

Identification et dosage des principales drogues amphétaminiques dans le sang total par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

Determination of the principal illicit amphetamines in whole blood by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)

(toxicorama n°2 de 1996)

P. MARQUET *(1), G. LACHÂTRE (1), P. KINTZ (2), G. PEPIN (3), M. DEVEAUX (4), P. MURA (5)

(1) Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHRU Dupuytren, LIMOGES

(2) Institut de Médecine Légale, STRASBOURG

(3) Laboratoire d'expertises Toxiab, PARIS

(4) Institut de Médecine Légale, LILLE

(5) Laboratoire de Biochimie et Toxicologie, CHU POITIERS

*Auteur à qui adresser la correspondance:

P. MARQUET, Service de Pharmacologie et Toxicologie - CHRU Dupuytren - 87042 LIMOGES Cedex

RÉSUMÉ

Ce travail propose une méthode d'identification et de dosage dans le sang total de l'amphétamine (AM), de la méthamphétamine (MA), de la méthylènedioxyamphétamine (MDA), de la méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA) et de la méthylènedioxyéthylamphétamine (MDEA) par chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (CPG-SM), avec utilisation d'un analogue deutéré de chaque analyse comme étalon interne.

Après extraction par le diéthyl oxyde en milieu basique, les amphétamines sont dérivées par l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) puis l'extrait est purifié par lavages successifs avec de l'eau désionisée puis avec du NH_4OH à 4 %. Les rendements d'extraction sont de 85,2 % pour AM, 90,9 % pour MA, 76,5 % pour MDA, 84,1 % pour MDMA et 63,6 % pour MDEA. Après injection dans un injecteur de type splitless. La séparation est effectuée par une colonne capillaire polaire HP 5 MS 30 m x 0,32 mm. L'ionisation est réalisée par impact électronique. Un ion par étalon interne et pour les analytes, un ion de quantification et 2 ou 3 ions de confirmation ont été sélectionnés pour l'acquisition. Les limites de détection sont de 0,5 à 8 ng/mL selon les composés; la limite de quantification est de 10 ng/mL à l'exception de la MA (20 ng/mL) et de la MDA (50 ng/mL). La méthode est linéaire pour tous les composés jusqu'à 1000 ng/mL au moins, Elle est répétable et reproductible dans cette gamme. L'absence d'interférences de la part des principales autres amines sympathomimétiques (éphédrine, pseudo-éphédrine,...) a été vérifiée.

Mots clés: Amphétamines, CPG-SM, sang total

SUMMARY

Amphetamine (AM), methamphetamine (MA), methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) were determined in whole blood by GC-MS using a deuterated analog of each analyte internal standard. After a basic extraction with diethylether the amphetamines were derivatized by heptafluorobutyric anhydride (HFBA), then the extract was successively washed with deionised water and with NH_4OH 4 %. Extraction recoveries were 85.2 % for AM, 90.9 % for MA, 76.5 % for MDA, 84.1 % for MDMA and 63.6 % for MDEA. The extract were injected in a splitless-type injector, then separated on non-polar HP 5 MS, 30 m x 0.32 i.d. capillary column. After electron-impact ionisation, selected ions were monitored at m/z 240, 118, 91 for AM, m/z 254, 210, 169, 91 for MA, m/z 375, 240, 162, 135 for MDA, m/z 389, 254, 210, 162 for MDMA and m/z 403, 268, 240 for MDEA. Limit of detection were between 0.5 and 8 ng/mL. The limit of quantification were 10 ng/mL, excepted for MA (20 ng/mL) and for MDA (50 ng/mL). The method is linear to 1000 ng/mL or more. Repetability and reproducibility are satisfactory over this range. No interference from most common other sympathomimetic amines (ephedrine, pseudoephedrine...) could be noted.

Key-words: Amphetamines, GC-MS, whole blood

Introduction

Dans la perspective d'une éventuelle recherche de stupéfiants dans le sang de conducteurs impliqués dans un accident de la route, sur réquisition des forces de l'ordre, la Commission "Drogues" de la S.F.T.A. a décidé de proposer des techniques standardisées et optimisées de dosage des quatre principales familles de drogues illicites dans le sang total, par CPG-SM.

Ce travail présente la technique, recommandée par la SFTA, de dosage des principales molécules amphétaminiques illicites dans ce milieu. Il s'agit de la synthèse de diverses techniques de dosage des amphétamines proposées par les auteurs et employées dans leur laboratoire respectif (1, 2). Les molécules à analyser ont été définies d'un commun accord, Ce sont celles qui sont le plus fréquemment employées par les toxicomanes, susceptibles d'être contenues dans les contrôles externes de qualité du dosage des drogues dans le sang, qui seront bientôt proposées par la Commission "Assurance Qualité" de la S.F.T.A.:amphétamine (AM), méthamphétamine (MA), méthylènedioxyamphétamine (MDA), méthylènedioxyméthamphétamine

Matériels et méthodes

Réactifs

Le sulfate d'amphétamine, la méthamphétamine, la MDA et la MDMA ont été achetées chez SIGMA (France), la MDEA et leurs homologues pentadeutérés chez RADIANT (PROMOCHEM,France).Les solvants et solutions suivantes: diéthyl oxyde, méthanol, acétate d'éthyle, isopropanol, HCl, et NaOH, tous de qualité Normapur, ainsi que l'acétate d'éthyle de qualité Chromanorm, proviennent de chez PROLABO (France).L'ammoniaque NH₄OH ACS est un produit SIGMA (France). Le n-Hexane pour CLHP a été fourni par CARLO ERBA REAGENTI (France). L'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) est un produit PIERCE (SUPELCO, France.) Les solutions mères à 1 g/l dans le méthanol des cinq amphétamines et à 100 mg/l des cinq étalons internes deutérés, prêtes à l'emploi ou préparées au laboratoire, sont conservées à + 4°C.Une solution fille contenant les cinq analytes à 1 mg/l et une solution fille contenant les cinq étalons internes à 5 mg/l sont préparées dans l'acide chlorhydrique 0,2 N et conservées à + 4°C (pendant une semaine au maximum).

Extraction

L'analyse est réalisée à partir de sang total, recueilli avec ou sans anticoagulant. Le sang laqué (sang décongelé) est également utilisable. Les amphétamines n'étant pas ou peu glucuro- ou sulfo-conjuguées par le foie, aucune procédure d'hydrolyse préalable n'est nécessaire.

A 1 ml de sang sont ajoutés 20 µl de solution fille d'EI à 5 mg/l, 0,5 ml de NaOH 1 N et 5 ml de diéthyl oxyde, dans un tube en verre à fond rond de 15 ml. L'extraction est réalisée par agitation pendant 15 min sur un agitateur par retournement, puis centrifugation à 900 g pendant 5 min. La phase étherée est alors transférée dans un tube en verre de 10 ml à fond conique, contenant 100 µl de mélange isopropanol/HCl (99/1, v: v), puis évaporée à 30° C sous très faible courant d'azote. La dérivation est réalisée en ajoutant à l'extrait sec 100 µl de HFBA et 50 µl d'acétate d'éthyle et en laissant incuber 20 min à 70°C. Après refroidissement, la phase organique est évaporée à 30°C sous faible courant d'azote. L'extrait sec est repris par 400 µl d'hexane et 200 µl d'eau purifiée, par agitation au vortex. Après centrifugation pendant 5 mn, la phase aqueuse est rejetée et 200 µl de NH₄OH à 4 % sont rajoutés à la phase organique. Après mélange au vortex et centrifugation, la phase organique est transférée dans un autre tube à fond conique de 10 µl, évaporée à sec puis l'extrait est repris par 50 µl d'acétate d'éthyle. Une quantité de 1 µl est injectée dans le système CPG/SM. Des courbes de calibration sont préparées avec chaque série, à partir de sang total vierge, surchargé à 0, 20, 50, 100,200 et 500 ng/ml de chaque analyte.Ces échantillons standards sont extraits dans les mêmes conditions que les échantillons à doser.

Instrumentation et procédure de dosage

La séparation est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 5890 série II Hewlett-Packard, équipé d'un injecteur split/splitless et d'une colonne capillaire greffée apolaire 5 % phényl - 95 % méthyl siloxane HP 5 MS Hewlett Packard de 0,25 µm d'épaisseur de film, 30 m x 0,32 mm di. utilisant de l'hélium comme gaz vecteur. L'injecteur chauffé à 280°C est utilisé en mode splitless (temps d'ouverture 30 s), La température du chromatographe initialement de 60°C pendant 1 min, augmente de 15°C/mn jusqu'à 140°C, puis de 30 °C/mn jusqu'à 212 °C, avec un palier de 3 mn, puis elle est portée à 285°C à raison de 70 °C/mn, où elle est maintenue 3 mn. La pression du gaz vecteur est régulée à 1 kg/m² en tête de colonne. L'interface est thermostatée à 260 °C. Le spectromètre de masse MSD 5972 Hewlett-Packard réalise l'ionisation par impact électronique à 70 eV et la

détection en mode fragmentométrique. L'ensemble est piloté par un microordinateur Vectra 486/33 VL Hewlett-Packard, équipé du logiciel HPCHEM pour Windows, qui sert également à l'acquisition, à l'enregistrement et au traitement des données chromatographiques et spectrométriques. Les ions de quantification utilisés pour les étalons internes ainsi que les ions de quantification et de confirmation utilisés pour les molécules à doser sont rapportés dans le tableau 1. Pour ces dernières ont été exclus les ions appartenant également au spectre de masse de leur homologue deutéré. Les analyses sont identifiées par leur indice de rétention par rapport à leur étalon interne, et par le rapport de leurs ions de confirmation à leur ion de quantification.

Validation

Le rendement d'extraction a été calculé à partir de sang total surchargé à 100 ng/ml. La répétabilité de la technique a été calculée, à partir de sang total surchargé à 20 ng/ml et à 500 ng/ml, par extraction et dosage de cinq aliquotes de chaque surcharge le même jour. L'étude de la reproductibilité et de la linéarité a consisté à extraire et à doser chaque jour et pendant 5 jours une gamme d'étalonnage à 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 et 1 000 ng/ml dans le sang total. La limite de quantification est la plus faible concentration pour laquelle le coefficient de variation (CV) et le défaut de justesse sont inférieurs à 20 %. La limite de détection a été évaluée comme la plus faible concentration donnant un pic chromatographique supérieur ou égal à 5 fois le bruit de fond.

Résultats et discussion

La méthode d'extraction liquide-liquide proposée n'a pu faire l'économie d'étapes d'évaporation, opération délicate pour des molécules aussi volatiles que ces amphétamines. Une des techniques utilisées avant la présente mise au point était pourtant basée sur une triple extraction liquide/liquide sans évaporation; cette procédure n'a pas pu être retenue, car elle donnait des rendements d'extraction faibles. Dans la méthode standard, l'évaporation des analytes est minimisée en les ionisant au préalable et en ralentissant l'évaporation du solvant (raison de l'ajout d'isopropanol acidifié) mais aussi en interrompant le flux d'azote dès que cette opération est totale. Moyennant ces précautions, les rendements d'extraction sont très satisfaisants (tableau 11).

Trois des quatre techniques de base utilisaient une dérivation par le HFBA, également retenue ici. Cette réaction et surtout les évaporations doivent impérativement être pratiquées sous une hotte d'aspiration, le produit étant nauséabond et toxique.

Dans les conditions chromatographiques décrites, l'amphétamine, la méthamphétamine, la MDA, la MDMA et la MDEA sont parfaitement séparées (tableau 1) et ne souffrent pas d'interférence d'autres molécules amphétaminiques, en particulier de l'éphédrine et de la pseudoéphédrine (TR = 8,44 et 8,73 mn, respectivement) connues pour générer des artefacts de spectre identique à celui de la méthamphétamine (3). Un chromatogramme reconstitué sur l'ion de quantification et les ions de confirmation, correspondant à un standard à 100 ng/ml extrait, est représenté pour chaque analyte dans la figure 1. Les limites de détection sont les suivantes: AM = 1 ng/ml, MA = 2 ng/ml, MDA = 8 ng/ml, MDMA = 1 ng/ml, MDEA = 0,5 ng/ml. Les limites de quantification, constatées d'après les résultats de l'étude de reproductibilité (tableau II) sont de 10 ng/ml pour AM, MDMA et MDEA, de 20 ng/ml pour MA et de 50 ng/ml pour MDA. Les linéarités sont excellentes, de la limite de quantification jusqu'à 1000 ng/ml, pour les cinq amphétamines étudiées. La répétabilité est également satisfaisante pour toutes.

Références

(1) Kintz P., Cirimele V., Tracqui A., Mangin P.

Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4 methylenedioxyamphetamine et 3,4 methylenedioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr., 1995, 670, 162.

(2) Franceschini A., Duthel J. M., Vallon J.J

Détection spécifique par chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse des amines sympathomimétiques urinaires dans le cadre de contrôles anti-dopages.
J. Chromatogr., 1991, 541, 109.

(3) Wu A.H.B., Wong S.S., Johnson K., Ballatore A., Seifert W.E.

The conversion of ephedrine to methamphetamine and methamphetamine-like compounds during and prior to gas chromatographic/mass spectrometric analysis of CB and HFB derivatives.
Biol. Mass Spectrom., 1992, 21, 278.

Tableau I:

Temps de rétention et rapports m/z de quantification et de confirmation utilisés pour les cinq analytes et leurs étalons internes

Composé	Temps de rétention (mn)	Ion de quantification (u.m.a.)	ions de confirmation (u.m.a.)
AM - D5 (E.I.)	7.50	244	-
AM	7.52	240	118 - 91
MA - D5 (E.I.)	8,24	258	-
M.A.	8,26	254	210 - 169 - 91
MDA-D5 (E.I.)	9,51	380	-
MDA	9,52	375	240 - 162 - 135
MDMA-D5 (E.I.)	10,17	258	-
MDMA	10,19	254	389 - 210 - 162
MDEA-D5 (E.I.)	10,42	273	-
MDEA	10,44	268	403 - 240

AM = amphétamine; MA = méthomphétamine; MDA = méthylènedioxyamphétamine
MDMA = méthylènedioxyméthamphétamine; MDEA = méthylènedioxyéthylamphétamine

Tableau II: Résultats de validation de la méthode de dosage des amphétamines dans le sang total par CPG/SM

COMPOSÉS Concentration ajoutée (ng/ml)	Rendement d'extraction (%)	Répétabilité (n = 5) C.V.(%)	Etude de reproductibilité		
			Moyenne (ng/ml)	C.V.(%)	Défaut de justesse (%)
AM					
10	-	-	10,9	15,2	9,0
20	-	11,9	19,7	17,0	1,4
50	-	-	50,8	7,2	1,7
100	85.2	-	99,4	9,2	0,6
200	-	-	206,1	10,9	3,1
500	-	11,0	492,6	8,3	1,5
1000	-	-	997,9	2,0	0,2
			r = 0,99675		
MA					
10	-	-	11,7	22,5	17,3
20	-	12,7	22,4	17,9	12,1
50	-	-	50,9	6,8	1,8
100	90.9	-	98,7	5,9	1,3
200	-	-	190,5	3,4	4,7
500	-	4,8	461,0	11,5	7,8
1000	-	-	981,1	2,9	1,9
			r = 0,99025		
MDA					
10	-	-	11,85	42,2	18,5
20	-	9,9	21,4	27,2	7
50	-	-	45,3	7,9	9,4
100	76.5	-	102,7	4,9	2,7
200	-	-	176,1	12,1	11,9
500	-	8,7	552,3	9,5	10,5
1000	-	-	1001,5	2,6	0,2
			r = 0,98500		
MDMA					
10	-	-	9,3	10,8	7,3
20	-	5,1	20,5	9,1	2,5
50	-	-	47,9	8,6	4,2
100	84.1	-	102,1	5,6	2,1
200	-	-	186,1	5,8	7,0
500	-	9,4	526,7	10,1	5,3
1000	-	-	1001,8	1,0	0,2
			r = 0.99925		
MDEA					
10	-	-	8,88	13,0	11,2
20	-	5,0	20,9	9,3	4,5
50	-	-	46,9	3,6	2,3
100	63.6	-	102,1	3,4	2,1
200	-	-	188,6	5,7	5,7
500	-	2,1	505,5	2,2	1,1
1000	-	-	1002,3	1,9	0,2
			r = 0,99875		