



Analisi LC-MS/MS di fentanyl e analoghi nell'urina umana

Di Shun-Hsin Liang e Frances Carroll

Abstract

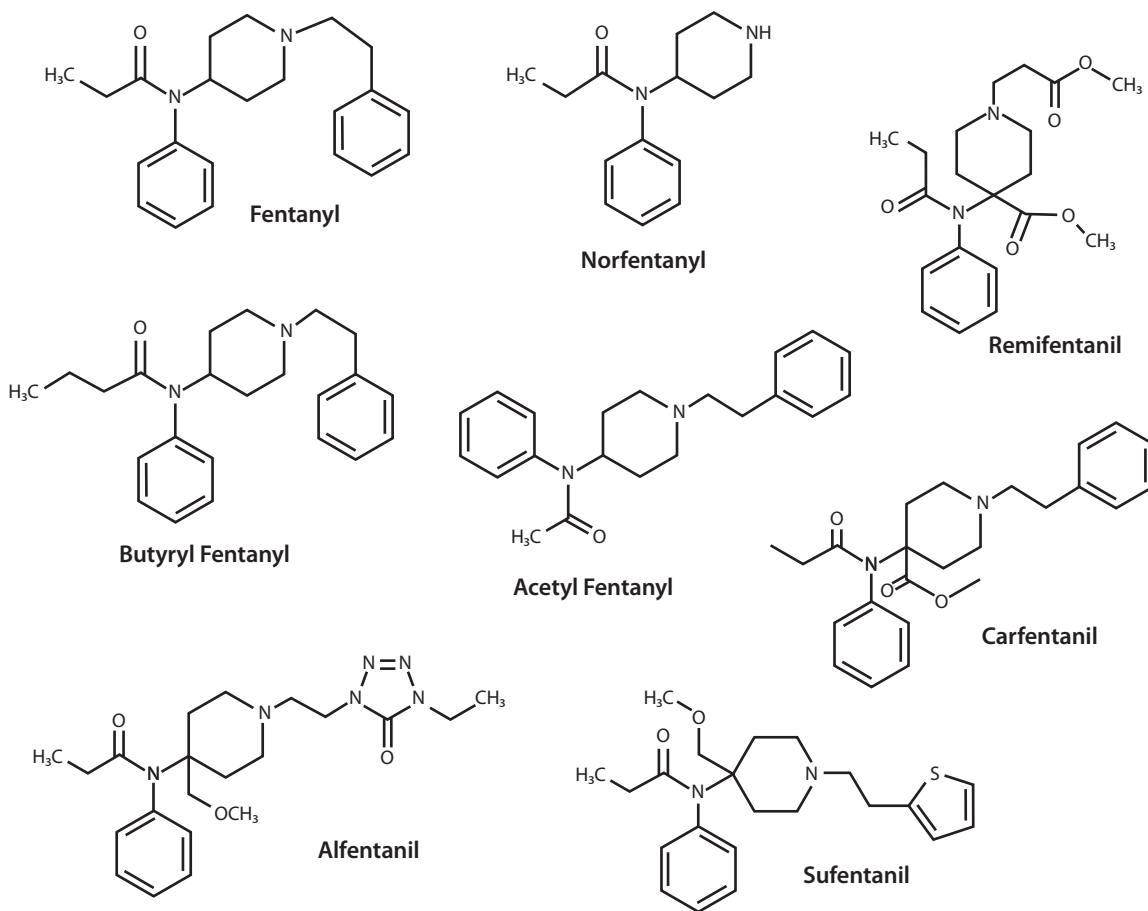
Gli oppioidi sintetici, tra cui fentanyl e sufentanil, presentano un elevato potere analgesico. L'abuso di questi antidolorifici da prescrizione, insieme a una varietà di analoghi illegali in rapido aumento, rappresenta un problema significativo per la salute pubblica. Nell'ambito del presente studio abbiamo sviluppato un semplice metodo dilute-and-shoot che garantisce un'analisi rapida, della durata di 3,5 minuti, di fentanyl e dei suoi analoghi (norfentanyl, acetylfentanyl, alfentanil, butyrylfentanyl, carfentanil, remifentanyl e sufentanil) nell'urina umana con una colonna Raptor bifenilica in LC-MS/MS.

Introduzione

Negli ultimi anni il consumo illecito degli oppioidi sintetici è aumentato esponenzialmente, e oggi ci troviamo ad affrontare una vera e propria epidemia a livello mondiale. Le migliaia di decessi annuali dovuti a overdose di oppioidi sintetici sono dovute per la maggior parte al fentanyl e ai suoi analoghi. L'elevato potere analgesico rende le sostanze come fentanyl, alfentanil, remifentanyl e sufentanil dei potenti antidolorifici dalle valide applicazioni mediche, che inducono tuttavia una grave dipendenza e sono oggetto di abuso. Per esempio, il carfentanil è un anestetico estremamente potente che viene usato come tranquillante negli animali di grandi dimensioni, soprattutto elefanti. Con una potenza 10.000 volte superiore rispetto alla morfina, è uno degli oppioidi sintetici più potenti sul mercato. All'aumento del consumo illegale di questa sostanza, nella maggior parte dei casi miscelata all'eroina, sono da attribuire numerosi decessi per overdose avvenuti a partire dal 2016. Oltre all'abuso di tali farmaci da prescrizione, l'attuale crisi degli oppioidi è alimentata da un numero crescente di analoghi illegali, tra cui l'acetylfentanyl e il butyrylfentanyl, studiati ad hoc per evadere i controlli antidroga delle forze dell'ordine.

Parallelamente all'aumento degli oppioidi in circolazione e dei decessi, si assiste alla necessità sempre più pressante di poter contare su un metodo rapido e preciso per l'analisi simultanea di fentanyl e dei suoi analoghi. Per questa ragione abbiamo sviluppato un metodo LC-MS/MS per la misurazione del fentanyl insieme a sei analoghi e un metabolita (norfentanyl) nell'urina umana (Figura 1). Una semplice preparazione dilute-and-shoot del campione è stata combinata con un'analisi cromatografica rapida (della durata di 3,5 minuti) mediante l'impiego di una colonna Raptor bifenilica. Questo metodo garantisce precisione e accuratezza nell'identificazione e quantificazione del fentanyl e dei suoi analoghi, prestandosi così a diverse applicazioni analitiche, tra cui tossicologia clinica, analisi forensi, test antidroga sul lavoro e ricerca farmaceutica.

Figura 1: Strutture chimiche



Studio sperimentale

Preparazione del campione

Una miscela di urina umana è stata fortificata con gli analiti. Un'aliquota di 80 μL di urina è stata miscelata in un vial filtrante Thomson SINGLE StEP (Restek cat. n° 25895) a 320 μL di soluzione acqua:metanolo 70:30 (diluata 5 volte) e 10 μL di standard interno (40 ng/mL in metanolo). Dopo la filtrazione con membrana PVDF da 0,2 μm , è stata eseguita l'iniezione di 5 μL in LC-MS/MS.

Standard di calibrazione e campioni di controllo qualità

Gli standard di calibrazione sono stati preparati in mix di urina umana a una concentrazione di 0,05 - 0,10 - 0,25 - 0,50 - 1,00 - 2,50 - 5,00 - 10,0 - 25,0 e 50,0 ng/mL. Sono stati preparati tre livelli di campioni QC (0,75 - 4,0 e 20 ng/mL) nella matrice per testare l'accuratezza e la precisione rispetto alle curve di calibrazione precedentemente definite. Le analisi di recupero sono state svolte in tre diversi giorni. Tutti gli standard e i campioni QC sono stati sottoposti al metodo di preparazione del campione descritto in precedenza.

L'analisi LC-MS/MS di fentanyl e dei suoi analoghi è stata realizzata con lo strumento ACQUITY UPLC abbinato a uno spettrometro di massa Waters Xevo TQ-S. Di seguito si riportano i parametri dello strumento, mentre le transizioni ioniche degli analiti sono raccolte nella Tabella I.

Colonna analitica: Raptor bifenilica (5 µm, 50 mm x 2,1 mm; cat. n° 9309552)
 Colonna di guardia: Cartuccia per colonne di guardia Raptor bifeliniche EXP (5 µm, 5 mm x 2,1 mm; cat. n° 930950252)
 Fase mobile A: 0,1% acido formico in acqua
 Fase mobile B: 0,1% acido formico in metanolo
 Gradiente

Tempo (min)	%B
0,00	30
2,50	70
2,51	30
3,50	30

Velocità flusso: 0,4 mL/min
 Volume iniezione: 5 µL
 Temperatura colonna: 40 °C
 Modalità ioni: ESI positivo

Tabella I: Transizioni ioniche

Analita	Ione precursore	Ione prodotto quantificatore	Ione prodotto qualificatore	Standard interno
Norfentanyl	233.27	84.15	56.06	Norfentanyl-D ₅
Acetylfentanyl	323.37	188.25	105.15	Acetylfentanyl- ¹³ C ₆
Fentanyl	337.37	188.26	105.08	Fentanyl-D ₅
Butyrylfentanyl	351.43	188.20	105.15	Carfentanil-D ₅
Remifentanil	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	Acetylfentanyl- ¹³ C ₆
Norfentanyl-D ₅	238.30	84.15	—	—
Acetylfentanyl- 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	—	—

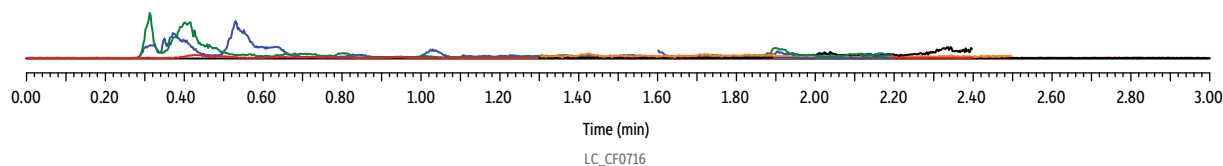
Risultati e discussione

Prestazione cromatografica

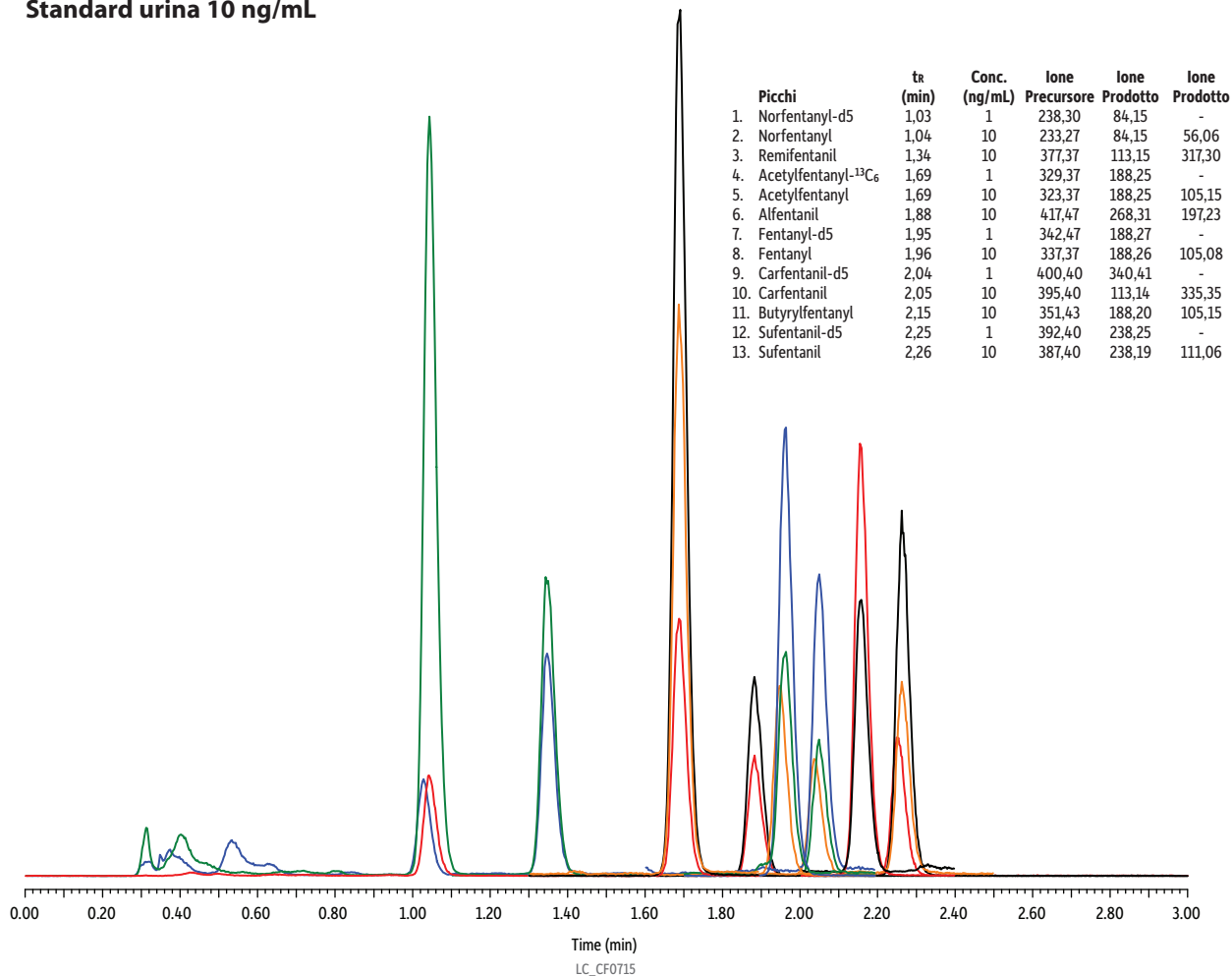
Tutti gli otto analiti sono stati ben separati all'interno di un gradiente di eluizione di 2,5 min (tempo di analisi totale 3,5 min) su una colonna Raptor bifenilica (Figura 2). Non è stata rilevata una significativa interferenza della matrice che potesse ripercuotersi negativamente sulla quantificazione dei campioni di urina diluiti cinque volte. La colonna Raptor bifenilica con particelle da 5 µm impiegata nell'ambito dell'esperimento è una colonna con particelle a superficie porosa (SPP), selezionata per il metodo illustrato perché garantisce prestazioni simili alle colonne con particelle totalmente porose (FPP) dalla dimensione minore pur generando una minore contropressione di sistema.

Figura 2: Grazie alla colonna Raptor bifenilica abbiamo ottenuto una separazione efficace di tutti i composti target presenti nell'urina, senza rilevare interferenze della matrice.

Bianco urina



Standard urina 10 ng/mL



Colonna Raptor bifenilica (cat. n° 9309552)
Dimensioni: 50 mm x 2,1 mm DI
Dimensione particelle: 5 µm
Porosità: 90 Å
Colonna di guardia: Cartuccia per colonne di guardia Raptor bifeliniche EXP 5 mm, 2,1 mm DI, 5 µm (cat. n° 930950252)
Iniettore: 40 °C
Campione
Diluente: Acqua:metanolo 70:30
Vol. Iniez.: 5 µL
Fase mobile
A: Acido formico in acqua 0,1%
B: Acido formico in metanolo 0,1%

Detector MS/MS
Modalità ioni: ESI+
Modalità: MRM
Strumentazione UHPLC
Note

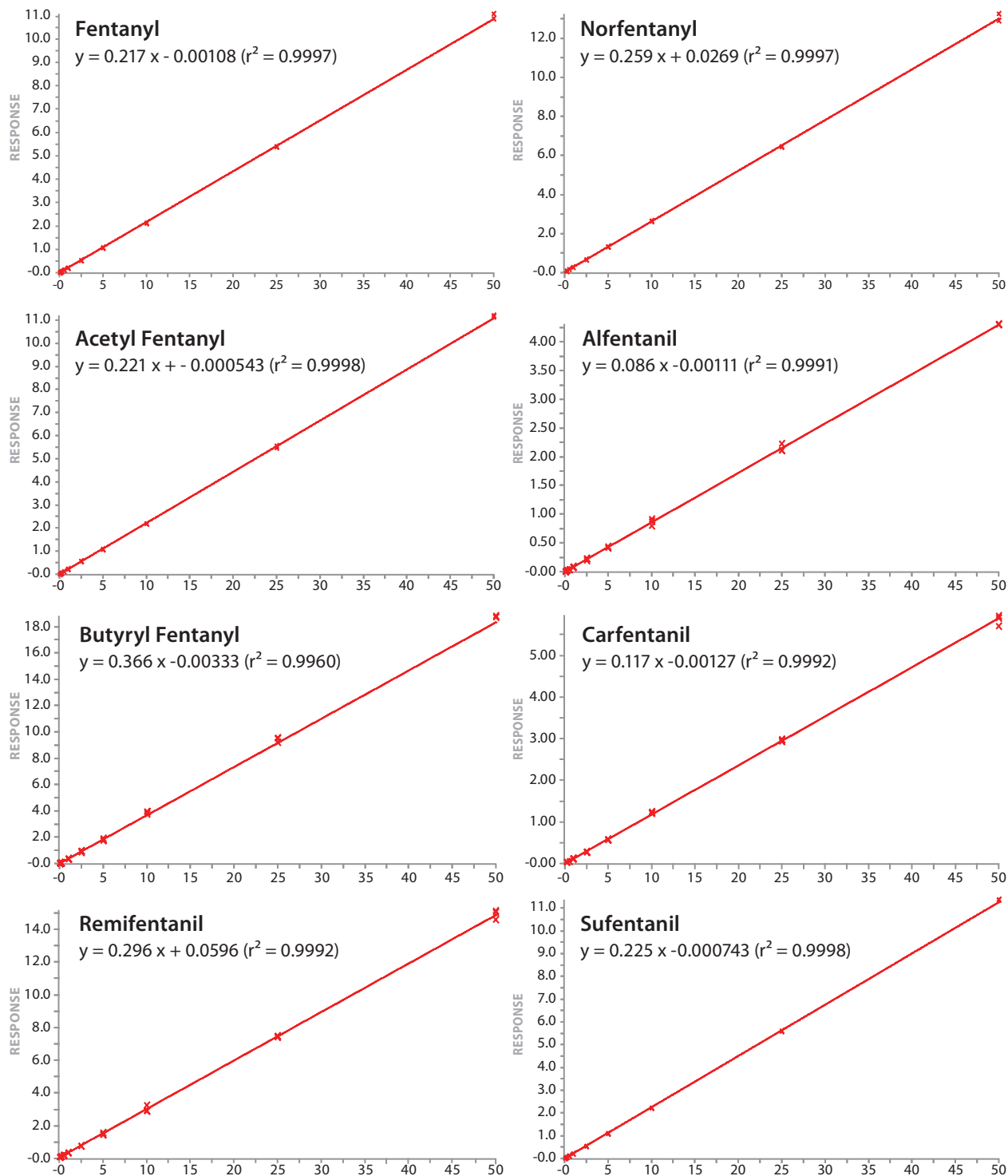
Al campione di urina umana sono stati addizionati gli analiti di interesse a una concentrazione di 10 ng/mL. Un'aliquota di 80 µL di urina è stata miscelata in un vial filtrante Thomson SINGLE StEP (Restek cat. n° 25895) a 320 µL di soluzione acqua:metanolo 70:30 (diluente cinque volte) e 10 µL di standard interno (40 ng/mL in metanolo). Dopo la filtrazione con membrana PVDF da 0,2 µm è stata eseguita l'iniezione di 5 µL per effettuare l'analisi.

Tempo (min)	Flusso (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

Linearità

Per ogni composto è stata ottenuta una risposta lineare, con intervalli di calibrazione che includevano i livelli tipici di concentrazione monitorati a fini scientifici e per rilevare gli abusi. Usando una regressione lineare pesata $1/x$ ($1/x^2$ nel caso del butyrylfentanyl), la linearità della calibrazione si è attestata tra 0,05 e 50 ng/mL per fentanyl, alfentanil, acetylfentanyl, butyrylfentanyl e sufentanil; tra 0,10 e 50 ng/mL per remifentanyl e tra 0,25 e 50 ng/mL per norfentanyl e carfentanil. Tutti gli analiti hanno mostrato una linearità accettabile, con valori r^2 pari a 0,996 o superiori (Figura 3) e deviazioni <12% (<20% nel caso degli standard a minore concentrazione).

Figura 3: Curve di calibrazione



Accuratezza e precisione

Sulla base di tre esperimenti indipendenti realizzati in diversi giorni, l'accuratezza del metodo volto ad analizzare il fentanyl e i suoi analoghi è stata dimostrata dalla percentuale dei valori di recupero, entro il 10% della concentrazione nominale di tutti i composti a ogni livello di QC. La percentuale di coefficiente di variazione si è attestata in un intervallo compreso tra 0,5% e 8,3% e tra 3,4% e 8,4% rispettivamente per i confronti intra e interday, a dimostrazione di una precisione accettabile del metodo (Tabella II).

Tabella II: Risultati di accuratezza e precisione per fentanyl e composti analoghi in campioni QC di urina.

Analita	Livello QC 1 (0,750 ng/mL)			Livello QC 2 (4,00 ng/mL)			Livello QC 3 (20,0 ng/mL)		
	Conc. media (ng/mL)	Accuratezza media (%)	% deviazione standard relativa	Conc. media (ng/mL)	Accuratezza media (%)	% deviazione standard relativa	Conc. media (ng/mL)	Accuratezza media (%)	% deviazione standard relativa
Acetylfentanyl	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
Butyrylfentanyl	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
Remifentanil	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

Conclusioni

È stato sviluppato un semplice metodo dilute-and-shoot finalizzato all'analisi quantitativa del fentanyl e dei suoi analoghi nell'urina umana. Il metodo analitico si è rivelato rapido, affidabile e sensibile, presentando accuratezza e precisione accettabili per l'analisi in campioni di urina. La colonna Raptor bifenilica è particolarmente adatta all'analisi di tali oppioidi sintetici e il metodo illustrato può presentare diverse applicazioni: tossicologia clinica, analisi forense, test antidroga sul lavoro e ricerca farmaceutica.