



Analyse LC-MS/MS du fentanyl et de ses analogues dans l'urine humaine

par Shun-Hsin Liang et Frances Carroll

Résumé

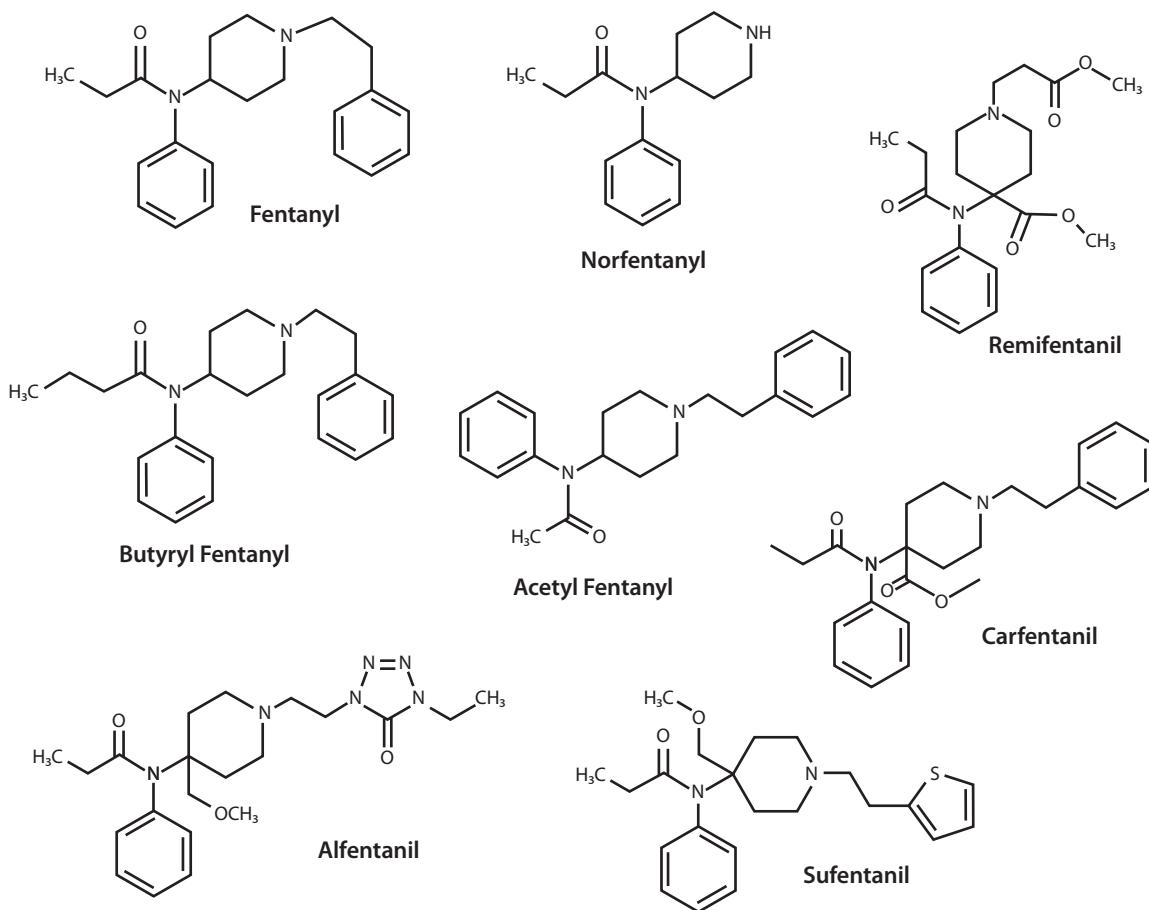
Les opioïdes de synthèse comme le fentanyl et le sufentanil ont des propriétés analgésiques très puissantes. L'abus de ces antalgiques délivrés sur ordonnance (ainsi que la prolifération rapide des analogues illicites) est un sérieux problème de santé publique. Dans cette étude, nous avons mis au point une méthode simple de type « Dilute & Shoot », qui fournit, sur une colonne Raptor Biphenyl, une analyse rapide LC-MS/MS de 3 minutes 30 du fentanyl et des composés associés (norfentanyl, acétylfentanyl, alfentanyl, butyryl fentanyl, carfentanyl, rémifentanyl et sufentanyl) dans l'urine humaine.

Introduction

Ces dernières années, l'usage illicite d'opioïdes de synthèse a fortement augmenté et tous les pays font maintenant face à une véritable épidémie. Parmi les milliers d'overdoses mortelles dues aux opioïdes de synthèse, la majorité est liée au fentanyl et ses analogues. Du fait de leurs propriétés analgésiques puissantes, les opioïdes de synthèse comme le fentanyl, l'alfentanyl, le rémifentanyl et le sufentanyl sont de puissants antalgiques aux applications médicales légitimes. Cependant, ils sont aussi extrêmement addictifs et font l'objet de nombreux abus. Par exemple, le carfentanyl est un puissant anesthésiant utilisé comme tranquillisant pour les animaux de grande taille, notamment les éléphants. Il est dix mille fois plus puissant que la morphine, ce qui en fait l'un des opioïdes de synthèse les plus puissants sur le marché. L'augmentation de son usage illicite, la plupart du temps mélangé à de l'héroïne, a été reliée à un nombre considérable de décès par overdose depuis 2016. En plus de l'abus de ces médicaments délivrés sur ordonnance, l'actuelle crise des opioïdes est alimentée par la prolifération des analogues illicites comme l'acétylfentanyl et le butyryl fentanyl, qui ont été conçus spécifiquement pour contourner les contrôles et les poursuites des autorités de lutte contre les stupéfiants.

L'augmentation du nombre d'opioïdes et des décès associés s'accompagne donc du besoin grandissant d'une méthode rapide et précise permettant d'analyser simultanément le fentanyl et ses analogues. C'est pourquoi nous avons mis au point cette méthode d'analyse LC-MS/MS qui permet de mesurer le fentanyl, six analogues et un métabolite (le norfentanyl) dans l'urine humaine (figure 1). Une procédure de préparation simple de type « Dilute & Shoot » est associée à une analyse chromatographique rapide (3 minutes 30) sur une colonne Raptor Biphenyl. Cette méthode permet d'identifier et de quantifier le fentanyl et les composés associés de manière exacte et précise, ce qui la rend adéquate pour diverses applications comme les analyses de toxicologie clinique, les analyses médico-légales, les dépistages sur le lieu de travail ou encore la recherche pharmaceutique.

Figure 1 : Structures chimiques



Caractéristiques expérimentales

Préparation des échantillons

Les analytes ont été ajoutés dans un « pool » d'urine humaine. Un aliquot de 80 µl d'urine a été mélangé avec 320 µl d'une solution eau:méthanol 70:30 (dilution de facteur 5) et 10 µl d'étalon interne (40 ng/ml dans le méthanol), dans un flacon filtrant Thomson SINGLE StEP (réf. Restek 25895). Après filtration sur membrane PVDF de 0,2 µm, 5 µl ont été injectés dans le système LC-MS/MS.

Solutions étalons et échantillons de contrôle qualité (QC)

Les solutions étalons ont été préparées dans un « pool » d'urine humaine à des concentrations de 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.0, 25.0 et 50.0 ng/ml. Trois niveaux d'échantillons QC (0.75, 4.0 et 20 ng/ml) ont été préparés dans l'urine pour tester l'exactitude et la précision en comparant aux courbes de calibration. Les analyses ont été réalisées sur trois jours différents. Tous les standards et les échantillons QC ont été soumis à la procédure de préparation des échantillons décrite ci-dessus.

L'analyse LC-MS/MS du fentanyl et de ses analogues a été réalisée sur un instrument ACQUITY UPLC couplé à un spectromètre de masse Waters Xevo TQ-S. Les conditions instrumentales sont décrites ci-dessous et les transitions des analytes sont fournies dans le Tableau I.

Colonne analytique : Raptor Biphenyl (5 µm, 50 mm x 2.1 mm, réf. 9309552)
 Précolonne : Cartouche Raptor Biphenyl EXP, (5 µm, 5 mm x 2.1 mm, réf. 930950252)
 Phase mobile A : 0.1% d'acide formique dans l'eau
 Phase mobile B : 0.1% d'acide formique dans le méthanol
 Gradient

	Temps (min)	%B
	0.00	30
	2.50	70
	2.51	30
	3.50	30

Débit : 0.4 ml/min
 Volume d'injection : 5 µl
 Température : 40 °C
 Mode d'ionisation : ESI+

Tableau I : Transitions ioniques

Analyte	Ion précurseur	Quantificateur des ions produits	Qualificateur des ions produits	Étalon interne
Norfentanyl	233.27	84.15	56.06	Norfentanyl-D ₅
Acétylfentanyl	323.37	188.25	105.15	Acétylfentanyl- ¹³ C ₆
Fentanyl	337.37	188.26	105.08	Fentanyl-D ₅
Butyryl fentanyl	351.43	188.20	105.15	Carfentanil-D ₅
Rémifentanil	377.37	113.15	317.30	Norfentanyl-D ₅
Sufentanil	387.40	238.19	111.06	Sufentanil-D ₅
Carfentanil	395.40	113.14	335.35	Carfentanil-D ₅
Alfentanil	417.47	268.31	197.23	Acétylfentanyl- ¹³ C ₆
Norfentanyl-D ₅	238.30	84.15	—	—
Acétylfentanyl- ¹³ C ₆	329.37	188.25	—	—
Fentanyl-D ₅	342.47	188.27	—	—
Sufentanil-D ₅	392.40	238.25	—	—
Carfentanil-D ₅	400.40	340.41	—	—

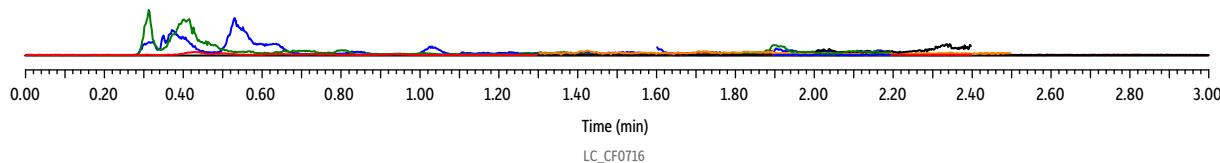
Résultats et discussion

Performances chromatographiques

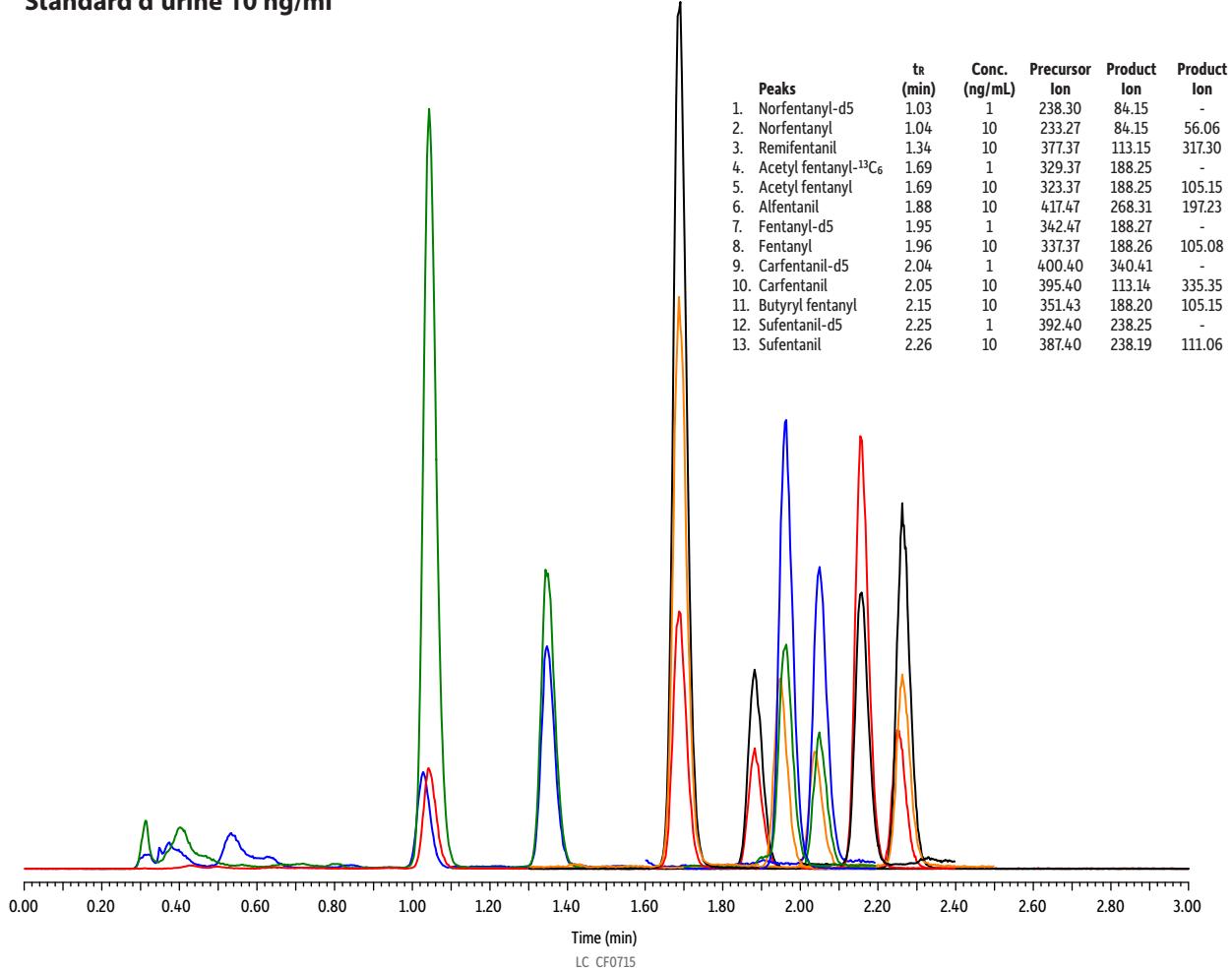
Les huit analytes ont tous été séparés au cours d'une analyse en gradient de 2 minutes 30 (durée totale du cycle d'analyse : 3 minutes 30) sur une colonne Raptor Biphenyl (Figure 2). Aucune interférence significative de la matrice pouvant avoir un impact négatif sur la quantification des échantillons d'urine (dilués avec un facteur 5) n'a été observée. La colonne Raptor Biphenyl utilisée est une colonne de silice à particules superficiellement poreuses (« SPP ») de 5 µm. Elle a été choisie pour cette méthode, car elle offre des performances semblables aux colonnes de silice à particules complètement poreuses (« FPP ») de plus petite granulométrie, tout en générant moins de contrepression dans le système.

Figure 2 : La colonne Raptor Biphenyl sépare efficacement tous les composés cibles présents dans l'urine, sans interférence apparente de la matrice.

Échantillon blanc d'urine



Standard d'urine 10 ng/ml



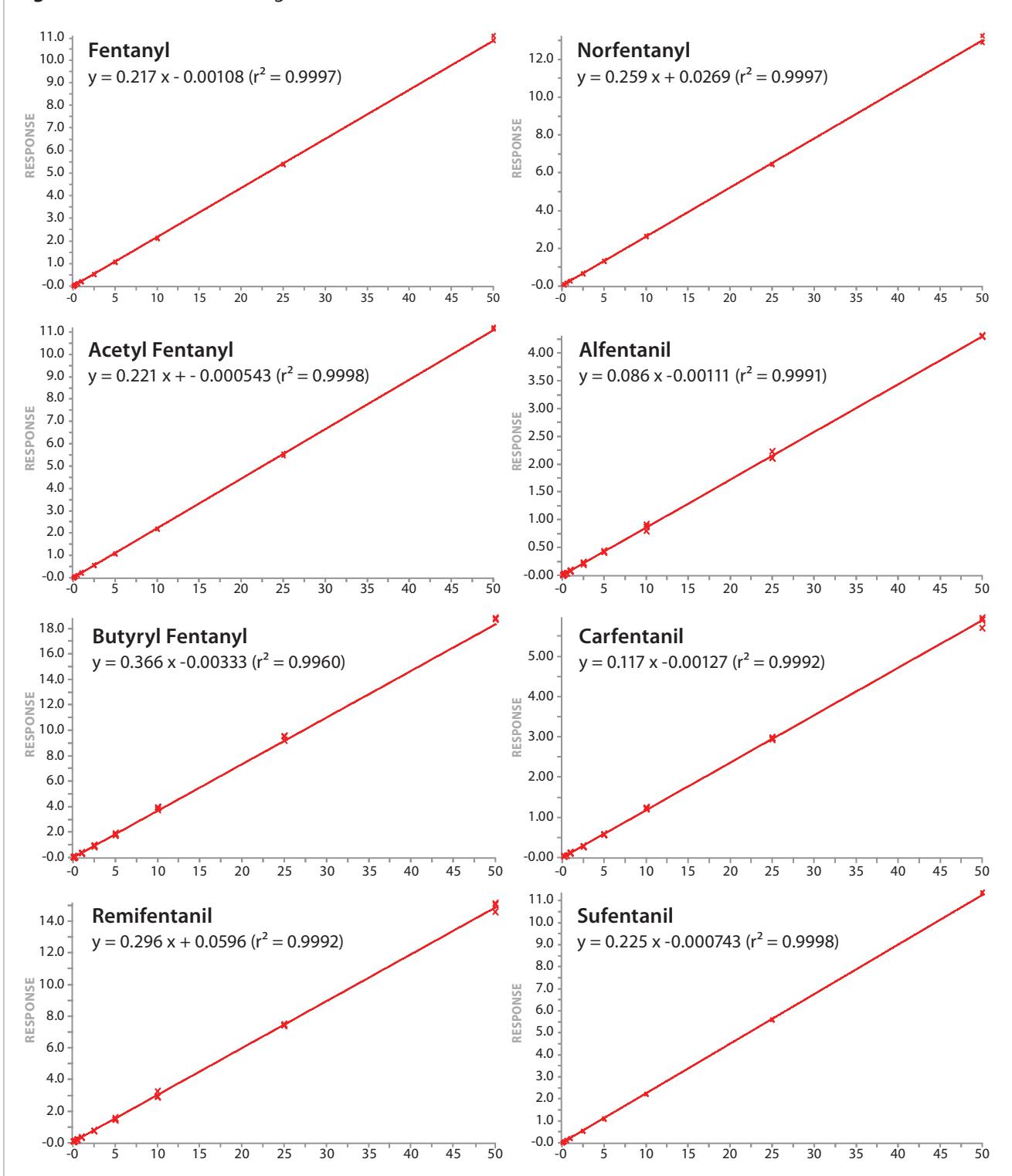
Column	Raptor Biphenyl (cat.# 9309552)	Detector	MS/MS
Dimensions:	50 mm x 2.1 mm ID	Ion Mode:	ESI+
Particle Size:	5 μ m	Mode:	MRM
Pore Size:	90 \AA	Instrument	UHPLC
Guard Column:	Raptor Biphenyl EXP guard cartridge 5 mm, 2.1 mm ID, 5 μ m (cat.# 930950252)	Notes	Human urine was fortified at 10 ng/mL with target analytes. An 80 μ L urine aliquot was mixed with 320 μ L of 70:30 water:methanol solution (5-fold dilution) and 10 μ L of internal standard solution (40 ng/mL in methanol) in a Thomson SINGLE STEP filter vial (Restek cat.# 25895). After filtering through the 0.2 μ m PVDF membrane, 5 μ L was injected for analysis.
Temp.:	40 °C		
Sample			
Diluent:	70:30 Water:methanol		
Inj. Vol.:	5 μ L		
Mobile Phase			
A:	0.1% Formic acid in water		
B:	0.1% Formic acid in methanol		

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
0.00	0.4	70	30
2.50	0.4	30	70
2.51	0.4	70	30
3.50	0.4	70	30

Linéarité

Des réponses linéaires ont été obtenues pour tous les composés et les gammes d'étalonnage couvrent les niveaux de concentration habituels recherchés pour le dépistage des abus ou la recherche pure. En utilisant une régression linéaire pondérée de $1/x$ ($1/x^2$ pour le butyryl fentanyl), la linéarité de la calibration allait de 0.05 à 50 ng/ml pour le fentanyl, l'alfentanil, l'acétylfentanyl, le butyryl fentanyl et le sufentanil ; de 0.10 à 50 ng/ml pour le rémifentanil ; et de 0.25 à 50 ng/ml pour le norfentanyl et le carfentanyl. Tous les analytes présentent une linéarité acceptable avec des valeurs de r^2 de 0.996 ou plus (Figure 3) et des écarts-type < 12 % (< 20 % pour les standards les moins concentrés).

Figure 3 : Courbes d'étalonnage



Exactitude et précision

Basée sur trois expériences indépendantes réalisées sur des jours différents, l'exactitude de la méthode pour l'analyse du fentanyl et de ses analogues a été démontrée par les rendements (%) de récupération, éloignés de moins de 10 % de la concentration nominale pour tous les composés, et ce à tous les niveaux QC. L'écart-type relatif allait respectivement de 0.5 à 8.3 % et de 3.4 à 8.4% pour les comparaisons intra et inter-jour, ce qui indique une précision de méthode acceptable (Tableau II).

Tableau II : Exactitude et précision pour l'analyse du Fentanyl et des composés associés dans l'urine et dans les échantillons de contrôle de qualité

Analyte	CQ - niveau 1 (0.750 ng/ml)			CQ - niveau 2 (4.00 ng/ml)			CQ - niveau 3 (20.0 ng/ml)		
	Conc. moyenne (ng/ml)	Exactitude moyenne (%)	Écart-type relatif (%)	Conc. moyenne (ng/ml)	Exactitude moyenne (%)	Écart-type relatif (%)	Conc. moyenne (ng/ml)	Exactitude moyenne (%)	Écart-type relatif (%)
Acétylfentanyl	0.761	102	1.54	3.99	99.7	2.08	19.9	99.3	0.856
Alfentanil	0.733	97.6	3.34	3.96	98.9	8.38	20.9	104	6.73
Butyryl fentanyl	0.741	98.9	6.29	3.77	94.3	6.01	20.8	104	4.95
Carfentanil	0.757	101	7.34	3.76	94.0	4.64	20.6	103	4.24
Fentanyl	0.761	102	1.98	3.96	99.1	2.31	19.9	99.6	1.04
Norfentanyl	0.768	103	6.50	4.04	101	1.84	20.1	101	2.55
Rémifentanil	0.765	102	3.42	3.97	99.2	3.68	20.8	104	4.14
Sufentanil	0.752	100	1.67	3.93	98.3	1.28	20.1	100	0.943

Conclusion

Une méthode simple de type « Dilute & Shoot » a été mise au point pour l'analyse quantitative du fentanyl et de ses analogues dans l'urine humaine. Cette méthode d'analyse est rapide, fiable et sensible avec une exactitude et une précision acceptables pour l'analyse d'échantillons urinaires. La colonne Raptor Biphenyl convient parfaitement à l'analyse de ces opioïdes de synthèse et cette méthode peut s'appliquer aux analyses de toxicologie clinique, aux analyses médico-légales, aux dépistages sur le lieu de travail et à la recherche pharmaceutique.