

Desarrollo y validación de un método HPLC-HRMS para la verificación de la exposición a análogos del fentanilo en orina: armas químicas no tradicionales

Repilado-Álvarez A^{1a}, Cavanillas-Alonso S², Mena-Pérez-Montaut S³, Urquía-Grande ML², Cuadrado-Berrocal I⁴, Guerra-Guirao JA^a, Llorente-Ballesteros MT⁴

Sanid. mil. 2025; 81 (3): 142-149, ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Antecedentes. Los derivados del fentanilo forman parte de un grupo variado de compuestos que actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) y que el Consejo Asesor Científico de la Organización para la Prohibición de Armas Químicas (OPAQ) ha clasificado como agentes no tradicionales. El posible empleo de este tipo de agentes con fines tácticos o de terrorismo es una amenaza creciente. El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico basado en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-HRMS) para la cuantificación simultánea de alfentanilo, carfentanilo, fentanilo, remifentanilo, sufentanilo, norfentanilo, norcarfentanilo y norsufentanilo en muestras de orina. **Material y Método.** El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema UHPLC Vanquish Flex acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Orbitrap Exploris 120 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La validación del método se realizó tomando como referencia las directrices de la *Guía ICH M10 sobre validación de métodos bioanalíticos*. **Resultados.** El método desarrollado permitió la cuantificación simultánea de ocho derivados del fentanilo con un límite inferior de cuantificación de 1 ng/ml. La validación incluyó estudios de selectividad, *carry-over*, linealidad, efecto matriz, precisión y exactitud intra e interdía, estabilidad y dilución. En todos los casos se cumplieron los criterios de aceptación establecidos. **Conclusiones.** El procedimiento desarrollado y validado, aplicable a muestras de orina, puede ser útil para verificar la exposición a análogos del fentanilo en el contexto del posible empleo de este tipo de sustancias como armas químicas no tradicionales.

PALABRAS CLAVE: Agentes químicos de guerra, Agentes que actúan sobre el sistema nervioso central, Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.

INTRODUCCIÓN

Los opioides son compuestos ampliamente utilizados en terapéutica como analgésicos, con indicaciones que incluyen el manejo del dolor crónico intenso y la analgesia epidural en el tratamiento del dolor postoperatorio. Entre los opioides sintéticos más representativos se encuentra el fentanilo, un compuesto aproximadamente cien veces más potente que la morfina, desarrollado en la década de los sesenta por la farmacéutica Janssen¹. Los análogos del fentanilo, pertenecientes a la familia de las anilidopiperidinas (como alfentanilo, carfentanilo, sufentanilo y remifentanilo), actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) causando pérdida del nivel de conciencia y depresión respiratoria². El sufentanilo es aproximadamente de 5 a 10 veces más

potente que el fentanilo³, mientras que el alfentanilo tiene un 25 % de su potencia y una duración de acción tres veces menor, pero un inicio de acción hasta cuatro veces más rápido⁴. El carfentanilo, es el más potente de este grupo, con una potencia entre 20 y 100 veces superior a la del fentanilo⁵.

El remifentanilo, por su parte, presenta una potencia similar a la del fentanilo, pero se caracteriza por un inicio de acción más rápido y una duración de acción ultracorta debido a su metabolismo único⁶. A diferencia de otros análogos, es metabolizado por esterases plasmáticas, que producen ácido remifentanílico como metabolito principal⁷. En general, los análogos del fentanilo son metabolizados principalmente en el hígado mediante la enzima citocromo P450 3A4 (CYP3A4) produciendo metabolitos como norfentanilo, norsufentanilo y norcarfentanilo, que son excretados por la orina. En algunos casos, también se detectan cantidades residuales del compuesto inalterado⁸⁻¹⁰.

Fuera del contexto terapéutico, los análogos del fentanilo han encontrado aplicaciones ilícitas. Debido a su alta potencia y bajo coste de producción, son empleados para adulterar heroína¹¹ y contribuyen a la actual crisis de salud pública asociada al consumo de opioides conocida como la «tercera ola»¹².

En el ámbito táctico, los derivados del fentanilo también han sido utilizados. Destaca el incidente de la crisis de rehenes del teatro Dubrovka de Moscú (2002). Durante esta operación, las fuerzas de seguridad rusas emplearon una mezcla de anestésicos basada en carfentanilo y remifentanilo que produjo la muerte de, al menos, 123 rehenes¹³.

1. Teniente farmacéutico. Laboratorio de Agresivos Químicos en Muestras Biológicas. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

a. Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, Madrid (España).

2. Área de Cromatografía. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

3. Capitán farmacéutico. Garantía de Calidad. Instituto de Toxicología de la Defensa, Madrid (España).

4. General de brigada farmacéutico. Subinspección General de Apoyo y Ordenación Farmacéutica. Inspección General de Sanidad de la Defensa, Madrid (España).

Dirección para la correspondencia: Adrián Repilado Álvarez. Instituto de Toxicología de la Defensa. Complejo Hospitalario Gómez Ulla. Glorieta del Ejército s/n. 28047. Madrid. España. email: arepalv@mde.es

Recibido: 23 de enero de 2025

Aceptado: 14 de febrero de 2025

Cabe señalar que, para entonces, ya estaba en vigor la Convención sobre las Armas Químicas (CAC). Este tratado internacional recoge en sus listas anexas algunas sustancias químicas tóxicas y precursores sujetos a medidas de verificación¹⁴.

La posible aplicación de los derivados del fentanilo como agentes químicos, erróneamente denominados «no letales», ha sido objeto de investigación por diferentes países entre los que se incluyen India e Irán, que han alegado propósitos defensivos o científicos¹⁵. Los derivados del fentanilo forman parte de un grupo variado de compuestos que actúan sobre el SNC y que el Consejo Asesor Científico de la Organización para la Prohibición de Armas Químicas (OPAQ) ha denominado *CNS-acting chemicals*¹⁶. Aunque no están específicamente incluidos en las listas anexas de la CAC, la OPAQ los clasifica como «agentes no tradicionales», un grupo que también incluye sustancias como las biotoxinas¹⁷.

A pesar de que la destrucción de todas las armas químicas tradicionales declaradas por los Estados parte de la CAC se completó en 2023¹⁸, la amenaza asociada a los agresivos químicos no tradicionales, incluidos los derivados del fentanilo, persiste¹⁷.

En una reciente revisión llevada a cabo por el Instituto de Toxicología de la Defensa sobre los riesgos asociados a la exposición al carfentanilo y sus antecedentes históricos, se consideró justificada la necesidad de desarrollar un método analítico para su detección¹⁹.

Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico basado en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-HRMS) para la cuantificación simultánea de alfentanilo, carfentanilo, fentanilo, remifentanilo, sufentanilo, norfentanilo, norcarfentanilo y norsufentanilo en muestras de orina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales de referencia y reactivos

Los materiales de referencia utilizados en este estudio incluyeron alfentanilo HCl (ALF), carfentanilo oxalato (CAR), fentanilo (FEN), remifentanilo HCl (REM), sufentanilo citrato (SUF), norcarfentanilo oxalato (NCAR) y norfentanilo oxalato (NFEN). Todos ellos fueron suministrados por Cerilliant (Round Rock, TX, EE. UU.). El norsufentanilo (NSUF) fue adquirido de Cayman Chemical (Ann Arbor MI, EE. UU.). Los estándares internos (SI) marcados isotópicamente, fentanilo-d₅ (FEN-d₅) y carfentanilo-d₅ oxalato (CAR-d₅), también fueron suministrados por Cerilliant. De acuerdo con las especificaciones indicadas en los certificados de análisis emitidos por los fabricantes, todos los patrones presentaban una pureza superior al 99 % excepto NSUF cuya pureza fue de 98,3 %. Dada la elevada actividad de estos compuestos, el manejo de los materiales de referencia se realizó extremando las precauciones, con guantes y protección ocular y trabajando en una campana de extracción.

Otros reactivos empleados en la preparación de muestras y separación cromatográfica fueron acetonitrilo (PanReac), agua ultrapura, metanol y ácido fórmico (Fisher Chemical).

Preparación de soluciones estándar

Se prepararon dos soluciones madre que contenían los ocho patrones de referencia disueltos en metanol a una concentración de 0,5 µg/ml. A partir de una de estas soluciones madre, se prepararon, mediante dilución en metanol, dos soluciones hijas con concentraciones de 20 ng/ml y 10 ng/ml. La segunda solución madre fue utilizada para preparar una dilución hija en metanol con una concentración de 20 ng/ml.

Una de estas series fue empleada durante el proceso de validación para la preparación de las curvas de calibrado, mientras que la otra se utilizó de manera independiente para la preparación de los controles de calidad (QCs).

Adicionalmente, se preparó una solución de trabajo que contenía los dos estándares internos disueltos en metanol a una concentración de 1 µg/ml.

Todas las soluciones se almacenaron en recipientes de vidrio, protegidas de la luz, y a una temperatura de -20 °C.

Preparación de muestras, puntos de calibración y controles de calidad

Para la preparación de las muestras se tomaron 100 µl de orina previamente centrifugada a 14500 rpm durante diez minutos y se transfirieron a un vial de HPLC. Después, se añadieron 5 µl de SI (FEN-d₅, CAR-d₅, 1 µg/ml en metanol), 95 µl de metanol y 800 µl de agua ultrapura, con lo que se obtuvo una dilución final de la muestra con un factor de 10. La mezcla se homogenizó mediante agitación en vórtex antes de su análisis directo.

Los puntos de calibración y QCs se prepararon siguiendo el procedimiento anterior, añadiendo sobre orina blanca solución estándar y ajustando el volumen de metanol para mantener una proporción de 100 µl de solvente orgánico en un volumen final de 1000 µl.

Nivel de calibración	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentración final [ng/ml]	0,05	0,1*	0,2*	0,5	1*	2,5	5	7,5	10*
Volumen solución estándar [µL]	5	5	10	25	50	5	10	15	20
Concentración solución estándar [ng/ml]	10	20	20	20	20	500	500	500	500
Volumen metanol [µL]	90	90	85	70	45	90	85	80	75

Tabla 1. Preparación de los niveles de calibración.

*Niveles empleados como controles de calidad.

Análisis por LC-HRMS

El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema UHPLC Vanquish Flex acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Orbitrap Exploris 120 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La separación cromatográfica se realizó empleando una columna ACE Excel 2 C18-PFP (100 x 3,0, 2 µm) equipada con un precalentador de columna, que mantuvo el compartimento a una temperatura de 40 °C. La fase móvil consistió en agua ultrapura con un 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con un 0,1 % (v/v) de ácido fórmico (B). El flujo de la fase móvil se fijó en 500 µl/min y el volumen de inyección fue de 10 µl.

Para la separación cromatográfica de los compuestos se recurrió al siguiente gradiente de eluyentes: 5 % de B desde el minuto 0.00 hasta el 0.50; aumento de 5 % a 100 % de B entre el minuto 0.50 y el 09.00; mantenimiento de 100 % de B durante 2,50 minutos más, seguido de un descenso al 5 % en 0,10 minutos. Se estableció un tiempo de equilibrado de columna de 3,50 minutos antes de cada inyección de muestra. La duración del método fue de 15,00 minutos por muestra. Los tiempos de retención de cada compuesto se muestran en la tabla 2.

El sistema se configuró con una fuente de ionización por *electrospray* en modo H-ESI (*Heated-Electrospray Ionization*), operando en polaridad positiva bajo las siguientes condiciones: voltaje de *spray* de 3800 V, gas de revestimiento (*sheath gas*) ajustado a treinta unidades arbitrarias (Arb), gas auxiliar a 7 Arb y gas de barrido (*sweep gas*) a 1 Arb. La temperatura del tubo de transferencia de iones se estableció en 320 °C y la del vaporizador en 300 °C. Estas condiciones se optimizaron a partir de un procedimiento experimental basado en la infusión de alto flujo (*teed-flow*) de cada uno de los patrones analíticos a una concentración de 1 ppm en metanol. Este paso permitió ajustar los parámetros de la fuente de ionización y seleccionar las transiciones más adecuadas para cada compuesto.

Compuesto	Fórmula	Ion precursor [m/z]	Ion producto [m/z]	Ion producto 2 [m/z]	Energía de colisión [eV]	Tiempo de retención [min]
Alfentanilo	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₃	417,2609	268,1765	197,1281	30	4,76
Carfentanilo	C ₂₄ H ₃₀ N ₃ O ₃	395,2588	335,2115	246,1486	30	5,29
Fentanilo	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O	337,2274	188,1433	105,0698	50	4,97
Remifentanilo	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	377,2071	228,1227	317,1856	30	4,32
Sufentanilo	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂ S	387,2101	238,1258	355,1833	30	5,43
Norcarfentanilo	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₃	291,1703	231,1489	142,0861	30	3,92
Norfentanilo	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O	233,1648	84,0807	177,1384	30	3,70
Norsufentanilo	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	277,1911	128,1068	96,0807	30	4,20
Carfentanilo-d ₃	C ₂₄ H ₂₅ D ₃ N ₃ O ₃	400,2643	284,2160	-	30	5,28
Fentanilo-d ₃	C ₂₂ H ₂₅ D ₃ N ₂ O	342,2588	188,1433	-	30	4,96

Tabla 2. Transiciones PRM, tiempos de retención y energía de colisión empleados en el método.

La adquisición de los datos se llevó a cabo utilizando los métodos de trabajo *Paralell Reaction Monitoring* (PRM) y *Full Scan Data-Dependent MS/MS* (*full scan ddMS²*). El modo PRM (resolución: 15 000) se empleó para la cuantificación de los analitos seleccionados, mientras que el modo *full scan ddMS²* (resolución 120 000, *scan range* [m/z]: 150-550) se utilizó para la detección de compuestos desconocidos mediante el *software* Compound Discoverer 3.3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

El control del espectrómetro de masas se llevó a cabo mediante el *software* Orbitrap Exploris Tune (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los *softwares* XCalibur y TraceFinder 5.1 General Quan (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) se utilizaron para el control integral del sistema, la adquisición de datos y el procesamiento cuantitativo y cualitativo de los datos.

Validación del método

La validación del método se realizó tomando como referencia las directrices de la última actualización de la *Guía ICH M10*

sobre validación de métodos bioanalíticos y análisis de muestras de estudio²⁰.

Selectividad

La selectividad del método analítico se evaluó mediante el análisis de seis muestras en blanco de matriz de orina provenientes de diferentes donantes voluntarios. Este procedimiento permitió determinar la capacidad del método para diferenciar los analitos de interés y los estándares internos de compuestos endógenos presentes en la matriz. Como criterio de aceptación para la validación, se estableció que la señal detectada en las muestras en blanco de matriz no debía superar el 20 % de la respuesta del analito en el límite inferior de cuantificación (LLOQ) ni el 5 % de la señal del estándar interno en la muestra cero.

Carry-over

El efecto de *carry-over* se evaluó mediante la inyección alternada de un QC de concentración alta (10 ng/ml) y un blanco matriz con el objetivo de evaluar la presencia de analitos residuales procedentes de la inyección previa. Esta secuencia se repitió seis veces utilizando muestras en blanco de diferente origen. En caso de ser detectado algún analito en el blanco matriz, se calculó el porcentaje del área correspondiente a la señal del LLOQ para dicho analito. Como criterio de aceptación para la validación se estableció que la señal del blanco matriz no debía superar el 20 % de la señal del analito en el LLOQ ni el 5 % de la señal del estándar interno en la muestra cero.

Linealidad

El rango de calibración fue establecido basándose en datos bibliográficos y en las concentraciones descritas en orina en casos de intoxicación²¹. La curva de calibrado incluyó una muestra en blanco, una muestra cero (muestra en blanco con SI) y al menos seis puntos de calibración distribuidos a lo largo del rango esperado de concentración (de 1 ng/ml a 100 ng/ml).

La linealidad se evaluó mediante la preparación y el análisis de rectas de calibración con nueve niveles de concentración, analizadas en seis días diferentes. Se calculó el *response ratio*, definido como la relación entre las áreas del pico del analito y su correspondiente estándar interno (FEN-d5 para la cuantificación de ALF, FEN, NFEN, NSUF, REM y CAR-d5 para la cuantificación de CAR, SUF, NCAR).

La calibración se llevó a cabo utilizando un ajuste cuadrático, con la aplicación de la función de ponderación 1/X para garantizar una representación adecuada de las concentraciones más bajas.

Como criterios de aceptación para la validación de la linealidad, se estableció una exactitud del ± 20 % del valor nominal de cada punto de calibración y un coeficiente de correlación (R^2) superior a 0,99.

Límite inferior de cuantificación

El LLOQ se definió como la concentración más baja para la cual se cumplieron los criterios preestablecidos de precisión y exactitud, intra e interdía.

Precisión y exactitud

La evaluación de la precisión y la exactitud se llevó a cabo utilizando QCs de cuatro niveles de concentración: LLOQ, bajo, medio y alto.

El análisis intradía se realizó mediante cinco réplicas independientes de cada nivel de QC. La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV), calculado como el cociente entre la desviación estándar y la media y expresado como porcentaje. La exactitud se determinó como el cociente entre el valor medido y el valor nominal, expresado en porcentaje (% recuperación). Adicionalmente, la exactitud se reportó como %Bias. Los criterios de aceptación para la validación incluyeron una exactitud dentro del ±20 % del valor nominal para el LLOQ y de ±15 % para los demás niveles de QC evaluados. La precisión máxima aceptable se estableció en 20 % para el LLOQ y en 15 % para el resto de los niveles de QCs.

La precisión y exactitud interdía se analizaron mediante el procesamiento de datos provenientes de siete tandas de trabajo realizadas en seis días diferentes que incluyeron todos los niveles de QC por duplicado. Los criterios de aceptación para la validación fueron los mismos que los definidos para el análisis de estos parámetros intradía.

Efecto matriz

El efecto matriz se evaluó mediante el análisis de tres replicados de los QCs bajo y alto, empleando seis orinas provenientes de diferentes donantes voluntarios. Como criterios de aceptación para la validación, se estableció una exactitud dentro del ±15 % del valor nominal para cada uno de los QCs y una precisión máxima aceptable del 20 % (%CV) para los niveles de calibración evaluados.

Estudio de dilución

El factor de dilución máximo del método se evaluó mediante el análisis de muestras preparadas con una concentración inicial

de 1 µg/ml. Estas muestras fueron diluidas diez veces utilizando orina blanca como matriz diluyente. Con posterioridad, las muestras diluidas fueron preparadas para su análisis siguiendo el procedimiento descrito en este trabajo.

El análisis de las muestras se realizó en seis réplicas procesadas en una misma tanda de trabajo. Los criterios de aceptación para la validación se establecieron considerando una precisión (%CV) ≤15 % y una exactitud media entre 85-115 % de la concentración nominal.

Estabilidad de los analitos en las muestras

Se evaluó la influencia de las condiciones de almacenamiento en la estabilidad de los derivados del fentanilo mediante análisis realizados a 0 h y 168 h. Se utilizó una muestra de orina con una concentración inicial de 50 ng/ml contenida en tubos de polipropileno almacenados en refrigeración (2-6 °C). En cada tiempo de análisis, se realizaron mediciones en seis réplicas. Se calculó el porcentaje de compuesto remanente a las 168 horas sobre la concentración inicial. Adicionalmente, los datos obtenidos fueron analizados asumiendo un comportamiento cinético de primer orden para estimar la constante de degradación *k*.

RESULTADOS

El método desarrollado fue validado para cuantificar de manera simultánea ocho análogos del fentanilo en muestras de orina. La correcta separación cromatográfica de los analitos puede observarse en la figura 1. El límite inferior de cuantificación fue 1 ng/ml para todos los compuestos incluidos en el estudio.

La evaluación de la selectividad demostró la capacidad del método analítico para diferenciar los analitos de interés y los estándares internos de los compuestos endógenos presentes en

Compuesto	Precisión intradía [%CV]				Exactitud intradía [Bias% (X ± s)]			
	LLOQ	Bajo	Medio	Alto	LLOQ	Bajo	Medio	Alto
Alfentanilo	6,9	4,4	4,9	2,4	4,6 (0,105±0,07)	-3,3 (0,193±0,009)	2,6 (1,026±0,051)	-2,1 (9,792±0,236)
Carfentanilo	10,5	7,2	1,9	1,9	3,4 (0,103±0,011)	-0,4 (0,199±0,014)	3,2 (1,032±0,043)	-5,0 (9,496±0,179)
Fentanilo	6,7	3,7	1,6	1,6	4,8 (0,105±0,007)	-1,4 (0,197±0,007)	1,5 (1,015±0,016)	-2,4 (9,762±0,156)
Remifentanilo	10,5	3,0	4,6	2,9	-7,4 (0,093±0,010)	-6,5 (0,187±0,006)	-6,1 (0,939±0,043)	-8,0 (9,201±0,266)
Sufentanilo	7,8	5,8	2,7	1,5	5,6 (0,106±0,008)	0,8 (0,202±0,012)	2,7 (1,027±0,028)	-3,1 (9,695±0,145)
Norcarfentanilo	6,5	4,1	4,1	3,3	19,6 (0,120±0,008)	4,3 (0,209±0,009)	10,5 (1,105±0,046)	-3,9 (9,612±0,322)
Norfentanilo	7,0	1,7	3,7	2,9	9,4 (0,109±0,008)	3,5 (0,207±0,004)	10,8 (1,108±0,041)	0,5 (10,045±0,289)
Norsufentanilo	8,0	6,4	4,6	2,8	2,6 (0,103±0,008)	5,0 (0,210±0,013)	-9,5 (1,095±0,050)	-1,1 (9,894±0,278)

Tabla 3. Precisión y exactitud intradía (n=5) calculados para los diferentes QCs en muestras de orina.

Compuesto	Precisión interdía [%CV]				Exactitud interdía [%Bias (X ± s)]			
	LLOQ	Bajo	Medio	Alto	LLOQ	Bajo	Medio	Alto
Alfentanilo	7,6	5,2	2,8	5,0	-1,4 (0,099±0,008)	-3,3 (0,193±0,010)	0,0 (1,000±0,028)	0,7 (10,069±0,505)
Carfentanilo	9,4	5,9	5,5	8,1	-3,5 (0,097±0,009)	-3,3 (0,193±0,011)	0,5 (1,005±0,056)	-0,9 (9,910±0,798)
Fentanilo	8,2	4,1	3,1	3,8	-1,4 (0,099±0,008)	-4,2 (0,192±0,008)	-1,1 (0,989±0,031)	-0,1 (9,986±0,383)
Remifentanilo	13,2	8,7	4,5	5,3	0,4 (0,100±0,013)	-3,0 (0,194±0,017)	-1,8 (0,982±0,044)	-2,7 (9,729±0,518)
Sufentanilo	9,7	5,2	6,8	7,9	3,6 (0,104±0,010)	-2,8 (0,194±0,010)	0,0 (1,001±0,068)	0,0 (10,001±0,788)
Norcarfentanilo	16,8	10,3	5,4	8,2	1,1 (0,101±0,017)	-2,7 (0,195±0,020)	1,1 (1,011±0,054)	-1,2 (9,884±0,807)
Norfentanilo	15,8	8,1	3,6	4,6	-4,0 (0,096±0,015)	-0,4 (0,199±0,016)	2,1 (1,021±0,036)	-0,5 (9,950±0,456)
Norsufentanilo	10,0	5,6	3,6	5,7	-2,0 (0,098±0,010)	-2,2 (0,196±0,011)	1,5 (1,015±0,037)	0,5 (10,049±0,569)

Tabla 4. Precisión y exactitud interdía (n=14) calculados para los diferentes QCs en muestras de orina.

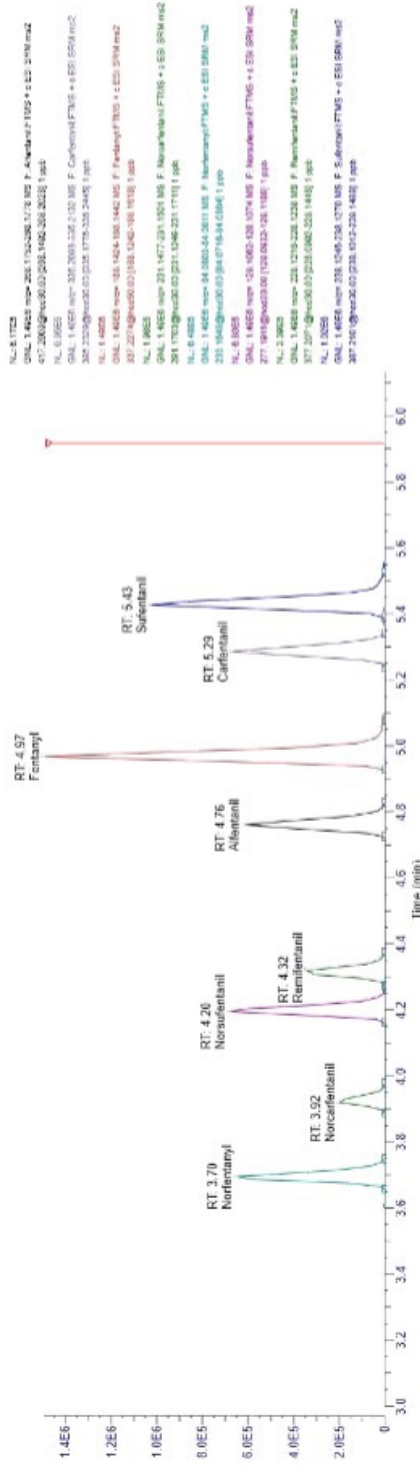


Figura 1. Cromatograma de una muestra de orina con una concentración de 10 ng/ml de alfentanilo, carfentanilo, fentanilo, remifenantilo, sufentanilo, norcarfentanilo, norfentanilo y norsufentanilo. Se representa la intensidad de señal en escala absoluta frente al tiempo expresado en minutos. Sobre cada pico se indica tiempo de retención (TR) y nombre del compuesto.

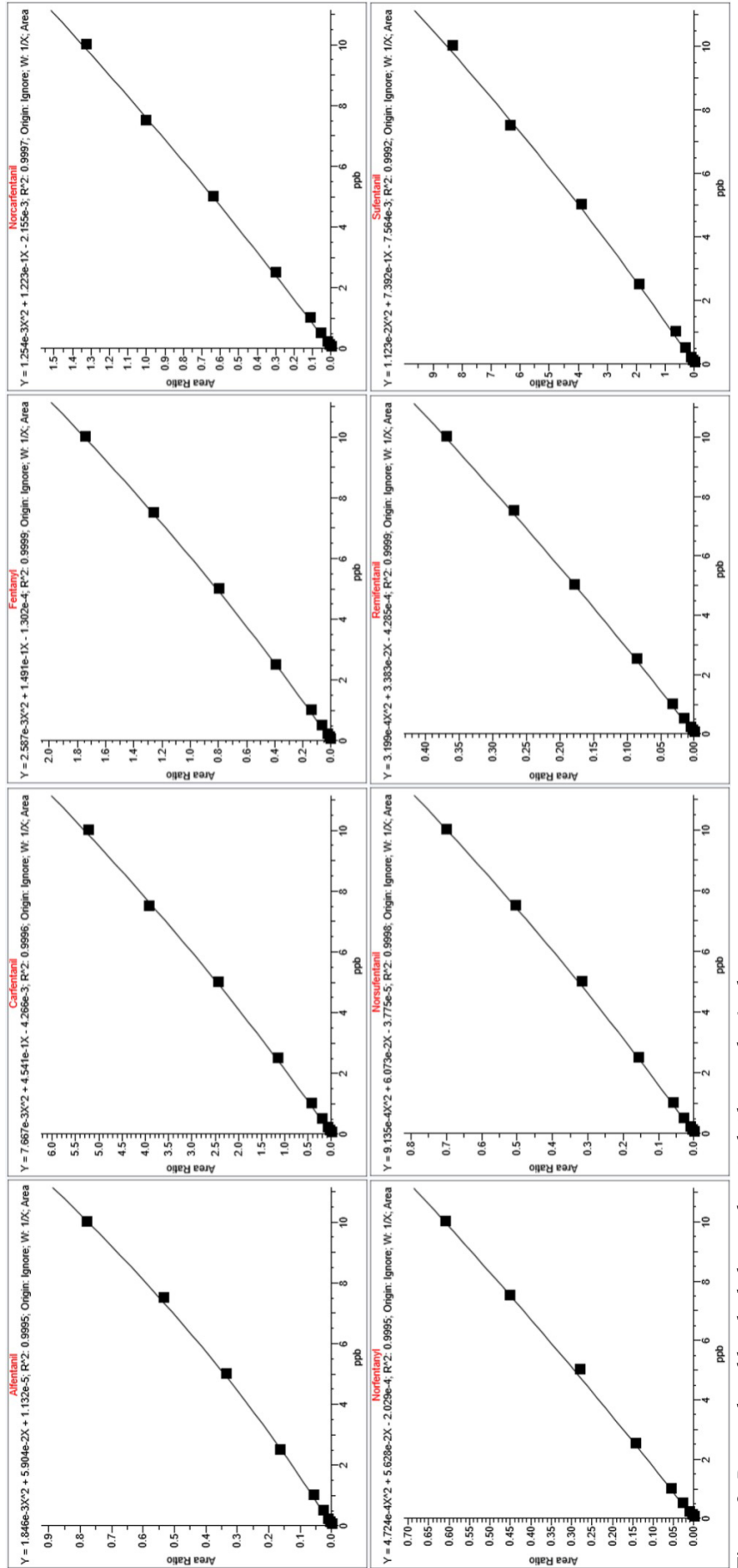


Figura 2. Rectas de calibrado de los analitos incluidos en el método.

Compuesto	Efecto matriz				Estudio dilución	
	Bajo		Alto		Alto	
	[% Recuperación ($\bar{X} \pm s$)]	[%CV]	[% Recuperación ($\bar{X} \pm s$)]	[%CV]	[%Bias ($\bar{X} \pm s$)]	[%CV]
Alfentanilo	106,5 (0,213±0,007)	3,3	98,6 (9,862±0,242)	2,5	-6,6 (9,345±0,815)	8,7
Carfentanilo	93,3 (0,187±0,009)	4,6	103,1 (10,308±0,281)	2,7	-2,1 (9,785±1,027)	10,5
Fentanilo	97,8 (0,196±0,007)	3,5	100,6 (10,054±0,231)	2,3	-4,0 (9,605±0,861)	9,0
Remifentanilo	111,8 (0,224±0,008)	3,7	105,9 (10,590±2,074)	19,6	-7,6 (9,237±0,783)	8,5
Sufentanilo	96,2 (0,192±0,006)	2,9	105,7 (10,572±0,511)	4,8	-1,2 (9,882±0,945)	9,6
Norcarfentanilo	101,8 (0,204±0,011)	5,4	106,9 (10,694±1,026)	9,6	1,8 (10,178±0,847)	8,3
Norfentanilo	106,3 (0,213±0,007)	3,2	106,2 (10,624±0,614)	5,8	2,0 (10,197±0,785)	7,7
Norsufentanilo	101,6 (0,203±0,008)	4,1	99,2 (9,921±0,524)	5,3	3,1 (10,312±0,860)	8,3

Tabla 5. Exactitud y precisión en los estudios del efecto matriz ($n=3$) y de dilución ($n=6$).

la matriz de orina. En las seis muestras en blanco de matriz analizadas no se observaron picos cromatográficos en los tiempos de retención correspondientes a los analitos ni a los estándares internos que superaran los criterios establecidos (<20 % de la respuesta al LLOQ para los analitos y <5 % para los estándares internos en la muestra cero).

En el análisis del efecto de *carry-over*, no se detectó señal en ninguna de las seis repeticiones realizadas para siete de los ocho analitos evaluados. Solo para el fentanilo se observó, en una de las muestras en blanco, una señal equivalente al 0,71 % del área de la señal del LLOQ para este compuesto. Este valor se encuentra ampliamente por debajo del límite de aceptación establecido, lo que confirma que el arrastre observado no fue significativo. En ningún caso se detectaron señales de los estándares internos en los blancos.

Las curvas de calibración presentaron coeficientes de correlación no inferiores a 0,99 en el rango de concentración validado (figura 2).

Los resultados de precisión y exactitud de los estudios intradía e interdía se muestran con detalle en las tablas 3 y 4, respectivamente. Para todos los compuestos analizados se cumplieron los criterios preestablecidos.

El estudio del efecto matriz demostró que la alteración sobre la exactitud y precisión causada por la presencia de componentes interferentes en la matriz sobre las respuestas de cada analito fue inferior al 15 % en todos los casos analizados, excepto para el remifentanilo (tabla 5). En el QC alto, el coeficiente de variación del remifentanilo fue del 19,6 %, mientras que para el QC bajo fue del 3,7 %.

La dilución de las muestras no afectó de manera significativa a la precisión y exactitud de las medidas de ningún analito (tabla 5). Con relación a la estabilidad, los resultados obtenidos en el intervalo de 0 a 168 horas evidenciaron diferencias en la estabilidad de los derivados del fentanilo en matriz de orina bajo condiciones de almacenamiento controladas. Las concentraciones de todos los compuestos, excepto remifentanilo, se mantuvieron estables dentro del rango 80-120 % tras el periodo de estudio. Los compuestos más estables fueron fentanilo ($k=0.00052\text{ h}^{-1}$) y alfentanilo ($k=0.00075\text{ h}^{-1}$), mientras que remifentanilo mostró la mayor tasa de degradación ($k=0.00392\text{ h}^{-1}$). La concentración de remifentanilo tras 168 horas se redujo de forma significativa (49 %). Carfentanilo ($k=0.00126\text{ h}^{-1}$) y sufentanilo ($k=0.00105\text{ h}^{-1}$) presentaron tasas de degradación intermedias. Por otro lado, los metabolitos norcarfentanilo, norfentanilo y

norsufentanilo mostraron una alta estabilidad, con concentraciones finales muy similares a las iniciales, lo que sugiere una resistencia significativa a la degradación en las condiciones estudiadas.

DISCUSIÓN

El Instituto de Toxicología de la Defensa es el órgano asesor en el ámbito toxicológico de las Fuerzas Armadas. Como parte de este cometido, se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de identificar compuestos derivados del fentanilo para los que existía evidencia de su empleo o investigación con potenciales aplicaciones fuera del contexto médico (mantenimiento del orden, guerra o terrorismo). Entre los compuestos identificados se encuentran CAR, REM, ALF, SUF y FEN. Una consulta con la palabra «fentanilo» en la base de datos CIMA de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios realizada en diciembre de 2024 (<https://cima.aemps.es/cimalpublicollista.html>) permitió identificar 141 referencias de medicamentos comercializados en España que contienen estos principios activos: fentanilo, remifentanilo, sufentanilo y alfentanilo. El carfentanilo fue empleado como medicamento veterinario²² y actualmente no se encuentra comercializado en España, aunque su presencia en productos ilícitos, como droga o adulterante, no es descartable. Teniendo en cuenta estos antecedentes, todos estos compuestos y sus metabolitos principales, a excepción del ácido remifentanílico, fueron incluidos en el método multianalito desarrollado por el ITOXDEF. Este compuesto no fue incluido inicialmente en el desarrollo del método debido a la no disponibilidad de material de referencia.

Este tipo de sustancias que actúan sobre el SNC, consideradas seguras bajo control médico, presentan un bajo margen de seguridad fuera de este contexto, lo que las hace incompatibles con un uso «no letal». Por este motivo, su empleo con fines tácticos está prohibido por el artículo II.2 de la Convención sobre Armas Químicas.

En 2018, el Consejo Asesor Científico de la OPAQ recomendó a la Secretaría Técnica desarrollar capacidades para llevar a cabo actividades relacionadas con la verificación en supuestos empleos de compuestos que actúan sobre el SNC²³.

Este estudio es el primero en relacionar el desarrollo de un método analítico para la cuantificación de derivados del fentanilo en muestras biológicas con su posible aplicación en un

contexto de exposición a armas químicas no tradicionales (*CNS-acting chemicals*). Sin embargo, este grupo incluye otras sustancias como los agonistas alfa-2-adrenérgicos (clonidina y dexmedetomidina) y los anestésicos inhalados (isoflurano y sevoflurano), entre otros, que también requieren métodos de detección específicos. En este sentido, aplicaciones informáticas, como «Compound Discoverer», incluida en nuestro método, pueden facilitar la búsqueda de compuestos desconocidos en muestras biológicas. Esta herramienta ha demostrado ser útil y aplicable en muestras ambientales con bajas concentraciones de análogos del fentanilo²⁴.

El procedimiento desarrollado y validado es simple, rápido y requiere un volumen de muestra reducido (100 µl), lo que minimiza el consumo de reactivos y facilita su aplicación en estudios con muestras limitadas. El LLOQ establecido en 1 ng/ml es comparable al reportado en estudios similares que emplean técnicas como extracción en fase sólida o líquida-líquida^{21,25}. Sin embargo, el factor de dilución 1:10 aplicado en la preparación de muestras podría limitar la detección de derivados del fentanilo potentes presentes en concentraciones extremadamente bajas (inferiores a 1 ng/ml)²⁶.

En el análisis de una muestra de orina de un paciente expuesto al carfentanilo durante el incidente de Moscú, que fue recogida cinco días más tarde y analizada por el laboratorio de la Defensa de Reino Unido, se detectó norcarfentanilo a una concentración aproximada de 0,1 ng/ml¹³. En este sentido, podría ser útil recurrir a un procedimiento de extracción como el empleado por este centro que permitiera la cuantificación a partir de 0,1 ng/ml. Este tipo de procedimientos han sido aplicados en los métodos publicados por Jung *et al.*²⁷ y Moody *et al.*²⁸ alcanzando límites de cuantificación más bajos.

Por otro lado, el método ha sido validado para muestras de orina, por lo que su aplicación en matrices biológicas más complejas como sangre requerirá una validación adicional. En la validación del método se siguieron las recomendaciones de las guías ICH M10 elaboradas por la Agencia Europea del Medicamento. Esta guía permite a los usuarios adaptar el nivel de cualificación según el propósito del estudio. Teniendo en cuenta el ámbito de aplicación de este método, se decidió modificar algunos criterios respecto a los recomendados en la guía, que fueron: exactitud de los puntos de calibración de las rectas, permitiendo hasta un 20 % en lugar de un 15 %, y precisión en la evaluación del efecto matriz, permitiendo un 20 % en lugar de un 15 %. Estos nuevos límites fueron establecidos antes del proceso de validación basándose en los resultados de estudios que emplearon métodos similares, como el publicado por Cooreman *et al.*²⁹.

El remifentanilo es un éster carboxílico que, en medios acuosos, puede sufrir hidrólisis espontánea para formar su metabolito principal, el ácido remifentanílico, considerablemente más estable. Este proceso puede ser influenciado por factores como el pH de la orina, la temperatura, el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta el análisis o la posible presencia de enzimas esterases. Estos factores tienen un impacto menor en la estabilidad del estándar interno asociado en nuestro método al remifentanilo (FEN-d5). El método desarrollado evaluó el efecto de diferentes matrices sobre remifentanilo y no sobre ácido remifentanílico, por lo que era previsible que la precisión (%CV) pudiera superar el 15 % recomendado por las guías de referencia.

Precisamente, una limitación importante de este trabajo es que no incluyó el ácido remifentanílico. Este analito fue también objeto de estudio en la muestra de orina del paciente expuesto al gas anestésico en Moscú, aunque no fue detectado debido, probablemente, al tiempo transcurrido desde la exposición hasta la toma de muestra¹³. Por otro lado, el estudio de estabilidad evidenció la poca estabilidad del remifentanilo, pero asumió un modelo cinético de primer orden y solo evaluó dos puntos de tiempo (de 0 a 7 días). Tampoco se estudiaron variables que podrían haber influido en la degradación de los compuestos y variar significativamente entre individuos.

CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo se describe el desarrollo y la validación de un método para la cuantificación simultánea de ocho análogos del fentanilo aplicable en muestras de orina para verificar la exposición a sustancias que actúan sobre el SNC y que pueden ser utilizadas con fines prohibidos según la Convención sobre Armas Químicas. El método desarrollado requiere una preparación de muestras simple y tiene un bajo límite de cuantificación (1 ng/ml). Como continuación de este proyecto, se está trabajando en el desarrollo de nuevos métodos en diferentes matrices, así como en la detección de otras familias de compuestos capaces de actuar sobre el SNC y que podrían ser empleados como armas químicas no tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Janssen PA. A review of the chemical features associated with strong morphine-like activity. *Br J Anaesth*. Abril de 1962;34: 260-268.
- Armenian P, Vo KT, Barr-Walker J, Lynch KL. Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology*. 15 de mayo de 2018;134(Pt A): 121-132.
- Vucković S, Prostran M, Ivanović M, Dosen-Mičić L, Todorović Z, Nesić Z, *et al.* Fentanyl analogs: structure-activity-relationship study. *Curr Med Chem*. 2009;16(19): 2468-2474.
- Janssens F, Torremans J, Janssen PA. Synthetic 1,4-disubstituted-1,4-dihydro-5H-tetrazol-5-one derivatives of fentanyl: alfentanil (R 39209), a potent, extremely short-acting narcotic analgesic. *J Med Chem*. Noviembre de 1986;29(11): 2290-2297.
- Shafer SL. Carfentanil: a weapon of mass destruction. *Can J Anaesth*. Abril de 2019;66(4): 351-355.
- Feldman PL, James MK, Brackeen MF, Bilotta JM, Schuster SV, Lahey AP, *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of ultrashort- to long-acting opioid analgesics. *J Med Chem*. Julio de 1991;34(7): 2202-2208.
- CIMA: Ficha técnica Ultiva 5 mg Polvo para concentrado para solución inyectable y para perfusión. [Internet]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/61490/FT_61490.html
- CIMA: Ficha técnica Limifen 0,5 mg/ml Solución inyectable. [Internet]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/57471/FT_57471.html
- CIMA: Ficha técnica Safentil 50 mg/ml Solución inyectable y para perfusión EFG. [Internet]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/84001/FT_84001.html
- CIMA: Ficha técnica Fentanest 0,05 mg/ml Solución inyectable. [Internet]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/41764/FT_41764.html
- Frank RG, Pollack HA. Addressing the Fentanyl Threat to Public Health. *N Engl J Med*. 16 de febrero de 2017;376(7): 605-607.
- Edinoff AN, Martínez Garza D, Vining SP, Vasterling ME, Jackson ED, Murnane KS, *et al.* New Synthetic Opioids: Clinical Considerations and Dangers. *Pain Ther*. Abril de 2023;12(2): 399-421.

13. Riches JR, Read RW, Black RM, Cooper NJ, Timperley CM. Analysis of clothing and urine from Moscow theatre siege casualties reveals carfentanil and remifentanil use. *J Anal Toxicol.* 2012;36(9): 647-656.
14. OPCW [Internet]. Annex on Chemicals. Disponible en: <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/annex-chemicals>
15. Crowley M, Dando M. The use of incapacitating chemical agent weapons in law enforcement. *The International Journal of Human Rights.* 19 de mayo de 2015;19(4): 465-487.
16. OPCW [Internet]. Decision on aerosolised use of Central Nervous System-acting chemicals adopted by OPCW Conference of States Parties. Disponible en: <https://www.opcw.org/media-centre/news/2021/12/decision-aerosolised-use-central-nervous-system-acting-chemicals-adopted>
17. Pawale P. Report of the Scientific Advisory Board at its Thirty-Eighth Session.
18. OPCW [Internet]. OPCW confirms: All declared chemical weapons stockpiles verified as irreversibly destroyed. Disponible en: <https://www.opcw.org/media-centre/news/2023/07/opcw-confirms-all-declared-chemical-weapons-stockpiles-verified>
19. Repilado Álvarez A, Urquía Grande ML, Martínez Galdámez ME, Llorente Ballesteros MT, Repilado Álvarez A, Urquía Grande ML, *et al.* Carfentanilo: una doble amenaza para la salud pública. *Sanidad Militar.* junio de 2023;79(2): 118-124.
20. ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. EMA 2023. [Internet]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf
21. Eckart K, Röhrich J, Breitmeier D, Ferner M, Laufenberg-Feldmann R, Urban R. Development of a new multi-analyte assay for the simultaneous detection of opioids in serum and other body fluids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1 de septiembre de 2015;1001: 1-8.
22. Zawilska JB, Kuczyńska K, Kosmal W, Markiewicz K, Adamowicz P. Carfentanil - from an animal anesthetic to a deadly illicit drug. *Forensic Sci Int.* marzo de 2021;320: 110715.
23. Timperley CM, Forman JE, Aas P, Abdollahi M, Benachour D, Al-Amri AS, *et al.* Advice from the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons on riot control agents in connection to the Chemical Weapons Convention. *RSC Adv.* 12 de diciembre de 2018;8(73): 41731-9.
24. Drug E, Marder D, Binyamin I, Yeffet D, Gershonov E, Dagan S. Software-assisted automated detection and identification of «unknown» fentanyl analogues. *J Mass Spectrom.* enero de 2024;59(1): e4994.
25. da Cunha KF, Rodrigues LC, Huestis MA, Costa JL. Miniaturized extraction method for analysis of synthetic opioids in urine by microextraction with packed sorbent and liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2 de agosto de 2020;1624: 461241.
26. Rab E, Flanagan RJ, Hudson S. Detection of fentanyl and fentanyl analogues in biological samples using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* Julio de 2019;300: 13-18.
27. Jung J, Kolodziej A, Pape E, Bisch M, Javot L, Gibaja V, *et al.* Multiplex detection of 14 fentanyl analogues and U-47700 in biological samples: Application to a panel of French hospitalized patients. *Forensic Sci Int.* Diciembre de 2020;317: 110437.
28. Moody MT, Diaz S, Shah P, Papsun D, Logan BK. Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework. *Drug Testing and Analysis.* 2018;10(9): 1358-1367.
29. Cooreman S, Deprez C, Martens F, Van Bocxlaer J, Croes K. A comprehensive LC-MS-based quantitative analysis of fentanyl-like drugs in plasma and urine. *J Sep Sci.* septiembre de 2010;33(17-18): 2654-2662.