

Identification et dosage de la benzoylecgonine, cocaïne, méthylecgonine-ester, codéine, morphine et 6-acétylmorphine clans le sang total

Identification and quantification of benzoylecgonine, cocaine, methylecgonine-ester codeine, morphine and 6-acetylmorphine in whole blood

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

TOXICORAMA 1996, n°2

(1) Laboratoire d'expertises Toxlab, PARIS

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

(3) Institut de Médecine Légale, STRASBOURG

(4) Institut de Médecine Légale, LILLE

(5) Laboratoire de Biochimie et Toxicologie, CHU POITIERS

**Auteur à qui adresser la correspondance:*

Y.GAILLARD , Laboratoire d'expertise Toxlab
18, rue André-Del-Sarte
75018 PARIS, FRANCE

RÉSUMÉ

Nous présentons une méthode d'identification et de dosage dans le sang total de la cocaïne et de ses métabolites: méthylecgonine et benzoylecgonine ainsi que des opiacés majeurs: codéine,morphine et 6-acétylmorphine. Deux différentes techniques peuvent être appliquées avec succès. La première, en phase liquide, fait intervenir plusieurs étapes de purification à pH = 8,4, 1,0 et 8,4 respectivement. La seconde extraction, en phase solide, réalise la fixation des composés à pH 8,6 sur colonne C18 tandis que l'élution des analyses est réalisée par le méthanol. Une dérivation préalable de certaines molécules est nécessaire avant l'étape chromatographique en phase gazeuse sur colonne 5 % phényl 95 % méthyl silicone. La détection fait intervenir la spectrométrie de masse. La quantification est réalisée par l'intermédiaire d'étalons internes trideutérés. Linéarité, précision et limites basses de la méthode ont été jugées satisfaisantes pour les deux techniques extractives et l'application à des exemples réels est donnée.

Mots clés: *Opiacés, benzoylecgonine, CPG-SM, sang total, toxicology*

SUMMARY

We have presented a method for the simultaneous identification and quantification of opiates and cocainics in whole blood. Two different extraction procedures can be successfully applied. These include a three steps liquide-fluid extraction or, on the other hand a solid phase extraction method on C18 cartridges. A suitable derivatisation is required prior to injection on a gas chromatograph apparatus. Detection is performed using mass spectrometry while quantitation is realized using trideuterated internal standards. Linearity precision and limite of détection are given for both methods and are judged satis factory enough for the purpose. Application to real exemples has also been demonstrated.

Key-words: *Opiates, cocainics, GC-MS, whole blood, toxicology*

INTRODUCTION:

Dans le cadre d'une démarche éventuelle des forces de police de recherche de produits stupéfiants chez des conducteurs impliqués dans des accidents routiers, la Société Française de Toxicologie Analytique (S.F.T.A.) a décidé de proposer des méthodologies d'identification et de dosage des molécules pouvant être incriminées. Dans ce but, cette société a évalué différentes méthodes que lui ont soumis ses membres afin d'en dégager celles qui par leurs performances générales seront à même de résoudre au mieux les problèmes analytiques susceptibles d'être rencontrés. Notre travail a porté sur la benzoylecgonine, métabolite principal de la cocaïne ainsi que sur les opiacés majeurs, codéine, morphine et acétylmorphine. Si tous s'accordent à estimer que la séparation chromatographique et la détection doivent être réalisées sur le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (CPG-SM), deux techniques extractives différentes peuvent être envisagées. La première est obtenue sur la base d'une extraction liquide-liquide tandis que la seconde utilise l'Extraction en Phase Solide (EPS) (1-3). Nous présentons ainsi les techniques recommandées par la S.F.T.A. pour le dosage des cocaïniques et des opiacés dans le sang total.

Matériel et méthodes

Instrumentation

Le système chromatographique est représenté par un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890 séries II (Les Ulis, France), de l'injecteur automatique HP 6890 et du détecteur HP 5972. La colonne analytique est une CP SIL 8 CB Chrompack (Les Ulis, France) de 25 m de long, diamètre interne 0,25 mm et de 25 μm d'épaisseur de film. L'injection en mode Splitless est réalisée à 280°C. Le four est programmé à 50°C pendant 2 mn à 310°C selon une rampe de 15°C/mn et maintenu 4 mn à 310°C. Le détecteur est chauffé à 300°C. Le temps chromatographique est de 24 mn tandis que les temps de rétention relatifs (à la codéine deutérée) des composés sont les suivants : méthylecgonine (ME) = 0,67; cocaïne = 0,92; benzoylecgonine (BZE) = 0,94; codéine = 1,0; morphine = 1,02 et 6-acétylmorphine (6AM) = 1,04. La détection est réalisée en mode de balayage de masse de 70 à 440 unités de masse atomique. La station d'extraction est constituée par une unité de filtration Vac Elut, Analytichem International, Prolabo (Paris, France). Les cartouches d'extraction sont de types C18 200 mg de 3 ml IST distribuées par Touzart et Matignon (Courtabeuf, France).

Réactifs

6AM, BZE, codéine, cocaïne, ME, morphine ainsi que leurs équivalents trideutérés sont fournis en ampoules de 1 ml (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) par la société Promochem (Molsheim, France). Un mélange d'étalons internes trideutérés est réalisé dans le méthanol à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Chloroforme, isopropanol, N heptane, méthanol, acide chlorhydrique 1 N., hydroxyde de sodium 1 N. hydroxyde de sodium à 35 %, bicarbonate de sodium NaHCO_3 et monohydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4 de qualités analytiques sont achetés auprès de Carlo Erba (Milan, Italie). Le réactif de dérivation N,O bis triméthylfluoroacétamide (BSTFA) est acquis auprès de la société Fluka (Buchs, Suisse). Le tampon phosphate 1 M pour l'extraction en phase liquide est réalisé en dissolvant 35,81 g de monohydrogénophosphate de sodium dans 100 ml d'eau distillée et ajusté à pH = 8,4. Le tampon bicarbonate 0,2 M pour EPS est réalisé en dissolvant 1 680 mg de bicarbonate de sodium dans 100 ml de méthanol à 10 % dans l'eau distillée, pH = 8,6.

Extraction

Extraction en phase liquide

A 1 ml de sang total, sont successivement ajoutés 20 μl de mélange d'étalons internes trideutérés (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 ml de tampon phosphate pH = 8,4 ainsi que 10 ml de la phase organique extractive chloroforme : isopropanol: n-heptane (50: 17: 33, v/v). Après agitation 10 mn à 100 cycles/mn, et centrifugation à 2 500 g pendant 5 mn, la phase organique est prélevée et traitée par 5 ml d'HCl 0,2 N. Une étape d'agitation et centrifugation est à

nouveau appliquée et suivie par une réextraction de la phase aqueuse par 5 ml de chloroforme après avoir neutralisé et tamponné celle-ci à l'aide d'1 ml de soude 1 M et d'1 ml de tampon phosphate. Après centrifugation, le chloroforme est évaporé à sec, dérivé par 20 µl de BSTFA et 1 µl est injecté sur la colonne analytique.

Extraction en phase solide

1 ml de sang total dilué par 1 ml d'eau distillée est tamponné par 2 ml de tampon bicarbonate auxquels sont ajoutés 20 µl du mélange d'étalons internes trideutérés. L'échantillon homogénéisé 5 s au vortex est alors centrifugé à 2 500 g pendant 5 mn.

Les cartouches d'extraction sont conditionnées par passage de 4 ml de méthanol suivi par 2 ml de tampon bicarbonate à 10% de méthanol. 3,5 ml de l'échantillon sont alors déposés sur la cartouche et aspirés à un débit qui ne doit pas excéder 1 ml/mn. Les colonnes sont ensuite successivement lavées par 2 x 1 ml d'eau distillée puis par 1 ml de méthanol à 10 %. Elles sont ensuite séchées sous aspiration d'air pendant 12 mn. L'élution des analyses est obtenue par le passage de trois fractions de 500 µl de méthanol. L'éluat est évaporé à sec puis dérivé par 20 µl de BSTFA à partir desquels 1 µl sera injecté sur la colonne du système chromatographique.

Résultats et Discussion:

Linéarité

Elle a été inspectée sur l'ensemble de la gamme (20-1 000 ng/ml) au moyen d'une analyse de variance ANOVA après calcul de la droite de régression linéaire selon la méthode des moindres carrés. Le calcul des contributions respectives de dispersion autour de la droite est réalisé, puis un test F de Fisher-Snedecor est appliqué afin de tester la significativité sur ces dispersions. On évalue deux types de contributions. L'une sur la régression (S_1) représente la dispersion expliquée par la droite, tandis que la dispersion résiduelle (S_e) représente la part de variation qui n'est pas expliquée par le modèle. De cette variation dite résiduelle, on dégage ensuite deux termes de variance intragroupe, qui sont le manquement à l'ajustement (lack of fit) et l'erreur analytique pure (pure error). Ce que l'on cherche à démontrer c'est que la dispersion due au manquement à l'ajustement (en d'autre terme: l'inadéquation de la droite) n'est pas significativement supérieure à l'erreur analytique pure (ou erreur statistique de la mesure).

Pour les deux techniques extractives et pour chaque composé:

- F calculé des comparaisons de variance expliquée/variance résiduelle a toujours été supérieur à 511,8 F théorique $(1, n-1)$ ddl $(n = 10) = 5,32$. F calculé \gg F théorique donc la dispersion est bien décrite par la droite.
- F calculé des comparaisons de variances du manquement à l'ajustement/variance de l'erreur pure a toujours été inférieur à 3,05. F théorique $((n-2) - n/2, n/2)$ ddl $(n = 10) = 5,41$. F calculé $<$ F théorique donc le manquement à l'ajustement n'est pas la principale cause de dispersion, nous pouvons accepter le modèle linéaire comme de bonne qualité.

Quantification

Utilisant pour chaque composé, l'étalon interne trideutéié correspondant, la quantification utilise les rapports respectifs des deux ions de quantification pour le composé à doser et selon une droite d'étalonnage de 20 à 1000 ng/ml.

Les ions de quantification sont les suivants:

ME (d3) = 96,99

Cocaïne (d3) = 182,185

BZE(d3) = 240,243

Codéine (d3) = 371,374

Morphine (d3) = 429, 432
6AM (d3) = 399, 402

Reproductibilité et pourcentage d'extraction

Les tableaux I et 11 donnent les valeurs des coefficients de variation pour chaque produit par les deux méthodes extractives pour des sangs dont les concentrations ajoutées sont de 20, 50, 100 et 1 000 ng/ml (n = 10); ainsi que les valeurs moyennes des pourcentages d'extraction.

Limites de détection et de quantification

La limite de détection a été évaluée par rapport à la qualité analytique du bruit de fond de l'extrait chromatographique. Dans ces conditions, le rapport signal/bruit donne une limite de détection d'autant plus basse que l'extrait sera correctement purifié. Letableau III résume ainsi les limites obtenues pour un signal deux fois supérieur au bruit analytique.

Etude de conversion

Elle a été évaluée pour la conversion de la 6-acétylmorphine en morphine et de la cocaïne en benzoylecgonine par surcharge de 100 ng/ml en 6-acétylmorphine et cocaïne. Extrait et analysé 6 fois, cette conversion est de 1, 5 % pour la cocaïne et de 2,0 % pour la 6-acétylmorphine par la méthodologie d'EPS. Les étalons internes trideutérés sont ajoutés juste avant la dérivation. Pour la technique d'extraction en phase liquide, le taux de conversion de la cocaïne est de 3,5 % celui de la 6AM de 2,1 %.

Avantages, inconvénients

La méthodologie d'extraction liquide-liquide que chacun connaît bien est dans le cas présent une technique de manipulation longue et fastidieuse. Elle présente des rendements d'extraction plus faible qu'en phase solide essentiellement par l'impossibilité de recueillir lors de chaque étape l'intégralité de la phase à retraiter. La méthylecgonine est en revanche mieux extraite qu'en phase solide. En outre, elle offre une qualité chromatographique inégalée qui doit impérativement la faire préférer lorsque l'on a affaire à un sang putréfié ou tout autre matrice très complexe.

L'EPS représente quant à elle une méthode beaucoup plus rapide et efficace et permet d'obtenir un dosage de meilleure précision sur la benzoylecgonine et la morphine. C'est une méthode automatisable qui déjà fait l'objet dans notre laboratoire d'une validation sur l'automate Prepstation HP 7686 couplé en ligne avec le chromatographe et son injecteur automatique. L'extrait d'une pureté intermédiaire entre une simple extraction liquide-liquide et la triple extraction proposée, est cependant très satisfaisant pour des prélèvements de sang total tels que ceux réalisés dans le cadre de contrôles routiers. Les figures 1 et 2 donnent pour exemples des chromatogrammes obtenus chez des personnes décédées ayant consommé de la cocaïne ou de l'héroïne par les deux techniques extractives.

Conclusions

Concluant les résultats de cette étude, la S.F.T.A. dans le cadre de la recherche de produits stupéfiants sur des personnes impliquées dans des accidents de la circulation, propose une méthode de dosage des opiacés et cocaïniques applicable au sang total. Deux techniques extractives sont à la disposition de chaque analyste qui au vu de ces résultats et selon leur expérience personnelle en la matière, pourront appliquer l'un ou l'autre des protocoles.

Tableau I:

Reproductibilité et pourcentage d'extraction par la méthode en phase solide.

Nom des produits	Concentration (ng/ml)	C.V. % (n =10)	% extraction (n = 10)
Méthylecgonine	20	23,5	-
	50	18,0	-
	100	16,4	-
	1 000	12,6	57,5
Cocaïne	20	9,2	-
	50	6,1	-
	100	5,8	-
	1000	4,1	86,7
Benzoylecgonine	20	11,9	-
	50	10,5	-
	100	8,4	-
	1 000	6,0	88,4
Codéine	20	13,4	-
	50	10,5	-
	100	9,1	-
	1 000	5,2	87,5
Morphine	20	11,5	-
	50	7,9	-
	100	5,6	-
	1 000	3,4	87,3
6-acétylmorphine	20	18,6	-
	50	11,8	-
	100	9,8	-
	1 000	8,2	85,5

- non déterminé

Tableau II :

Reproductibilité et pourcentage d'extraction par la méthode en phase liquide

Nom des produits	Concentration (ng/ml)	C.V. % (n =10)	% extraction (n = 10)
Méthylecgonine	20	20,6	-
	50	17,9	-
	100	15,2	-
	1 000	10,4	60,2
Cocaïne	20	16,8	-
	50	12,9	-
	100	9,2	-
	1000	8,2	72,5
Benzoylcgonine	20	22,8	-
	50	18,9	-
	100	14,1	-
	1 000	12,9	62,0
Codéine	20	15,6	-
	50	11,8	-
	100	10,6	-
	1 000	8,4	75,4
Morphine	20	12,7	-
	50	10,0	-
	100	6,0	-
	1 000	4,5	72,9
6-acétylmorphine	20	16,4	-
	50	10,5	-
	100	8,6	-
	1 000	6,3	71,0

- non déterminé

Tableau II:

Limites de détection exprimées à deux fois le rapport signal/bruit

Nom des composés	Phase solide	Phase liquide
	Limite détection (ng/ml)	Limite détection (ng/ml)
Méthylecgonine	8	6
Cocaïne	5	4
Benzoylcgonine	5	8
Codéine	3	3
Morphine	4	3
6-acétylmorphine	7	6