the most recent days. Detection and quantification were carried out using liquid chromatography-mass spectrometry – LC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode for hair and LC-MS in selected ion monitoring (SIM) mode for urine. Limits of detection of both the developed methods were very low: 1 pg/mg and 0.35 ng/ml, respectively. Fentanyl was found in both materials at concentrations of 0.99 and 0.77 ng/mg (two segments of hair), and 8.8 ng/ml (urine). Concentrations of fentanyl in hair were significantly higher than in other reported cases of people using transdermal systems, as a result of long-term use of Durogesic patches.

### **Key words**

Fentanyl; Hair; Determination; LC-MS/MS; LC-MS.

*Received 5 March 2013; accepted 19 April 2013*

### **1. Introduction**

Fentanyl belongs to a group of compounds commonly known as synthetic opiates. It was synthesized for the first time at the end of the 1950s by chemist Paul Janssen. In 1963, fentanyl was introduced into clinical use as an adjunct to anaesthesia and to relieve postoperative pain, and in 1965, Janssen Pharmaceuticals patented a method for the synthesis of fentanyl.

Currently, fentanyl is one of the most commonly used anaesthetics and analgesics in cancer cases. From the mid-1970s, this compound began to be used for intoxication by persons in medical circles (due to easy access), as well as by addicted persons [7]. From 1979, fentanyl derivatives, synthesized in clandestine laboratories, began to appear on the drug market. From 1980 to 1988, 112 deaths caused by fentanyl overdose

were reported in the United States [9]. In the following years (1990–2006) abuse of fentanyl, often fatal, did not stop and spread to other countries, including Canada and Sweden [3, 12, 13, 14, 26]. In addition to poisonings associated with overdoses of products from the illegal drug market, there were also poisonings with pharmaceutical preparations, especially in the form of transdermal patches [6, 7].

The popularity of fentanyl is caused by the fact that this compound acts similarly to morphine and heroin. The only difference is that fentanyl acts 75–125 times more strongly than morphine, and about 10 times more strongly than heroin, and the effects occur much more rapidly. Fentanyl binds to specific opioid receptors. Pharmacological studies and observed effects induced by various opioid drugs indicate the existence of three types of opioid receptors, i.e.  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  receptors. Each

of them is responsible for different opioid-induced effects. And so,  $\mu$  receptors are mainly responsible for the analgesic effect;  $\mu$  and  $\delta$  are responsible for causing respiratory depression and inhibition of intestinal peristalsis;  $\mu$  – for contraction of the pupils, euphoria, and physical dependence;  $\kappa$  – for dysphoria; and  $\mu$  and  $\kappa$  for sedation. Fentanyl is a pure agonist, i.e. it has a high affinity to the  $\mu$  receptors and low affinity to the  $\delta$  and  $\kappa$  receptors. Therefore, it has very strong analgesic activity [19, 24].

The most significant adverse effects of fentanyl include, among others: respiratory depression leading to apnoea, which is dose-dependent, and also causing the phenomenon of tolerance and physical dependence. This compound can also cause muscle stiffness, dizziness, drowsiness, nausea and vomiting.

The effects of fentanyl after intravenous administration appear rapidly. The maximum anaesthetic activity occurs within a few minutes, and after a single dose of up to 100  $\mu\text{g}$ , the duration of anaesthesia is 30–60 min. Its stronger and faster analgesic action than that of morphine is the result of better solubility in lipids and easier penetration through the blood-brain barrier. However, the short duration of a single dose is due to rapid redistribution of fentanyl to the muscles, fat, and lungs. Then the drug undergoes slow redistribution from tissues into the bloodstream. Repeated doses or continuous infusion lead to a gradual saturation of the tissues, which results in the plasma concentration not decreasing rapidly and can lead to considerable accumulation of the drug, which in turn may result in longer duration of the symptoms. Studies have shown a good correlation between the pharmacological effect and the concentration of fentanyl in plasma. Fentanyl is well absorbed through the skin and therefore it can be applied in the form of transdermal patches [5, 17]. Patches applied transdermally cause fentanyl to enter directly into the systemic circulation, which means it does not undergo the first-pass effect, which in turn reduces possible side effects. Durogesic patches, first used commercially in the 1990s, are indicated for the treatment of chronic pain and pain resistant to treatment. Patches provide a supply of continuous fentanyl dose to the systemic circulation for three days. The rate of fentanyl release per hour (12, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}$ ) depends on the size of the patch, i.e. the surface area of contact with the skin (from 5.25  $\text{cm}^2$  to 42  $\text{cm}^2$ ). Therapeutic concentrations of fentanyl in plasma are reached within 12 hours of patch application. An analgesic effect can only be expected after this time. However, a steady state of fentanyl in serum is reached after about 36–48 h [8, 18].

Fentanyl is excreted unchanged in urine (less than 10% of the dose) and as metabolites: 26–55% as norfentanyl, and the rest as hydroxyfentanyl and hydroxynorfentanyl. 85% of the dose emerges in the urine and feces in the form of inactive metabolites within 72 h [10, 17, 28].

Currently, the most commonly used methods for the determination of fentanyl in biological material are coupled techniques. Most of the published methods for the determination of fentanyl, particularly in urine, are based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [1, 30, 33] and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) techniques [25, 31].

## 2. Case history

Biological material in the form of hair (length 4.5 cm) and urine samples collected from a 34 year old man were sent to the Institute of Forensic Research (IFR) in order to verify his statements. Because of the diagnosed disease (chronic pain syndrome), the man had been prescribed Durogesic patches 25–100  $\mu\text{g}/\text{h}$  and Sevredol tablets 20 mg for 12 years. He claimed that 8 years ago he had stopped using Sevredol containing morphine, and had used only Durogesic patches since then.

## 3. Material and methods

### 3.1. Biological material

Control hair and control urine samples (free from the analytes) used for the development of the method were collected from persons not using drugs, including fentanyl and morphine. Urine was stored at +4°C before the analysis.

### 3.2. Chemicals

Fentanyl and fentanyl- $d_5$  were purchased from LGC Standards (Dziekanów Leśny, Poland). HPLC-grade acetonitrile (MeCN), methanol, diethyl ether and formic acid, 98–100%, from Merck (Warsaw, Poland), and isopropyl alcohol from Chempur (Piekary Śląskie, Poland).

### 3.3. Sample preparation

#### 3.3.1. Hair

First, hair was washed successively: with 2 ml of isopropanol for 15 min, three times with 2 ml of phos-

phate buffer pH 7.4 for 15 min, and again with 2 ml of isopropanol for 15 min, after which it was dried. The final obtained rinse was secured for further study in order to verify possible external contamination. Hairs of about 4.5 cm length were divided into two segments (marked as I and II), counting from the hair root. The segments were ground separately in a ball mill. The hair samples (10 mg) were placed in Eppendorf vials and 0.4 ml of 25 mM formic acid was added, followed by the internal standard (IS), fentanyl- $d_5$ , to obtain a concentration of 0.05 ng/mg. Hair samples were then incubated for 18 h at 37°C. After cooling, the samples were centrifuged, and then 100  $\mu$ l of supernatants were transferred to autosampler vial inserts.

### 3.3.2. Urine

IS-fentanyl- $d_5$  was added to the urine samples (0.5 ml) in Eppendorf vials to obtain a concentration of 100 ng/ml. Then, 0.5 ml of carbonate buffer (pH 11) and 1 ml of diethyl ether were added to the urine. Samples were shaken for 15 min, then centrifuged for 5 min at 13,000 rpm, and then the organic phase (800  $\mu$ l) was transferred to glass vials. The organic phase was evaporated to dryness at 37°C. The dry residue was dissolved in 100  $\mu$ l of MeCN and water mixture (1:1, v/v) with addition of formic acid in an amount of 1 ml/l phase, and then transferred to autosampler vial inserts.

## 3.4. Apparatus and analysis conditions

### 3.4.1. Hair

Supernatants from hair samples, and the final concentrated rinse obtained after hair washing were analysed by the liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique (LC-MS/MS). An Agilent Technologies 1200 Series liquid chromatograph coupled to a 6460 Triple Quad mass spectrometer was used for analysis. Separation was performed on a LiChroCART (125  $\times$  2 mm) column packed with Superspher 60 RP select B (Merck) maintained at 25°C. The mobile phase flowing through the column at 0.3 ml/min was a mixture of MeCN and water with addition of formic acid in an amount of 1 ml/l phase. The following gradient program was used: 0 min – 20% MeCN, 10 min – 90% MeCN, 12 min – 20% MeCN, 18 min – 20% MeCN. The injection volume was 10  $\mu$ l, and the total analysis time was 18 min. Retention time (RT) of fentanyl was 9.22 min. Multiple reaction monitoring (MRM) of positive ions ( $m/z$ ) was used for fentanyl: **337.2**→**188.1**; 337.2→105.1; 337.2→103.1 and for

fentanyl- $d_5$ : **342.3**→**188.1**; 342.3→105.1 (transitions for quantitative analysis are shown in bold). Mass detector parameters were as follows: capillary voltage – 3500 V, gas flow (nitrogen) – 5 l/min and its temperature – 280°C, sheath gas flow – 10 l/min and its temperature – 325°C, nebulizer pressure – 40 psi, dwell times – 200 ms. Fragmentor voltage for fentanyl was 145 V, and for fentanyl- $d_5$  – 128 V. The collision energies [V] for fentanyl and fentanyl- $d_5$  transitions were 20, 36, 60 and 16, 36, respectively. Data collection and results analysis were conducted using MassHunter software version B.02.01 (Agilent Technologies).

The chromatograms of monitored transitions (MRM) for the analysed compounds are shown in Figure 1.

### 3.4.2. Urine

Urine analysis was conducted using a liquid chromatograph coupled with a mass spectrometer 1100 Series (LC-MS) from Agilent Technologies operating in electrospray ionization (ESI) mode. Separation was achieved on a LiChroCART (125  $\times$  3 mm) column packed with Purospher RP-18e (Merck) thermostated at 25°C. The mobile phase flowing through the column at 0.8 ml/min consisted of a mixture of 0.1% (v/v) formic acid in MeCN and water. The following gradient program was used: 0 min – 10% MeCN, 10 min – 45% MeCN, 15 min – 90% MeCN, 16 min – 10% MeCN, 20 min – 10% MeCN. The injection volume was 10  $\mu$ l, and the total analysis time was 20 min. The retention time of fentanyl was 6.79 min. Selected pseudomolecular ions (SIM) were monitored ( $m/z$ ): 337 for fentanyl and 342 for fentanyl- $d_5$ . The mass detector operating in positive ionization mode, worked under the following conditions: fragmentor voltage – 60 V, capillary voltage – 3500 V, drying gas flow – 13 l/min, drying gas temperature – 300°C, nebulizer pressure – 30 psi, dwell times – 78 ms. Data collection and results analysis were conducted using HP LC/MSD ChemStation version A.06.03 (Agilent Technologies).

Chromatograms of monitored ions (SIM) for the analysed compounds are shown in Figure 2.

## 3.5. Method validation

The LC-MS/MS method for the determination of fentanyl in hair was validated. A six-point calibration curve (0; 0.01; 0.05; 0.25; 1.0 and 2.5 ng/mg) was linear in the whole range. The coefficient of determination ( $R^2$ ) was 0.9998, and the limit of detection ( $LOD$ ), which was established for the concentration producing

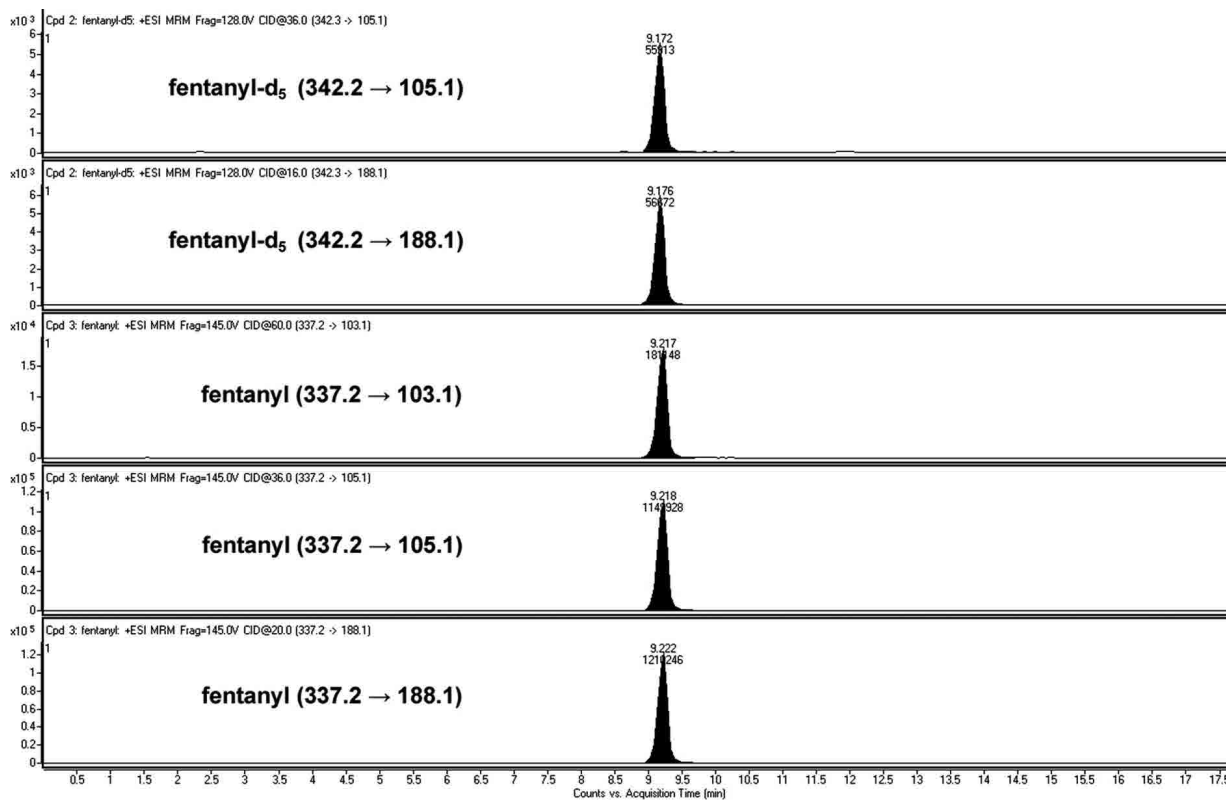


Fig. 1. MRM chromatograms of the hair sample (LC-MS/MS).

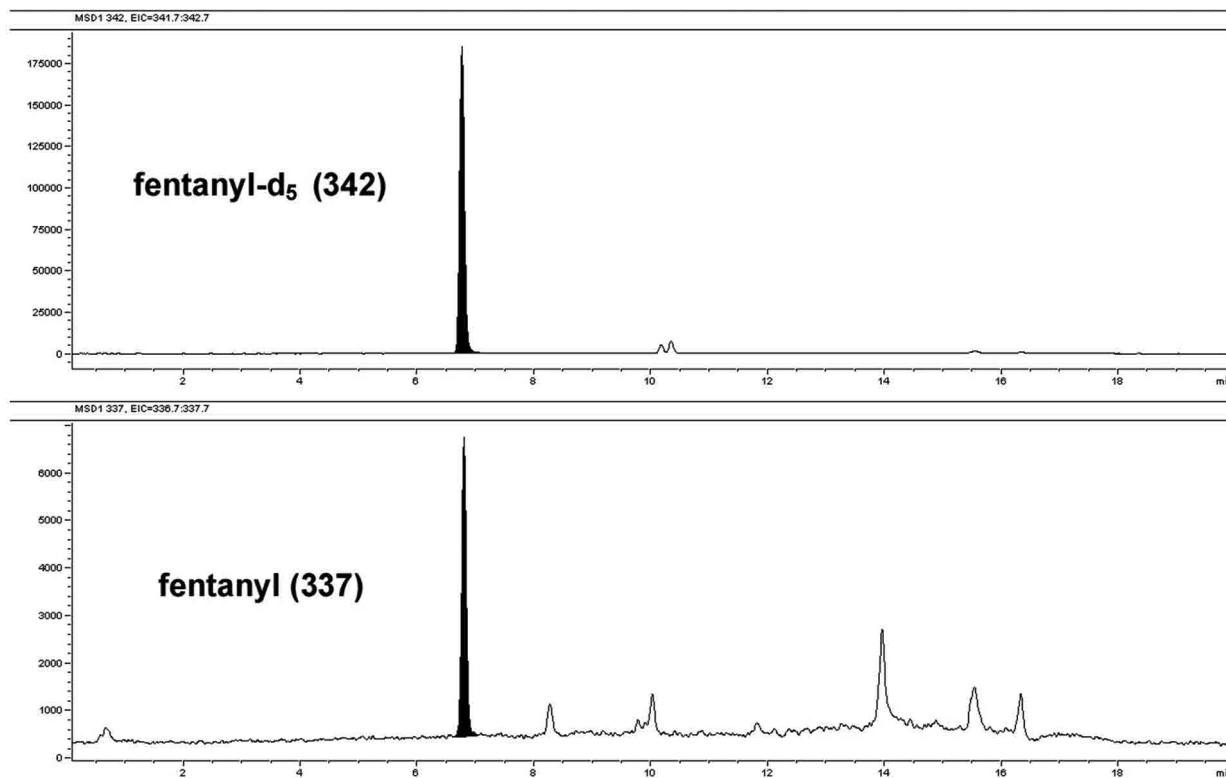


Fig. 2. SIM chromatograms of the urine sample (LC-MS).

a detector signal ( $S$ ) three times larger than the noise signal ( $N$ ), so for  $S/N=3$ , for the least intense ion transition ( $m/z$ ) 337.2 $\rightarrow$ 103.1, was determined as 1 pg/mg. The limit of quantification ( $LOQ$ ) was assumed to be the lowest point on the calibration curve (0.01 ng/mg). The specificity of the method was determined by analysing hair samples collected from five subjects not using fentanyl.

The LC-MS method for the determination of fentanyl in urine was also validated. An eight-point calibration curve (2.5; 5; 10; 15; 20; 30; 40 and 50 ng/ml) was prepared. Three repetitions were performed for each level of concentration. The  $R^2$  coefficient was 0.9948. The  $LOD$  for  $S/N=3$  was 0.35 ng/ml and  $LOQ$  was assumed to be the lowest point on the calibration curve (2.5 ng/ml). Extraction of 10 control urine samples taken from people who had not used fentanyl was also carried out. There were no interfering peaks from the biological matrix on chromatograms of urine extracts.

#### 4. Results and discussion

Hair is practically the only material which gives the possibility of confirmation of xenobiotic use in the relatively distant past (which is dependent on the length of the hair of the subject), even when a few months have elapsed from administration to collection, especially in cases of persons using medicines or drugs of abuse regularly. This material can be divided into segments corresponding to time slots and in this way the approximate time elapsed since xenobiotic use can be determined, and therefore, the approximate period when it was taken. Hair as a biological material has many advantages as compared to other biological materials. Firstly, its collection is non-invasive; secondly, it can be stored for long periods at room temperature.

In the presented case, the small amount of hair meant that it could only be divided into two segments, in which fentanyl was detected at concentrations of: 0.99 ng/mg (segment I from the roots) and 0.77 ng/mg (segment II). In the rinse obtained after hair washing, fentanyl was not present, which indicates that it was not from external contamination, but was built into the structure of the hair. Hair analysis for the presence of fentanyl has been the subject of very few papers, but in most cases the determined concentrations were lower than in the discussed case. The reports concerned both patients receiving fentanyl during anaesthesia and persons abusing the drug. Fentanyl in hair was determined for the first time by Wang and co-workers at the beginning of the 1990s [32]. Hair samples from patients who had received fentanyl during an-

aesthesia were analysed by the enzyme immunoassay method. In the hair of 13 patients who had received a dose of 1–6 mg, the xenobiotic was revealed at concentrations of 0.013–0.048 ng/mg. In 1995, Selavka et al. [22] showed fentanyl in hair at a concentration of 0.02 ng/mg. Sachs et al. [20] analysed by GC-MS/MS fentanyl in the hair of a person who had administered the xenobiotic transdermally for 25 days. The total dose was 15 mg and a concentration of 0.1 ng/mg was determined. Schneider et al. [21] reported a case of a patient receiving fentanyl transdermally (25  $\mu$ g/h) for 22 days. Although five one-centimetre segments were analysed, of which only one corresponded to the period of fentanyl administration, the presence of this compound was shown in four segments. Fentanyl concentrations determined by LC-MS/MS were in the range of 0.06–0.48 ng/mg, with the highest concentrations found in the segment corresponding to the month of therapy. Kintz et al. [11] analysed hair collected from several anaesthesiologists and a nurse addicted to fentanyl. Fentanyl was determined by GC-MS/MS after derivatization. The concentrations ranged from 0.008 to 0.644 ng/mg. In turn, LeBeau et al. [11] analysed by LC-MS/MS, the hair of an addicted nurse and showed fentanyl at concentrations of 0.020–0.093 ng/mg. Higher concentrations of fentanyl than in the case discussed here have been reported only in a few cases described in the literature. Mushoff et al. analysed opioid analgesics in the hair of people receiving palliative care. They showed fentanyl at concentrations of 0.013–1.787 ng/mg (mean 0.481) in 17 cases [16]. The highest concentration – 1.930 ng/mg – was determined by Moore et al. [15]. Both this hair sample and three others (in which concentrations were 0.012, 0.017 and 0.490 ng/mg) were obtained from cadavers.

Among the above-described cases, only three related to the analysis of hair of persons that had received fentanyl transdermally [21, 22, 29]. In two cases, it was known that patients had used patches for a period of 22–25 days, and the total dose received in that period was 13.2–15 mg. The use of fentanyl in that way resulted in concentrations of up to 0.48 ng/mg of hair. Concentrations of fentanyl in the hair of the man demonstrated in the present study were significantly higher (0.99 and 0.77 ng/mg), which was the result of long-term use of transdermal patches. The analysed segments were hair sections of 2 cm each. Taking into account the average rate of hair growth (about 1 cm per month) and the length of collected hair (about 4.5 cm), it can be concluded that the man had used fentanyl in the last four months. From the obtained information, it is known that he used the Durogesic transdermal

system for 12 years, and recently patches containing fentanyl 25 µg/h. It can therefore be estimated that in the last four months the total dose of administered fentanyl exceed 70 mg, which explains the very high concentrations revealed in the hair.

The developed method for the determination of fentanyl in hair is characterized by a very low limit of quantification. Most authors used significantly larger hair samples for analysis, from 20 to 100 mg [11, 16, 21, 22]. Very few authors used smaller sample aliquots of 10 mg [15]. In the developed method, an *LOD* of 1 pg/mg was achieved using only 10 mg hair samples. It should be noted that this value was calculated for the least intense MRM transition. For the two other, more intense MRM transitions, the concentrations characterized by *S/N*=3 were much lower: for 337.2→105.1 and 337.2→188.1 – 0.3 pg/mg and 0.1 pg/mg, respectively. Although the analysed case concerned prolonged use of fentanyl, and the determined concentrations of this compound were high, it can be stated that the developed method is also useful for the analysis of hair in cases of short-term use (or even single use) of fentanyl, where lower concentrations are expected.

Urine is a material which is suitable for toxicological analysis up to several days after xenobiotic use. Determined concentrations of analytes in this material are difficult to interpret in relation to the assessment of the severity of intoxication and the time of exposure to the xenobiotic. After administration of the fentanyl, its main metabolite, norfentanyl, is often determined in the urine [23]. After administration of fentanyl in a dose of 50–100 µg, norfentanyl was detected in urine at concentrations of 0.2 to 0.3 ng/ml for 72 h and fentanyl was detected up to 24 h after administration [2, 5]. In the urine of the man in the presented case, fentanyl was detected at a concentration of 8.8 ng/ml. Although less than 10% of the parent compound is excreted in the urine, the urine was analysed only for this compound, because it was sufficient to confirm its recent use. The fentanyl concentrations in urine described in the literature were in the range from 0.2 to 449 ng/ml; of which in patients using transdermal systems, concentrations were in the range 48–159 ng/ml [2, 23]. In urine samples taken from deceased persons who had administered fentanyl percutaneously, the concentrations ranged from 2.9 to 895 ng/ml [1, 13]. Coopman et al. [4] reported a case of suicidal poisoning with fentanyl in a 78-year-old woman as a result of application on the body of 10 Durogesic 100 µg/h patches. The concentration of fentanyl established in the urine was 283 ng/ml.

The hair and urine analyses conducted in the present case allowed us to authenticate the testimony

of the male. Analysis of urine alone would not have given a complete picture of the used drugs, because the results would have related only to the most recent days. Fentanyl can be detected in urine only for 48–72 h after administration of large doses [27].

The hair of the man was also screened for a wide range of drugs and medicines using other LC-MS and LC-MS/MS methods, in accordance with the procedures of the Laboratory of Toxicological Analyses IFR. As a result of these analyses, it was also found that the man did not use preparations containing morphine. Due to the length of the collected hair, corresponding to a time period of up to four months, we could not comment about the possibility of administration of medications and drugs in a period further back than about five months prior to the collection of the hair sample.

## 5. Summary

Conducted analyses of hair and urine allowed us to authenticate the testimony of the man and confirmed the use of fentanyl over a long period of time. The concentrations of fentanyl determined in hair were significantly higher than in other reported cases of people using transdermal systems, which was the result of long-term use of Durogesic patches, and thus the introduction of a higher dose into the body.

The developed methods of detection and determination of fentanyl in hair and urine can be successfully applied to the analysis of material taken from people who are suspected of using fentanyl. The very low *LOD* of fentanyl in hair may allow the detection of this compound even after its single use.

## References

1. Anderson D. T., Muto J. J., Duragesic transdermal patch: postmortem tissue distribution of fentanyl in 25 cases, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 627–634.
2. Baselt R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Biomedical Publications, Foster City 2011.
3. Chaturvedi A. K., Rao N. G. S., A death due to self-administered fentanyl, *Journal of Analytical Toxicology* 1990, 14, 385–387.
4. Coopman V., Cordonnier J., Pien K. [et al.], LC-MS/MS analysis of fentanyl and norfentanyl in a fatality due to application of multiple Durogesic transdermal therapeutic systems, *Forensic Science International* 2007, 169, 223–227.
5. Drug information, AHFS [<http://www.ahfsdruginformation.com> (accessed February, 25, 2013)].

6. Edinboro L. E., Poklis A., Trautman D. [et al.], Fatal fentanyl intoxication following excessive transdermal application, *Journal of Forensic Sciences* 1997, 42, 741–743.
7. Flannagan L. M., Butts J. D., Anderson W. H., Fentanyl patches left on dead bodies-potential source of drug for abusers, *Journal of Forensic Sciences* 1996, 41, 320–321.
8. Grond S., Radbruch L., Lehmann K. A., Clinical pharmacokinetics of transdermal opioids. Focus on transdermal fentanyl, *Clinical Pharmacokinetics* 2000, 38, 59–89.
9. Henderson G. L., Fentanyl-related deaths: demographics, circumstances, and toxicology of 112 cases, *Journal of Forensic Sciences* 1991, 36, 422–433.
10. Hess R., Stiebler G., Herz A., Pharmacokinetics of fentanyl in man and the rabbit, *European Journal of Clinical Pharmacology* 1972, 4, 137–141.
11. Kintz P., Villain M., Dumestre V. [et al.], Evidence of addiction by anesthesiologists as documented by hair analysis, *Forensic Science International* 2005, 153, 81–84.
12. Kronstrand R., Druid H., Holmgren P. [et al.], A cluster of fentanyl-related deaths among drug addicts in Sweden, *Forensic Science International* 1997, 88, 185–195.
13. Kuhlman J. J., McCaulley R., Valouch T. J. [et al.], Fentanyl use, misuse, and abuse: a summary of 23 postmortem cases, *Journal of Analytical Toxicology* 2003, 27, 499–504.
14. Martin T. L., Woodall K. L., McLellan B. A., Fentanyl-related deaths in Ontario, Canada: toxicological findings and circumstances of death in 112 cases (2002–2004), *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 603–610.
15. Moore C., Marinetti L., Coulter C. [et al.], Analysis of pain management drugs, specifically fentanyl, in hair: application to forensic specimens, *Forensic Science International* 2008, 176, 47–50.
16. Musshoff F., Lachenmeier K., Trafkowski J. [et al.], Determination of opioid analgesics in hair samples using liquid chromatography/tandem mass spectrometry and application to patients under palliative care, *Therapeutic Drug Monitoring* 2007, 29, 655–661.
17. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A., *Leki współczesnej terapii*, Wydawnictwo Split Trading Sp. z o.o., Warszawa 2007.
18. Radovanović D., Pjević M., Malbaša Z. [et al.], The use of transdermal fentanyl in the treatment of cancer pain, *Archive of Oncology* 2002, 10, 263–266.
19. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., *Farmakologia kliniczna*, Wydawnictwo Czelej, Lublin 2001.
20. Sachs H., Uhl M., Hege-Scheuing G. [et al.], Analysis of fentanyl and sufentanil in hair by GC/MS/MS, *International Journal of Legal Medicine* 1996, 109, 213–215.
21. Schneider S., Ait-M-Bark Z., Schummer C. [et al.], Determination of fentanyl in sweat and hair of a patient using transdermal patches, *Journal of Analytical Toxicology* 2008, 32, 260–264.
22. Selavka C. M., Mason A. P., Riker C. D. [et al.], Determination of fentanyl in hair: the case of the crooked criminalist, *Journal of Forensic Sciences* 1995, 40, 681–685.
23. Silverstein J. H., Rieders M. F., McMullin M. [et al.], An analysis of the duration of fentanyl and its metabolites in urine and saliva, *Anesthesia and Analgesia* 1993, 76, 618–621.
24. Skulska A., Kała M., Consequences of medical and non-medical use of atropine and fentanyl analogues, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 71, 303–312.
25. Skulska A., Kała M., Adamowicz P. [et al.], Determination of fentanyl, atropine and scopolamine in biological material using LC-MS/APCI methods, *Przegląd Lekarski* 2007, 64, 263–267.
26. Smialek J. E., Levine B., Chin L. [et al.], A fentanyl epidemic in Maryland 1992, *Journal of Forensic Sciences* 1994, 39, 159–164.
27. Stout P. R., Claffey D. J., Ruth J. A., Fentanyl in hair. Chemical factors involved in accumulation and retention of fentanyl in hair after external exposure or in vivo deposition, *Drug metabolism and disposition* 1998, 26, 689–700.
28. Tateishi T., Wood A. J. J., Guengerich F. P. [et al.], Biotransformation of tritiated fentanyl in human liver microsomes, *Biochemical Pharmacology* 1995, 50, 1921–1924.
29. Uhl M., Determination of drugs in hair using GC/MS/MS, *Forensic Science International* 1997, 84, 281–294.
30. Van Nimmen N. F. J., Poels K. L. C., Veulemans H. A. F., Highly sensitive gas chromatographic-mass spectrometric screening method for the determination of picogram levels of fentanyl, sufentanil and alfentanil and their major metabolites in urine of opioid exposed workers, *Journal of Chromatography B* 2004, 804, 375–387.
31. Wang L., Bernert J. T., Analysis of 13 fentanils, including sufentanil and carfentanil, in human urine by liquid chromatography-atmospheric-pressure ionization-tandem mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 30, 335–341.
32. Wang W. L., Cone E. J., Zacny J., Immunoassay evidence for fentanyl in hair of surgery patients, *Forensic Science International* 1993, 61, 65–72.
33. Watts V. W., Caplan Y. H., Evaluation of the coat-a-count <sup>125</sup>I fentanyl RIA: comparison of <sup>125</sup>I RIA and GC/MS-SIM for quantification of fentanyl in case urine specimens, *Journal of Analytical Toxicology* 1990, 14, 266–272.

---

**Corresponding author**

Dr Piotr Adamowicz  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: padamowicz@ies.krakow.pl

---

## OZNACZANIE FENTANYLU WE WŁOSACH I MOCZU U OSOBY STOSUJĄCEJ PŁASTRY PRZEZSKÓRNE

### 1. Wstęp

Fentanyl jest zaliczany do grupy związków potocznie nazywanych syntetycznymi opiatami. Został on zsyntetyzowany po raz pierwszy pod koniec lat 50. ubiegłego stulecia przez chemika Paula Janssena. W 1963 roku fentanyl wprowadzono do stosowania klinicznego jako dodatek do operacyjnych znieczuleń i łagodzenia bólu pooperacyjnego, a w 1965 roku firma Janssen Pharmaceutica opatentowała metodę syntezy fentanylu.

Obecnie fentanyl jest jednym z najczęściej stosowanych leków znieczulających i łagodzących ból w chorobach nowotworowych. Od połowy lat 70. ubiegłego stulecia związek ten zaczął być wykorzystywany do odurzania się przez osoby z kręgów medycznych (ze względu na łatwy dostęp), a także przez osoby uzależnione [7]. Od 1979 roku pochodne fentanylu, syntetyzowane w nielegalnych laboratoriach, zaczęły się pojawiać na rynku narkotykowym. Od 1980 do 1988 roku w Stanach Zjednoczonych odnotowano 112 zgonów, których przyczyną było przedawkowanie fentanylu [9]. W następnych latach (1990–2006) praktyki nadużywania fentanylu, często kończące się zgonem, nie zostały zarzucone i rozprzestrzeniły się na inne kraje, m.in. Kanadę i Szwecję [3, 12, 13, 14, 26]. Oprócz zatruc związanych z przedawkowaniem produktów pochodzących z rynku narkotykowego zdarzały się również zatrucia preparatami farmaceutycznymi, szczególnie w postaci plastrów przezskórnych [6, 7].

Popularność fentanylu jest spowodowana tym, że związek ten działa podobnie jak morfina czy heroina. Różnica polega jedynie na tym, że fentanyl może działać 75–125 razy silniej niż morfina i około 10 razy silniej niż heroina, a efekty działania pojawiają się znacznie szybciej. Fentanyl wiąże się ze specyficznymi receptorami opioidowymi. Badania farmakologiczne i zaobserwowane efekty działania wywoływane przez różne leki opioidowe wskazują na istnienie trzech typów receptorów opioidowych, tj. receptorów  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$ . Każdy z nich odpowiada za różne wywoływane efekty działania opioidów. I tak za działanie przeciwbólowe w głównej mierze odpowiadają receptory  $\mu$ ; za wywoływanie depresji oddechowej i hamowanie perystaltyki jelit odpowiadają  $\mu$  i  $\delta$ ; za skurcz źrenic, euforię i zależność fizyczną –  $\mu$ , dysfориę –  $\kappa$ , a za sedację  $\mu$  i  $\kappa$ . Fentanyl jest czystym agonistą, tzn. charakteryzuje się dużym powinowactwem do receptorów  $\mu$  i małym powinowactwem do receptorów  $\delta$  i  $\kappa$ . W związku z tym wykazuje bardzo silne działanie przeciwbólowe [19, 24].

Do najbardziej istotnych efektów niepożądanego działania fentanylu należy m.in. depresja oddechowa prowadząca do bezdechu, która jest zależna od dawki, a także wywoływanie zjawiska tolerancji oraz zależności fizycznej. Związek ten może także powodować zeszytwnienie mięśni, zawroty głowy, senność, nudności i wymioty.

Efekty działania fentanylu po podaniu dożylnym pojawiają się szybko. Maksymalne działanie znieczulające występującego po kilku minutach, a czas trwania znieczulenia, po podaniu pojedynczej dawki wynoszącej do 100  $\mu\text{g}$ , wynosi 30–60 min. Jego silniejsze i szybsze działanie przeciwbólowe niż morfiny jest wynikiem lepszej rozpuszczalności w lipidach i łatwiejszego przenikania przez barierę krew-mózg. Natomiast krótki okres działania pojedynczej dawki jest spowodowany szybką redystrybucją fentanylu do mięśni, tkanki tłuszczowej oraz płuc. Następnie z tkanek lek ulega powolnej redystrybucji do krwiobiegu. Powtarzanie dawek lub ciągły wlew prowadzi do stopniowego wysycenia tkanek, co powoduje, że stężenie w osoczu nie maleje gwałtownie i może prowadzić do znacznej kumulacji leku, co z kolei może skutkować dłuższym czasem występowania objawów. Badania wykazały istnienie dobrej korelacji pomiędzy działaniem farmakologicznym a stężeniem fentanylu w osoczu. Fentanyl dobrze wchłania się przez skórę, dlatego też może być stosowany w postaci plastrów przezskórnych [5, 17]. Plastry stosowane przezskórnie powodują, że fentanyl dostaje się bezpośrednio do krążenia ogólnego przez co nie ulega efektowi pierwszego przejścia, co z kolei redukuje możliwe skutki uboczne. Plastry Durogesic, pierwszy raz komercyjnie zastosowane w latach 90. ubiegłego wieku, wskazane są w leczeniu bólu przewlekłego oraz bólu opornego na leczenie. Plastry zapewniają dostarczanie do krążenia ogólnego ciągłej dawki fentanylu przez trzy dni. Szybkość uwalniania fentanylu w ciągu godziny (12, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}$ ) zależy od wielkości plastra, tj. od powierzchni kontaktu ze skórą (od 5,25  $\text{cm}^2$  do 42  $\text{cm}^2$ ). Stężenie terapeutyczne fentanylu w surowicy jest osiągnięte w ciągu 12 h od chwili naklejenia plastra. Dopiero po tym czasie można się spodziewać efektu analgetycznego. Natomiast stały poziom fentanylu osiągnięty jest w surowicy po ok. 36–48 h [8, 18].

Fentanyl jest wydalany z moczem w postaci niezmienionej (mniej niż 10% dawki) i w postaci metabolitów: 26–55% jako norfentanyl, pozostała część jako hydroksyfentanyl i hydroksynorfentanyl. W ciągu 72 h 85% podanej dawki pojawia się w moczu i kale w postaci nieaktywnych metabolitów [10, 17, 28].



Obecnie do najczęściej stosowanych metod oznaczania fentanylu w materiale biologicznym należą techniki łączone. Większość opisanych metod oznaczania fentanylu, zwłaszcza w moczu, bazuje na technikach chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) [1, 30, 33] oraz technikach chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS) [25, 31].

## 2. Opis przypadku

Materiał biologiczny w postaci prób włosów (o długości 4,5 cm) i moczu pobranych od 34-letniego mężczyzny nadesłano do Instytutu Ekspertyz Sądowych (IES) w celu zweryfikowania jego zeznań. Mężczyzna, ze względu na zdiagnozowane schorzenie (przewlekły zespół bólowy), miał przepisywane od 12 lat plastry Durogesic 25–100 µg/h oraz tabletki Sevredol 20 mg. Twierdził, że od 8 lat stosuje tylko plastry Durogesic, nie przyjmuje natomiast leku Sevredol zawierającego morfinę.

## 3. Materiał i metody

### 3.1. Materiał biologiczny

Włosy kontrolne oraz próby moczu kontrolnego (wolne od analitów) stosowane do opracowania metody pochodziły od osób nieprzyjmujących leków, w tym fentanylu i morfiny. Mocz do czasu analizy był przechowywany w temperaturze +4°C.

### 3.2. Odczynniki

Fentanyl i fentanyl- $d_5$  pochodziły z firmy LGC Standards (Dziekanów Leśny, Polska). Acetonitryl (MeCN) o czystości do HPLC, metanol, eter dietylowy i kwas mrówkowy 98–100% z firmy Merck (Warszawa, Polska), a alkohol izopropylowy z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska).

### 3.3. Przygotowanie materiału do badań

#### 3.3.1. Włosy

W pierwszej kolejności włosy poddano myciu, kolejno: 2 ml izopropanolu przez 15 min, trzykrotnie 2 ml porcjami buforu fosforanowego o pH 7,4 przez 15 min oraz ponownie 2 ml izopropanolu przez 15 min, po czym je wysuszono. Ostatnie uzyskane popłuczyny zabezpieczono do dalszych badań w celu weryfikacji ewentualnej zewnętrznej kontaminacji. Włosy o długości około 4,5 cm podzielono na dwa segmenty (oznaczone jako I i II), licząc od cebulek włosów. Segmenty zmielono oddzielnie w młynku kulowym. Do próbek włosów (10 mg)

umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano 0,4 ml 25 mM roztworu kwasu mrówkowego, a następnie wzręczec wewnętrzny (IS) fentanyl- $d_5$ , aby osiągnąć stężenie wynoszące 0,05 ng/mg. Następnie próbki włosów inkubowano przez 18 h w temperaturze 37°C. Po ostudzeniu próbki odwirowano, a następnie 100 µl supernatantów przenoszono do wkładek fiolek do automatycznego podajnika próbek.

#### 3.3.2. Mocz

Do prób moczu (0,5 ml) umieszczonych we fiolkach Eppendorfa dodawano IS-fentanyl- $d_5$ , aby osiągnąć stężenie 100 ng/ml. Następnie do moczu dodawano 0,5 ml buforu węglanowego (pH 11) oraz 1 ml eteru dietylowego. Próby wytrząsano przez 15 min, a następnie wirowano przez 5 min przy 13 000 obr./min, po czym fazę organiczną (800 µl) przenoszono do szklanych fiolek. Fazę organiczną odparowywano do sucha w temperaturze 37°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µl mieszaniny MeCN i wody (1:1, v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1 ml/l fazy, a następnie przenoszono do wkładek fiolek do automatycznego podajnika próbek.

### 3.4. Aparatura i warunki analizy

#### 3.4.1. Włosy

Supernatanty z próbek włosów, a także ostatnie załężone popłuczyny uzyskane po myciu włosów, analizowano techniką chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Do badań zastosowano chromatograf cieczowy serii 1200 połączony ze spektrometrem mas 6460 Triple Quad firmy Agilent Technologies. Rozdział prowadzono na kolumnie LiChroCART (125 × 2 mm) z wypełnieniem Superspher 60 RP-select B firmy Merck utrzymywanej w temperaturze 25°C. Fazę ruchomą przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,3 ml/min stanowiła mieszanina MeCN i wody z dodatkiem kwasu mrówkowego w ilości 1 ml/l fazy. Zastosowano następujący program gradientowy: 0 min – 20% MeCN, 10 min – 90% MeCN, 12 min – 20% MeCN, 18 min – 20% MeCN. Objętość nastrzyku wynosiła 10 µl, a całkowity czas analizy 18 min. Czas retencji (*RT*) fentanylu wynosił 9,22 min. Monitorowano wybrane przejścia (*MRM*) dodatnich jonów (*m/z*) dla: fentanylu 337,2 → 188,1; 337,2 → 105,1; 337,2 → 103,1 oraz dla fentanylu- $d_5$ : 342,3 → 188,1; 342,3 → 105,1 (przejścia do analizy ilościowej pogrubiono). Parametry detektora masowego wynosiły odpowiednio: napięcie kapilary – 3500 V, przepływ gazu (azot) – 5 l/min i jego temperatura – 280°C, przepływ gazu osłonowego – 10 l/min i jego temperatura – 325°C, ciśnienie nebulizera – 40 psi, czas akwizycji jonów – 200 ms. Napięcie fragmentora dla fentanylu wynosiło 145 V, a dla fentanylu- $d_5$  – 128 V.

Energie kolizji [V] dla przejść fentanylu i fentanylu- $d_5$  wynosiły odpowiednio: 20, 36 i 60 oraz 16 i 36. Zbieranie i analiza danych odbywała się przy zastosowaniu oprogramowania MassHunter w wersji B.02.01 (Agilent Technologies).

Chromatogramy monitorowanych przejść (MRM) dla analizowanych związków przedstawiono na rycinie 1.

### 3.4.2. Mocz

Analizę ekstraktów moczu prowadzono przy zastosowaniu chromatografu cieczowego połączonego ze spektrometrem mas serii 1100 (LC-MS) firmy Agilent Technologies pracującego w trybie jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI). Rozdział uzyskano przy użyciu kolumny LiChroCART (125 × 3 mm) z wypełnieniem Purospher RP-18e firmy Merck utrzymywanej w temperaturze 25°C. Fazę ruchomą przepływającą przez kolumnę z szybkością 0,8 ml/min stanowiła mieszanina 0,1% (v/v) kwasu mrówkowego w MeCN i wody. Zastosowano następujący program gradientowy: 0 min – 10% MeCN, 10 min – 45% MeCN, 15 min – 90% MeCN, 16 min – 10% MeCN, 20 min – 10% MeCN. Objętość nstrzyku wynosiła 10  $\mu$ l, a całkowity czas analizy 20 min. Czas retencji fentanylu wynosił 6,79 min. Monitorowano jony (SIM) pseudomolekularne ( $m/z$ ): dla fentanylu 337 oraz dla fentanylu- $d_5$  342. Detektor mas, rejestrujący w trybie jonizacji dodatniej, pracował w następujących warunkach: napięcie fragmentatora – 60 V, napięcie kapilary – 3500 V, przepływ gazu osuszającego – 13 l/min, temperatura gazu osuszającego – 300°C, ciśnienie nebulizera – 30 psi, czas akwizycji jonów – 78 ms. Zbieranie i analiza danych odbywała się przy zastosowaniu oprogramowania HP LC/MSD ChemStation w wersji A.06.03 (Agilent Technologies).

Chromatogramy monitorowanych jonów (SIM) dla analizowanych związków przedstawiono na rycinie 2.

### 3.5. Walidacja metod

Metoda LC-MS/MS oznaczania fentanylu we włosach została zwalidowana. Sporządzono sześciopunktową krzywą kalibracyjną (0; 0,01; 0,05; 0,25; 1,0 i 2,5 ng/mg), która zachowywała liniowość w pełnym zakresie. Współczynnik determinacji ( $R^2$ ) wynosił 0,9998, a granica detekcji ( $LOD$ ), która została przyjęta dla stężenia wywołującego sygnał detektora ( $S$ ) trzykrotnie większy niż wysokość szumów ( $N$ ), czyli dla  $S/N = 3$ , dla najmniej intensywnego przejścia jonów ( $m/z$ ) 337,2 → 103,1, określona została na 1 pg/mg. Jako granicę oznaczalności ( $LOQ$ ) przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej (0,01 ng/mg). Specyficzność metody określano, analizując próbki włosów pobrane od pięciu osób nieprzyjmujących fentanylu.

Metoda LC-MS oznaczania fentanylu w moczu została również zwalidowana. Sporządzono ośmiopunktową

krzywą kalibracyjną (2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40 i 50 ng/ml). Dla każdego poziomu stężeń wykonano po trzy powtórzenia. Współczynnik  $R^2$  wynosił 0,9948.  $LOD$  dla  $S/N = 3$  wynosiła 0,35 ng/ml, natomiast jako  $LOQ$  przyjęto najniższy punkt krzywej kalibracyjnej (2,5 ng/ml). Przeprowadzono także ekstrakcję 10 kontrolnych prób moczu pobranych od osób, które nie zażywały fentanylu. Na chromatogramach ekstraktów moczu nie zaobserwowano pików interferencyjnych pochodzących od matrycy biologicznej.

## 4. Wyniki i dyskusja

Włosy stanowią praktycznie jedyny materiał, którego badania dają możliwość potwierdzenia przyjęcia ksenobiotyku w odległym czasie, nawet po paru miesiącach (co jest zależne od długości włosa) od pobrania ich do badań, szczególnie w przypadku osób regularnie przyjmujących leki lub środki odurzające. Materiał ten można podzielić na segmenty odpowiadające przedziałom czasowym i w ten sposób określić przybliżony czas, jaki upłynął od przyjęcia ksenobiotyku, a co za tym idzie, także czas, w jakim był on przyjmowany. Włosy jako materiał biologiczny posiadają wiele zalet w stosunku do pozostałych materiałów biologicznych. Po pierwsze, sposób ich pobierania jest nieinwazyjny, po drugie można je przez długi okres przechowywać w temperaturze pokojowej.

W omawianej sprawie niewielka ilość włosów umożliwiła ich podział tylko na dwa segmenty, w których stwierdzono obecność fentanylu w stężeniach odpowiednio: 0,99 ng/mg (segment I licząc od cebulki) i 0,77 ng/mg (segment II). W popłuczynach uzyskanych po myciu włosów nie wykazano obecności fentanylu, co świadczyło, że nie pochodził on z zewnętrznej kontaminacji, lecz został wbudowany w strukturę włosów. Analiza włosów w kierunku fentanylu była przedmiotem nielicznych prac, ale wyznaczone stężenia w większości przypadków były jednak niższe niż w omawianym. Doniesienia dotyczyły zarówno pacjentów otrzymujących fentanyl podczas anestezji, jak i osób nadużywających ten związek. Po raz pierwszy fentanyl we włosach oznaczali Wang i współpracownicy na początku lat 90. dwudziestego wieku [32]. Próbkę włosów pochodzące od pacjentów, którzy otrzymywali fentanyl podczas anestezji, analizowali metodą immunoenzymatyczną. We włosach 13 pacjentów, którym podano dawki 1–6 mg, wykazali ksenobiotyk w stężeniach 0,013–0,048 ng/mg. W 1995 roku Selavka i in. [22] wykazali we włosach fentanyl w stężeniu 0,02 ng/mg. Sachs i in. [20] oznaczali metodą GC-MS/MS fentanyl we włosach osoby, która przez 25 dni przyjmowała ksenobiotyk drogą przezskórną. Łączna dawka wynosiła 15 mg, a wyznaczone stężenie 0,1 ng/mg. Schneider i in. [21] opisali przypadek pacjenta przyjmującego przezskórnie fentanyl (25  $\mu$ g/h)

przez 22 dni. Pomimo, że badano pięć jednocentymetrowych segmentów, z których tylko jeden odpowiadała czasowi przyjmowania fentanylu, obecność tego związku została wykazana w czterech segmentach. Wyznaczone metodą LC-MS/MS stężenia fentanylu mieściły się w zakresie 0,06–0,48 ng/mg, przy czym najwyższe stężenie stwierdzono w segmencie odpowiadającemu miesiącowi terapii. Kintz i in. [11] analizowali włosy pobrane od uzależnionych od fentanylu kilku anestezjologów oraz pielęgniarki. Fentanyl oznaczany był po derywatywacji metodą GC-MS/MS. Stężenia mieściły się w zakresie od 0,008 do 0,644 ng/mg. Z kolei LeBeau i in. [11] analizowali metodą LC-MS/MS włosy uzależnionej pielęgniarki i wykazali fentanyl w stężeniach 0,020–0,093 ng/mg. Tylko w kilku opisywanych w literaturze przedmiotu przypadkach wykazano wyższe stężenia fentanylu niż w omawianym tutaj. Mushoff i in. oznaczali opioidowe leki przeciwbólowe we włosach osób leczonych paliatywnie. W 17 przypadkach wykazali fentanyl w stężeniach 0,013–1,787 ng/mg (średnia 0,481) [16]. Najwyższe stężenie – 1,930 ng/mg – oznaczyli Moore i in. [15]. Zarówno ta próbka włosów, jak i trzy pozostałe (w których stężenia wynosiły 0,012, 0,017 i 0,490 ng/mg), pobrane zostały ze zwłok.

Wśród opisywanych powyżej przypadków tylko trzy dotyczyły analizy włosów osób, które przyjmowały fentanyl przezskórnie [21, 22, 29]. W dwóch przypadkach wiadomo, że pacjenci przyjmowali plastry przez okres 22–25 dni, a łączna dawka przyjęta w tym czasie wynosiła 13,2–15 mg. Stosowanie fentanylu w ten sposób skutkowało stężeniami do 0,48 ng/mg włosów. Wykazane w niniejszej pracy stężenia fentanylu we włosach mężczyzny były znacznie wyższe (0,99 i 0,77 ng/mg), co było wynikiem długotrwałego przyjmowania plastrów przezskórnych. Analizowane segmenty stanowiły odcinki włosów po 2 cm każdy. Biorąc pod uwagę przeciętne tempo wzrostu włosów (około 1 cm miesięcznie) oraz długość nadesłanych włosów (około 4,5 cm), można stwierdzić, że mężczyzna przyjmował fentanyl w ostatnich 4 miesiącach. Z uzyskanych informacji wiadomo, że stosował on system transdermalny Durogesic przez 12 lat, zaś w ostatnim czasie plastry o zawartości fentanylu 25 µg/h. Można więc oszacować, że w okresie ostatnich czterech miesięcy łączna dawka przyjętego fentanylu przekraczała 70 mg, co tłumaczy tak wysokie stężenia wykazane we włosach.

Opracowana metoda oznaczania fentanylu we włosach charakteryzuje się bardzo niską granicą oznaczalności. Większość autorów stosowało do analizy znacznie większe próbki włosów, od 20 do 100 mg [11, 16, 21, 22]. Nieliczni stosowali mniejsze, 10 mg naważki [15]. W opracowanej metodzie, przy użyciu zaledwie 10 mg próbek włosów, osiągnięto *LOD* wynoszącą 1 pg/mg. Należy zaznaczyć, że wartość ta została obliczona dla najmniej intensywnego przejścia *MRM*. Dla

dwóch pozostałych, intensywniejszych przejść *MRM*, stężenia charakteryzujące się *S/N*=3 były znacznie niższe i wynosiły odpowiednio: dla 337,2→105,1 oraz 337,2→188,1 – 0,3 pg/mg i 0,1 pg/mg. Pomimo, że analizowano przypadek długotrwałego stosowania fentanylu, a wyznaczone stężenia tego związku były wysokie, można stwierdzić, że opracowana metoda będzie również przydatna do analizy włosów w przypadkach krótkotrwałego stosowania (lub nawet jednorazowego przyjęcia) fentanylu, gdzie spodziewane stężenia są niższe.

Mocz jest materiałem, który nadaje się do badań toksykologicznych do kilku dni od momentu przyjęcia ksenobiotyku. Wykazane stężenia analitów w tym materiale są trudne do interpretacji w odniesieniu do oceny ciężkości zatrucia i czasu narażenia na ksenobiotyk. Po podaniu dawki fentanylu często oznaczany jest w moczu jego główny metabolit – norfentanyl [23]. Po podaniu fentanylu w dawce 50–100 µg do 72 h w moczu był wykrywany norfentanyl w stężeniu od 0,2 do 0,3 ng/ml, natomiast fentanyl wykrywano do 24 h od podania leku [2, 5]. W moczu mężczyzny z omawianego przypadku stwierdzono obecność fentanylu w stężeniu 8,8 ng/ml. Pomimo, że związek macierzysty jest wydalany z moczem w ilości poniżej 10%, mocz badano tylko w jego kierunku, ponieważ wystarczało to do potwierdzenia używania tego związku w ostatnim czasie. Stężenia fentanylu w moczu opisane w literaturze przedmiotu mieściły się w zakresie od 0,2 do 449 ng/ml; w tym u osób stosujących systemy transdermalne w zakresie 48–159 ng/ml [2, 23]. Stężenia w próbkach moczu pobranych ze zwłok osób, które przyjmowały fentanyl przezskórnie, wynosiły od 2,9 do 895 ng/ml [1, 13]. Coopman i in. [4] opisali przypadek samobójczego zatrucia fentanylem 78-letniej kobiety wskutek zaaplikowania na ciało 10 plastrów Durogesic 100 µg/h. Wykazane w moczu stężenie fentanylu wynosiło wówczas 283 ng/ml.

Przeprowadzone w niniejszym przypadku badania włosów i moczu pozwoliły uwiarygodnić zeznania mężczyzny. Badania samego moczu nie dałyby pełnego obrazu przyjmowanych środków, gdyż odnosiłyby się tylko do ostatnich dni. Fentanyl może być wykrywany w moczu tylko do 48–72 h po podaniu jego dużych dawek [27].

Włosy mężczyzny analizowane były także przesiewowo w kierunku szerokiej grupy środków odurzających i leków przy zastosowaniu innych metod LC-MS i LC-MS/MS, zgodnie z procedurami obowiązującymi w Pracowni Analiz Toksykologicznych IES. W wyniku tych badań stwierdzono również, że mężczyzna nie stosował preparatów zawierających morfinę. Ze względu na długość zabezpieczonych włosów, odpowiadającą okresowi do 4 miesięcy, nie można się było wypowiedzieć na temat ewentualnie przyjmowanych leków i środków odurzających w okresie dłuższym niż około 5 miesięcy przed pobraniem próby włosów.

## 5. Podsumowanie

Przeprowadzone badania włosów i moczu pozwoliły uwiarygodnić zeznania mężczyzny i potwierdzić stosowanie fentanylu przez długi czas. Wykazane we włosach stężenia fentanylu były znacznie wyższe niż w innych opisanych przypadkach osób stosujących systemy transdermalne, co było wynikiem długotrwałego przyjmowania plastrów Durogesic, a tym samym wprowadzenia do organizmu wyższej dawki leku.

Opracowane metody wykrywania i oznaczania fentanylu we włosach i moczu mogą być z powodzeniem stosowane do analiz materiału pobranego od osób, u których zachodzi podejrzenie przyjęcia fentanylu. Bardzo niska *LOD* fentanylu we włosach może umożliwić wykrywanie tego związku nawet po jednorazowym jego przyjęciu.