

Toxicomanie d'un anesthésiste au fentanyl : la preuve formelle par analyse des cheveux en utilisant la CPG/SM/SM

Evidence of fentanyl abuse by an anesthetist through hair analysis using GC/MS/MS

Marion VILLAIN, Vincent CIRIMELE, Bertrand LUDES, Pascal KINTZ*

Institut de Médecine Légale, 11, rue Humann - 67000 STRASBOURG - France

*Auteur à qui adresser la correspondance : Docteur Pascal KINTZ
Tél : 03 90 24 33 49 - Fax : 03 90 24 33 62 - e-mail : pascal.kintz@wanadoo.fr

(Reçu le 24 octobre 2000 ; accepté le 8 janvier 2001)

RÉSUMÉ

Un médecin anesthésiste exerçant en Suisse est soupçonné d'usage détourné de fentanyl. Afin de palier aux limitations des analyses urinaires, négatives pour le fentanyl à plusieurs reprises, une recherche au niveau capillaire a été réalisée, pouvant déterminer une éventuelle exposition répétée à ce médicament. Pour cela, une méthode par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse tandem a été mise au point, comprenant une incubation de la poudre de cheveux dans du tampon Soerensen et une purification sur colonne Isolote C18.

Ce procédé validé (linéaire entre 20 et 1000 pg/mg, limite de détection de 20 pg/mg et rendement d'extraction de 82 % pour une concentration de 100 pg/mg), a permis de doser le fentanyl à la concentration de 644 pg/mg. Celle-ci est très importante en regard des concentrations retrouvées dans la littérature et signifie que ce médecin consomme de façon régulière ce stupéfiant.

MOTS-CLÉS

fentanyl, abus chronique, cheveux, CPG/SM/SM.

SUMMARY

An anesthetist, working in Switzerland, was suspected of fentanyl misuse. His urine analyses, biological fluid usually employed to document drug consumption, were always found negative. However it is known that the elimination of such drugs occurs within a few days. In contrast, hair allows a drug administration to be tracked back for months or even years. This is the reason why a method using a GC/MS/MS system was developed to detect fentanyl in hair.

After the validation of the procedure (linearity between 20 and 1000 pg/mg, limit of detection of 20 pg/mg and extraction recovery of 82 % at 100 pg/mg), we were able to detect fentanyl at a concentration of 644 pg/mg. This result is the proof of chronic abuse of fentanyl by the anesthetist.

KEY-WORDS

fentanyl, chronic abuse, hair, GC/MS/MS.

Introduction

Le fentanyl, N-(1-phényléthyl-4-pipéridyl)-propionamide, est un analgésique central réservé à l'anesthésie de courte, moyenne ou longue durée. Il est utilisé dans les protocoles de neuroleptanalgie, d'anesthésie générale balancée et d'anesthésie analgésique à doses élevées.

C'est un morphinomimétique très puissant qui provoque une anesthésie chirurgicale environ 100 fois supérieure à celle de la morphine chez l'Homme.

Comme les autres analgésiques, le fentanyl peut faire l'objet d'abus, en particulier dans le milieu médical où l'accès y est facilité (1, 2, 3). Le fentanyl et ses analogues ont également été identifiés comme drogues de la rue, impliquant un trafic ou encore leur production clandestine : c'est l'exemple de l'alpha-méthylfentanyl, baptisé "China White".

Habituellement sous forme de solution injectable, le fentanyl est commercialisé, depuis quelques années, sous la forme de patchs transdermiques, souvent prescrits pour le traitement de douleurs chroniques (4).

Généralement, le dosage du fentanyl est réalisé dans le sang et les urines mais sa durée de détection est limitée de part sa disparition rapide des fluides corporelles. En effet, le fentanyl a une durée de vie de 3 à 12 heures : une injection en intraveineuse de fentanyl de 2 µg/kg conduit à une concentration de 11 µg/L et celle-ci décroît jusqu'à 1 µg/L en 1 heure.

En ce qui concerne son métabolisme, plus de 85 % du fentanyl ingéré est excrété dans les urines sous 3-4 jours.

L'analyse des cheveux montre son intérêt en augmentant la fenêtre de détection de quelques jours à plusieurs mois (selon la longueur des cheveux analysés). En effet, outre le fait que les cheveux sont plus faciles à prélever et à conserver que le sang ou les urines, ce type de prélèvement présente l'avantage unique d'être le reflet d'une exposition répétée. Cela peut représenter un complément idéal des résultats de dosages urinaires conventionnels, les analyses urinaires pouvant rendre compte d'une exposition récente d'un individu à une drogue et les analyses capillaires pouvant mettre en évidence un abus à long terme.

La revue de la littérature, pauvre concernant ce sujet, montre cependant l'existence de trois travaux relatant le dosage du fentanyl dans les cheveux : Wang et al (5), utilisant des techniques immunologiques, est confronté à des problèmes de réactions croisées et donc de faux positifs. Les deux autres (6, 7), basées sur des techniques chromatographiques, dosent des concentrations de 20 et 100 picogrammes de fentanyl par milligramme de cheveux. Ces concentrations étant très

faibles, il a été nécessaire de développer une méthode sensible et très spécifique afin de pouvoir doser des concentrations de l'ordre du picogramme.

Le cas rapporté ici est celui d'un médecin fortement soupçonné d'un abus chronique de fentanyl, et pour lequel une analyse au niveau des cheveux a été demandée par un confrère suisse.

Historique

Un médecin anesthésiste d'une cinquantaine d'années, pratiquant dans une clinique du canton de Genève, est suspecté de consommer du fentanyl de manière illicite. Il a été convoqué à plusieurs reprises dans le but de réaliser des analyses urinaires. Celles-ci se sont toujours révélées négatives, mais la molécule n'est détectable dans les urines que quelques jours après la dernière prise. Par ailleurs, le rendez-vous ayant toujours été pris plusieurs jours avant, il pouvait être aisé au praticien de s'abstenir sur une courte durée.

De manière à augmenter la fenêtre de détection, il semblait nécessaire de réaliser des analyses capillaires. En effet, selon la longueur des cheveux, il est possible de doser des molécules ingérées jusqu'à plusieurs mois avant le moment du prélèvement.

Dans le cas présenté, une mèche de cheveux de trois centimètres a été prélevée au niveau du vertex postérieur et envoyée, pour analyse, à l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg.

Matériel et méthodes

Après décontamination de la mèche de cheveux par le dichlorométhane (2 fois 5 ml, 2 min), l'échantillon de cheveux est pulvérisé dans un broyeur à boulet jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. 80 mg sont incubés une nuit dans 2 ml de tampon Soerensen pH 7,6, en présence de 2,5 ng de fentanyl-d₅ (promochem) utilisé comme standard interne, à 40° C puis centrifugés. Le résidu est repris dans 1 ml de tampon frais, agité et centrifugé. Les phases aqueuses réunies sont extraites en phase solide. La colonne Isolute C18 (Touzart et Matignon) est activée par 3 ml de méthanol puis conditionnée par 3 ml d'eau bidistillée. L'échantillon est déposé et la colonne est rincée par 2 fois 1 ml d'eau bidistillée. Après séchage de la colonne, 1 heure, sous vide, le fentanyl est élué avec 3 fois 0.5 ml d'acétone/dichlorométhane (3 / 1, v/v). La phase organique est évaporée sous vide et le résidu repris dans 30 µl de méthanol.

Le système d'analyse consiste en un passeur automatique Finnigan A200S et un chromatographe "Varian

3400" couplé à un spectromètre de masse tandem "Finnigan TSQ700" (GC/MS/MS).

Un aliquot de 2 µl est injecté en mode splitless (injecteur : 250° C) dans une colonne HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), traversée par de l'hélium N55 à un débit de 1 ml/min. Le four est programmé à une température initiale de 60° C, puis chauffé à 30° C/min jusqu'à atteindre une température de 295° C, maintenue pendant 5 min. La durée totale de l'analyse est de 14 min.

Le détecteur de masse est utilisé en mode impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV et une température de source de 150° C. L'acquisition est réalisée en mode SRM (selected reaction monitoring).

L'ion majoritaire obtenu en EI/Q1/MS est sélectionné comme ion parent (m/z 245) et les ions fils (m/z 245, 189, 146) sont détectés dans le troisième quadripôle (figure 1), après la collision avec l'argon (chambre de collision : 0,2 mTorr, énergie de collision : -10 eV)

Le fentanyl est identifié à partir de son temps de rétention et de l'abondance des trois ions de confirmation ($R_t = 11,91$; m/z 245, 189, 146).

La quantification est faite par rapport au fentanyl- d_5 ($R_t = 11,89$; m/z 250).

La linéarité est réalisée à partir de 50 mg de poudre de cheveux témoins (négatifs pour le fentanyl) surchargés avec 1 (20 pg/mg), 2,5 (50 pg/mg), 5 (100 pg/mg), 25 (500 pg/mg), et 50 (1000 pg/mg) ng de fentanyl.

Le rendement d'extraction est déterminé en comparant les surfaces de pics du fentanyl extrait de 50 mg de poudre de cheveux témoins surchargés pour une concentration finale de 100 pg/mg avec la surface de pic d'une solution standard à la même concentration.

La limite de détection est évaluée à l'aide de concentrations décroissantes de fentanyl, jusqu'à l'obtention d'une réponse correspondant à 3 fois le bruit de fond.

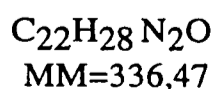
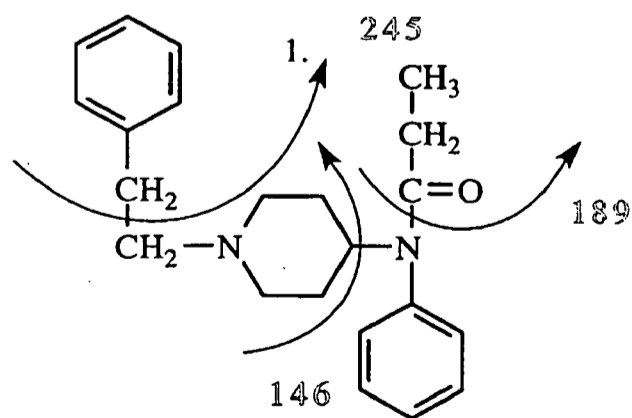


Figure 1 : Schéma réactionnel de fragmentation du fentanyl.

Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons optimisé le procédé d'extraction du fentanyl de la matrice capillaire. En effet, une interférence au niveau de notre pic de fentanyl était visible lors d'une extraction liquide-liquide par les solvants chloroforme/isopropanol/n-heptane (25 /10 /65, v/v/v), à pH 7,6 (tampon Soerensen), montrant la coélution d'une molécule endogène présente dans les cheveux. Nous avons résolu ce problème en procédant à une extraction en phase solide sur cartouche Isolute C18.

Dans les conditions chromatographiques utilisées, le pic de fentanyl est parfaitement isolé.

L'analyse par CPG/SM/SM des cheveux montre un comportement linéaire pour des concentrations allant de 20 à 1000 pg/mg, avec un coefficient de corrélation de 0,999. La courbe de calibration est représentée figure 2 et correspond à la regression linéaire entre le rapport des surfaces de pic (fentanyl / fentanyl- d_5) et les concentrations finales en fentanyl. L'équation de cette droite est $y = 288,809x - 5,292$.

La limite de détection du fentanyl, déterminée pour un rapport signal sur bruit de fond de 3, est de 20 pg/mg.

Pour une concentration finale en fentanyl de 100 pg/mg, le rendement d'extraction est de 82 %.

L'analyse de l'échantillon de cheveux met en évidence le fentanyl à une concentration de 644 pg /mg (cf figure 3). Étant donné que les cheveux poussent à la vitesse d'1 cm environ par mois et que la mèche mesure 3 cm, cette concentration représente la consommation moyenne de l'individu sur une période de trois mois.

Cette concentration est supérieure à celles décrites dans les deux cas précédents, 20 pg/mg (6) et 100 pg/mg (7), mais reste particulièrement faible comparée à celle des autres xénobiotiques dosés dans les cheveux.

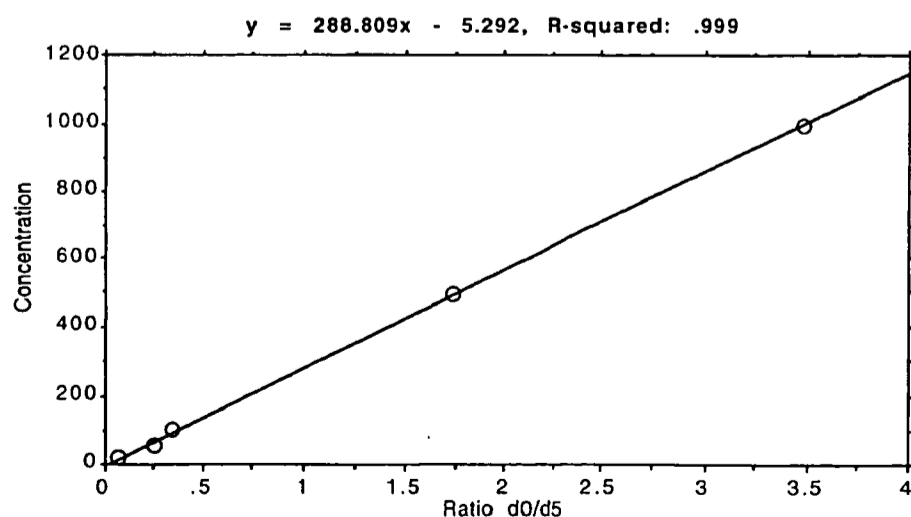


Figure 2 : Courbe de calibration pour des concentrations de fentanyl de 20 à 1000 pg/mg ($y = 288,809x - 5,292$; $r^2 = 0,999$).

D:\fentanyl\fent3110i
echantillon(80mg), eimsms-SRM-LR2-argon0,2
RT: 10.98 - 12.92

10/26/00 01:46:19 AM

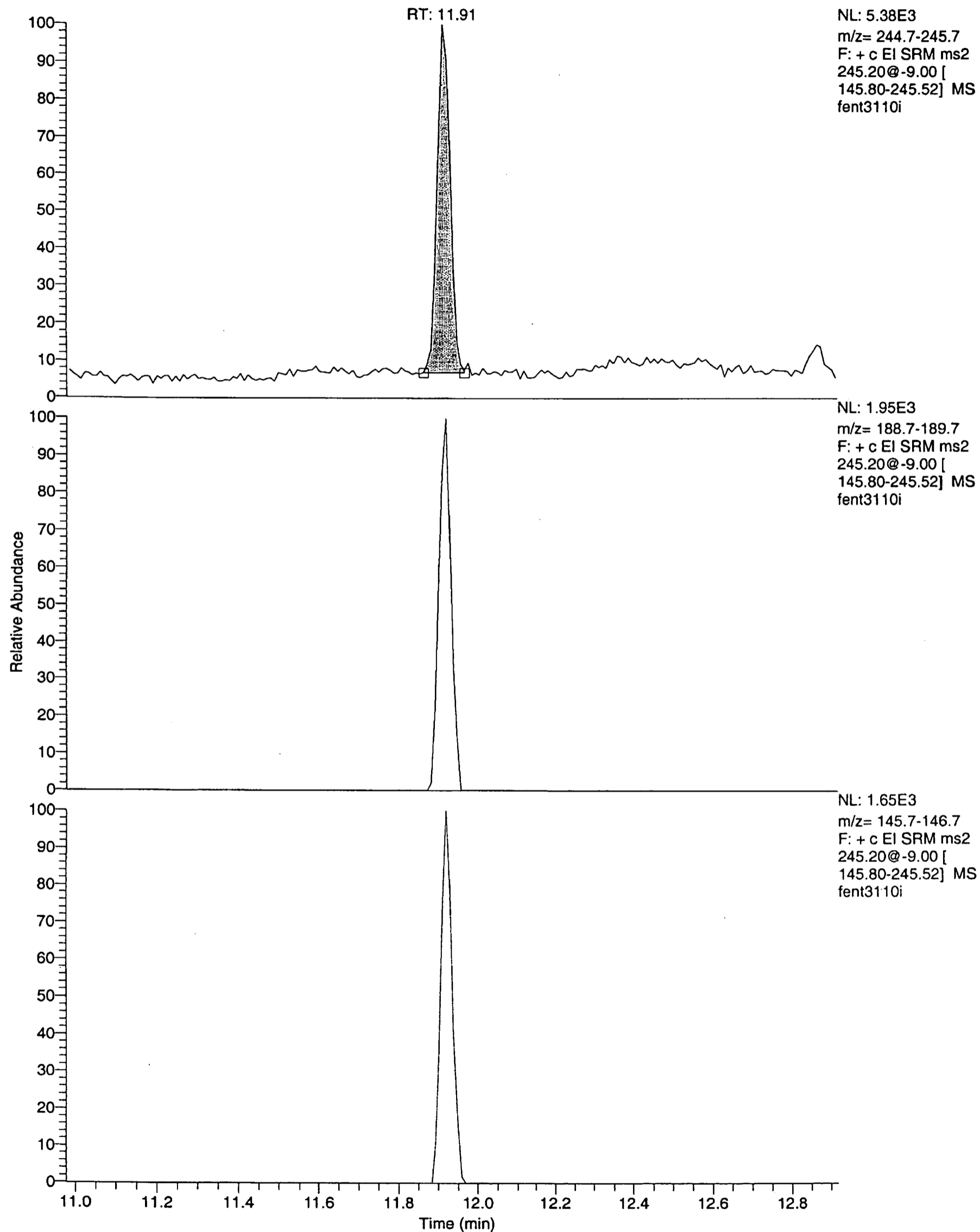


Figure 3 : Chromatogramme obtenu par CPG/SM/SM à partir de l'échantillon de cheveux prélevé. Le tracé du haut représente l'ion parent (m/z 245) et les deux tracés du bas les ions fils (m/z 189 et 146) issus de la fragmentation de l'ion parent.

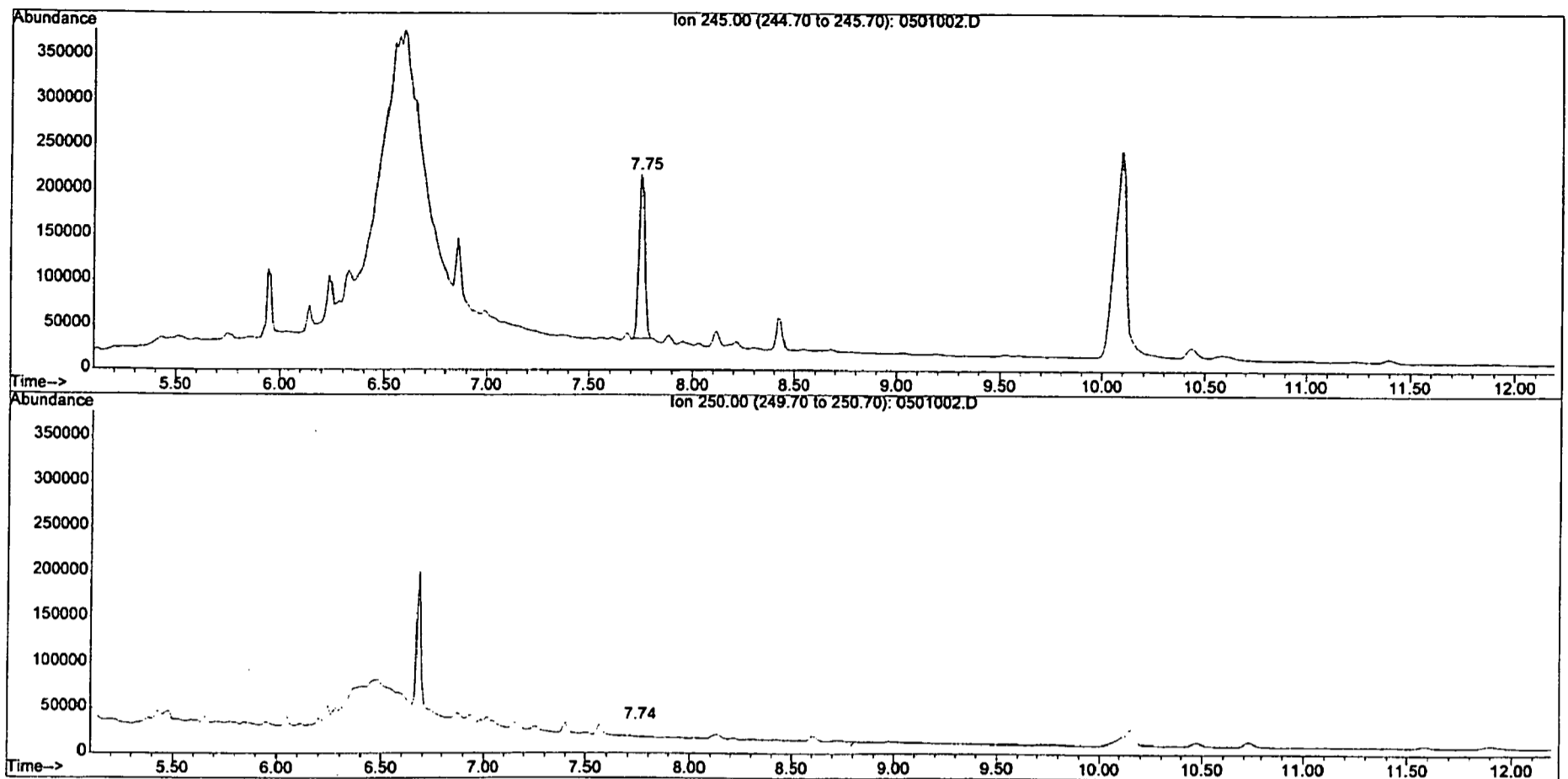


Figure 4 : Chromatogramme obtenu par CPG/SM à partir de l'échantillon de cheveux prélevé.

L'analyse des cheveux permet donc de mettre en évidence des résultats urinaires négatifs suite à une abstinence momentanée durant les quelques jours précédant le prélèvement. Dans notre cas et pour des cas similaires, l'analyse des cheveux est un outil indispensable mis au service de la Justice.

Notre échantillon a également été injecté sur un chromatographe "HP 6890" couplé à un spectromètre de masse "HP 5973" (CPG/SM), à titre de comparaison. Le chromatogramme obtenu est présenté en figure 4. L'acquisition est réalisée en mode SIM (selected ion monitoring) sur 4 ions (m/z 245, 189, 146, 250). Le temps de rétention du fentanyl est inférieur à celui observé en CPG/SM/SM : cela est dû à l'injection pulsée de l'échantillon (4 μ l) ainsi qu'à la température initiale du four de 150° C (contre 60° C en CPG/SM/SM). Comparé au tracé observé sur la CPG/SM de pailleasse, le spectromètre de masse tandem engendre un gain de spécificité qui abaisse considérablement le bruit de fond du signal des ions fils. C'est une particularité importante, surtout en Médecine Légale, où l'observation d'un faux positif peut avoir de graves conséquences.

Conclusion

Ce papier relate le cas d'un médecin soupçonné de consommer illégalement du fentanyl. Après l'échec de plusieurs analyses urinaires, l'analyse de ses cheveux a permis de conclure à un abus chronique de ce stupéfiant.

Références

1. Maki D.G., Klein B.S., McCormick R.D., Alvarado C.J., Zilz M.A., Stolz S.M., Hassemmer C.A., Gould J., Liegel A.R. Nosocomial *Pseudomonas pickettii* bacteremias traced to narcotic tampering : A case for selective drug screening of health care personnel. *J. Am. Med. Assoc.* 1991 ; 265 : 981-986.
2. Ward C.F., Ward G.C., Saidman L.J. Drug abuse in anesthesia training programs : a survey. *J. Am. Med. Assoc.* 1970 through 1980 ; 250 : 922-925.
3. Rosenberg M. Drug abuse in oral and maxillofacial training programs. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 44 : 458-462.
4. 1993 Physicians Desk Reference (47th Edition). Medical Economics Company. Montvale, NJ, 1993 : 1160-1164.
5. Wang W-L., Cone E., Zacny J. Immunoassay evidence for fentanyl in hair of surgery patients. *Forensic Science International.* 1993 ; 61 : 65-72.
6. Selavka C.M., Mason A.P., Riker D., Crookham S. Determination of fentanyl in hair : the case of the crooked criminalistic. *Journal of Forensic Sciences.* 1995 ; 40 : 681-685.
7. Sachs S., Uhl M., Hege-Scheuing G., Schneider E. Analysis of fentanyl and sufentanyl in hair by GC/MS/MS. *Int. J. Leg. Med.* 1996 ; 109 : 213-215.