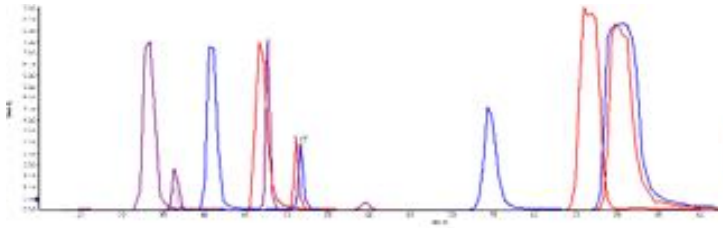
Journée SFTA,
Paris, 2016

Préparation d'échantillons hors ligne: exemples de stratégies appliquées au dépistage des conduites addictives.

S. SALLE*, A. LEMAIRE, C. COHIER, D. COSTE, O. ROUSSEL
Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale

INTRODUCTION (1/3)

- Analyse en toxicologie :



Echantillon → pré-analytique + analytique + interprétation → **rapport d'analyse**

- Objectifs de la préparation d'échantillon :
  - Supprimer les interférences
  - Concentrer la ou les substances d'intérêt
  - Rendre compatible l'échantillon avec le système analytique
  - Stabiliser l'échantillon

INTRODUCTION (2/3)

Paramètres à prendre en compte lors du développement

INTRODUCTION (2/3)

Paramètres à prendre en compte lors du développement

- **Substance**
  - Ionisation (pKa)
  - Polarité (logP)
  - …

- **Matrice**
  - Solide / liquide
  - Fraiche ou dégradée
  - …

- **Environnement**
  - Coût
  - Temps technicien
  - Cadre légal
  - Matériel disponible
  - …

- **Système analytique**
  - CPG / CLHP / autre
  - Détecteur
  - …

INTRODUCTION (3/3)

Préparation d'échantillon

- ± préparation de la matrice
- ± extraction
- ± dérivation
- ± solvant d'injection

Application au dépistage des conduites addictives

- Amphétamines et amphétamine-like / sang
  → ELL (extraction liquide-liquide)
- Cocaïne & opiacés / sang
  → dérivation, SLE (extraction liquide simplifiée)
- Stupéfiants / cheveux
  → digestion, SPE
- GHB, glucuronides, stupéfiants / fluides biologiques
  → dilution +/- précipitation

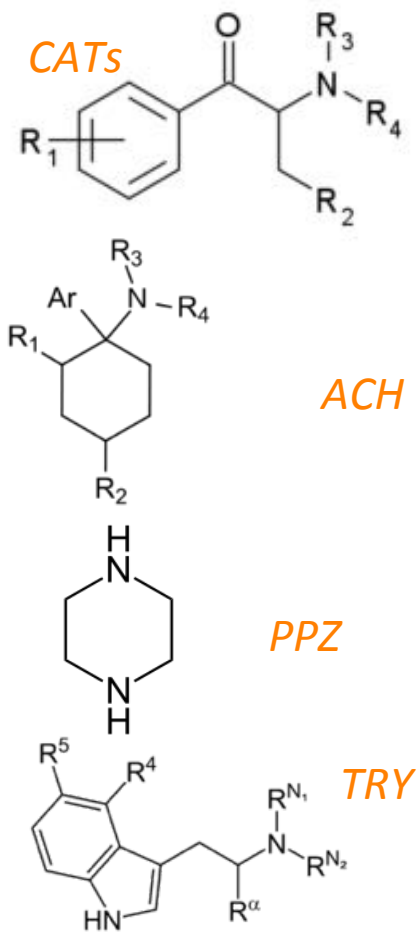
Les autres techniques (HS, SPME,…) ne seront pas traitées

1. Amphetamines & Amphetamine-like

1. Amphetamines & Amphetamine-like

Objectifs et contraintes

- Applications
  - Sécurité Routière : CPG-SM ; dosage
  - Criblage des principales NPS amphetamine-like
    - Phényléthylamines (PEAs) ; Amphétamines (AMPs) ; Cathinones (CATs) ; Ephedrines (EPHs) ; Arylcylclohexylamines (ACH) ; Tryptamines (TRYs) ; Piperazines (PPZs)
- Objectifs majeurs
  - Réduction du temps technicien
  - Optimisation dérivation
  - Nouvelle ELL suite à arrêt commercialisation toxitubes A



1. Amphetamines & Amphetamine-like

Méthode

Préparation d'échantillon

Extraction

- 1 mL sang total
- 1 mL tampon Na_2CO_3 1M
- 4 mL Hexane/dichlo. (50/50)
- + 20 µL EI deutérés à 5 mg/L

Dérivation

- Directement dans **phase organique**
- HFBA (60°C, 20min)
- Neutralisation alcaline

Concentration

- Evaporation à sec
- Reprise 40µL **Acétate éthyle**

Paramètre CPG

Injection	1 µL à 5 µL/s
Temp. Injection	280 °C
Mode injection	splitless (1 min)
Débit du split	20 mL/min
Split ratio	33
Débit	0,6 mL/min (constant)
Colonne	**PHENOMENEX ZB drug1 avec garde (10m x 0,18mm x 0,18µm)**

Thermo Scientific Ultra-DSQ ™ II

2 paramétrages SM

1° injection = DOSAGE

- **Paramètres** : SIM
- **12** substances
- **10 -490 ng/mL**

2° injection = CRIBLAGE

- **Paramètres** : Full scan
- **Identification** : tR + Spectre
- **Sensibilité** : LD sur **44**

1. Amphetamines & Amphetamine-like

Performances de la méthode

Résolution

	Phényléthylamines	Amphétamines	Ephédrines	Cathinones	ACH	Tryptamines	Pipérazines
SIM		amphétamine* (4,98)	éphédrine (5,71)	méphédrone* (8,89)	norkéta (13,58)		
		méthamph* (6,35)	pseudoéph. (6,71)	méthylone* (14,11)			
		MDA* (10,33)		MDPV* (19,72)			
		MDMA* (12,56)					
		MDEA* (12,90)					
		MBDB* (13,62)					
FS	phénéthylamine (5,20)	4-fluoroamph* (5,22)	cathine (5,12)	fléphédrone* (6,85)	PCP* (15,60)	DMT* (17,98)	BZP* (12,24)
	mescaline* (14,08)	éthylamph* (6,55)		methcat* (7,25)	kétamine* (16,21)		TFMPP (12,70)
	methylphénidate* (15,57)	PMA* (8,43)		ethcat* (8,23)			mCPP (17,21)
	éthylphénidate* (16,11)	PMMA* (10,53)		4MEC* (9,95)			
	2CB* (16,69)	2,5-DMA* (10,87)		méthédrone* (12,19)			
		DOM* (11,44)		butylone* (14,84)			
		4MTA* (12,04)		ethylone* (15,18)			
		DOET* (12,22)		pyrovalérone* (15,51)			
		TMA* (13,99)		pentylone* (15,95)			
		DOB* (15,85)		naphyrone* (21,50)			

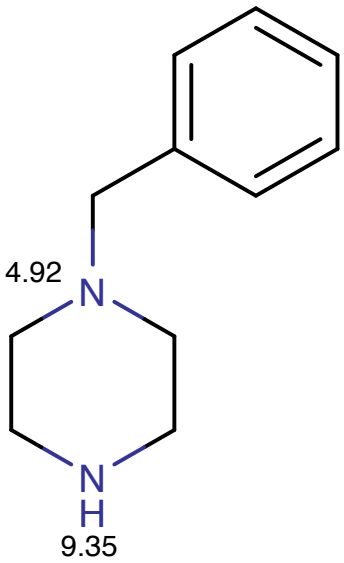
- **Sensibilité** : 10 ng/mL (sauf méthylone, DMT, naphyrone)

1. Amphetamines & Amphetamine-like

Choix du pH

Exemple de la Benzylpiperazine

- pKa
  - 2 sites ➔ 2 pKa
  - utilisation pratique de cette information ??

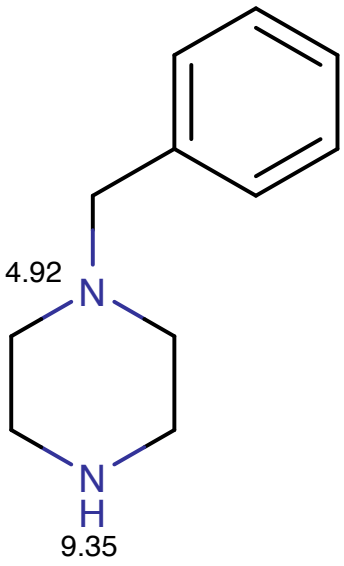


1. Amphetamines & Amphetamine-like

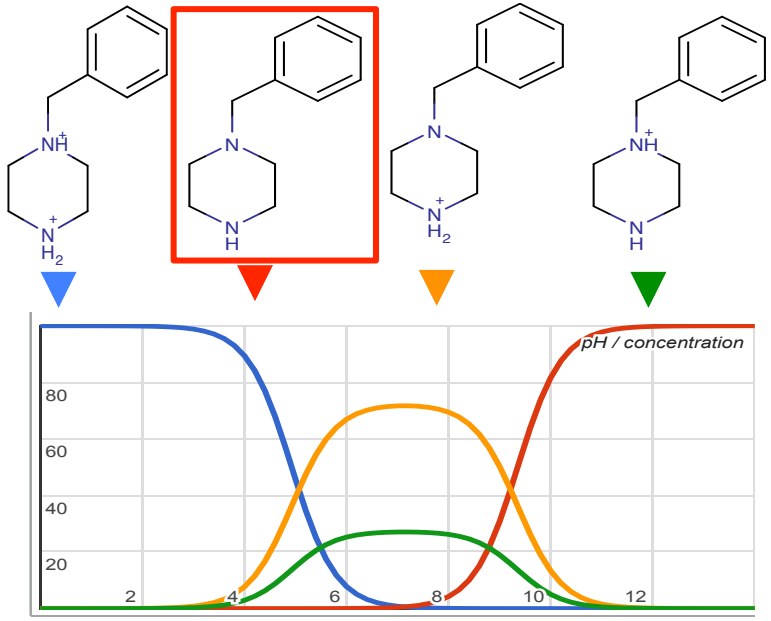
Choix du pH

Exemple de la Benzylpiperazine

- pKa
  - 2 sites ➔ 2 pKa
  - utilisation pratique de cette information ??



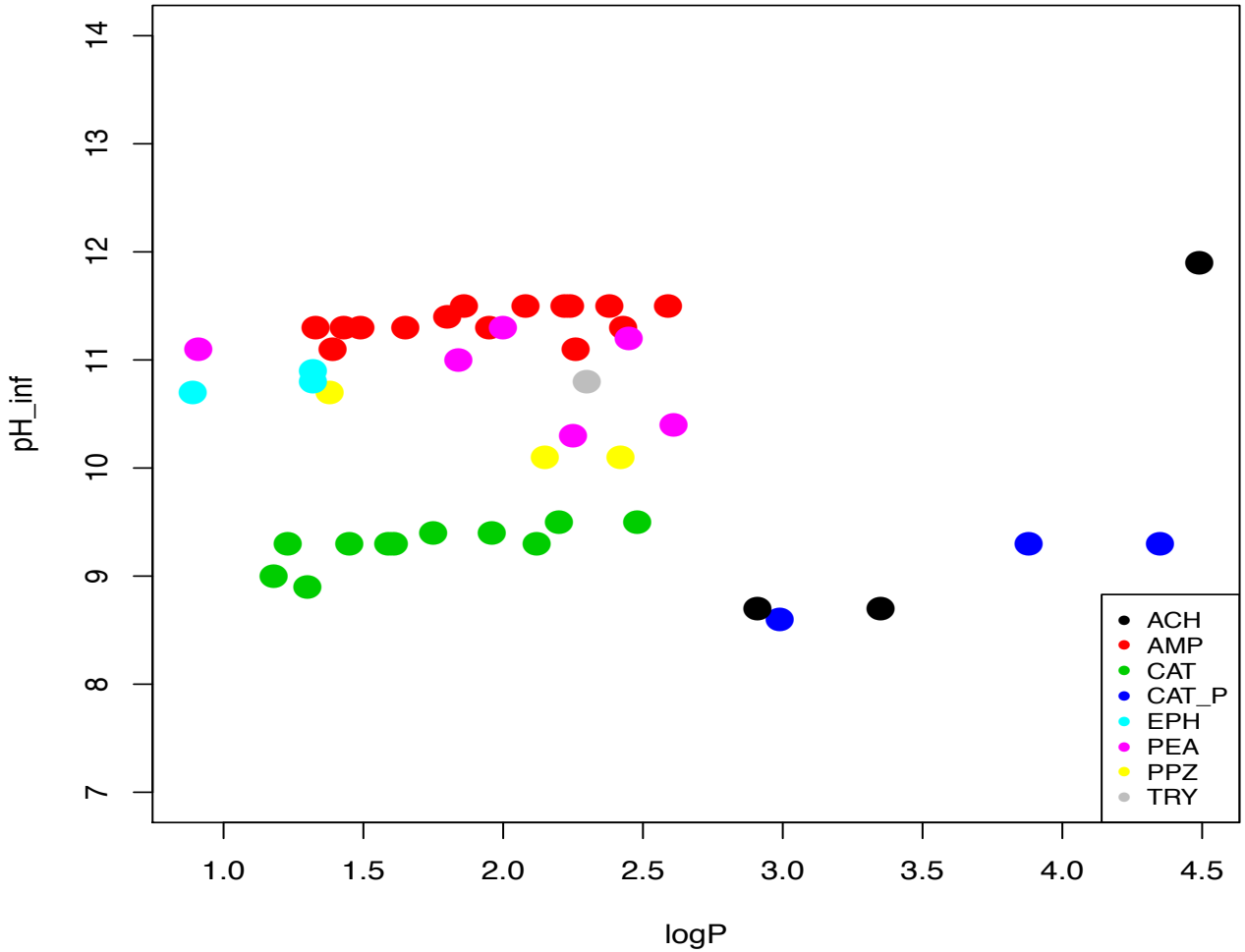
- Utilisation du site chemicalize.org
  - Pourcentage de la forme = f(pH)
  - Focus sur forme neutre
  - BZP : 95% neutre de 10,6 à 14



1. Amphetamines & Amphetamine-like

Choix du pH et du solvant

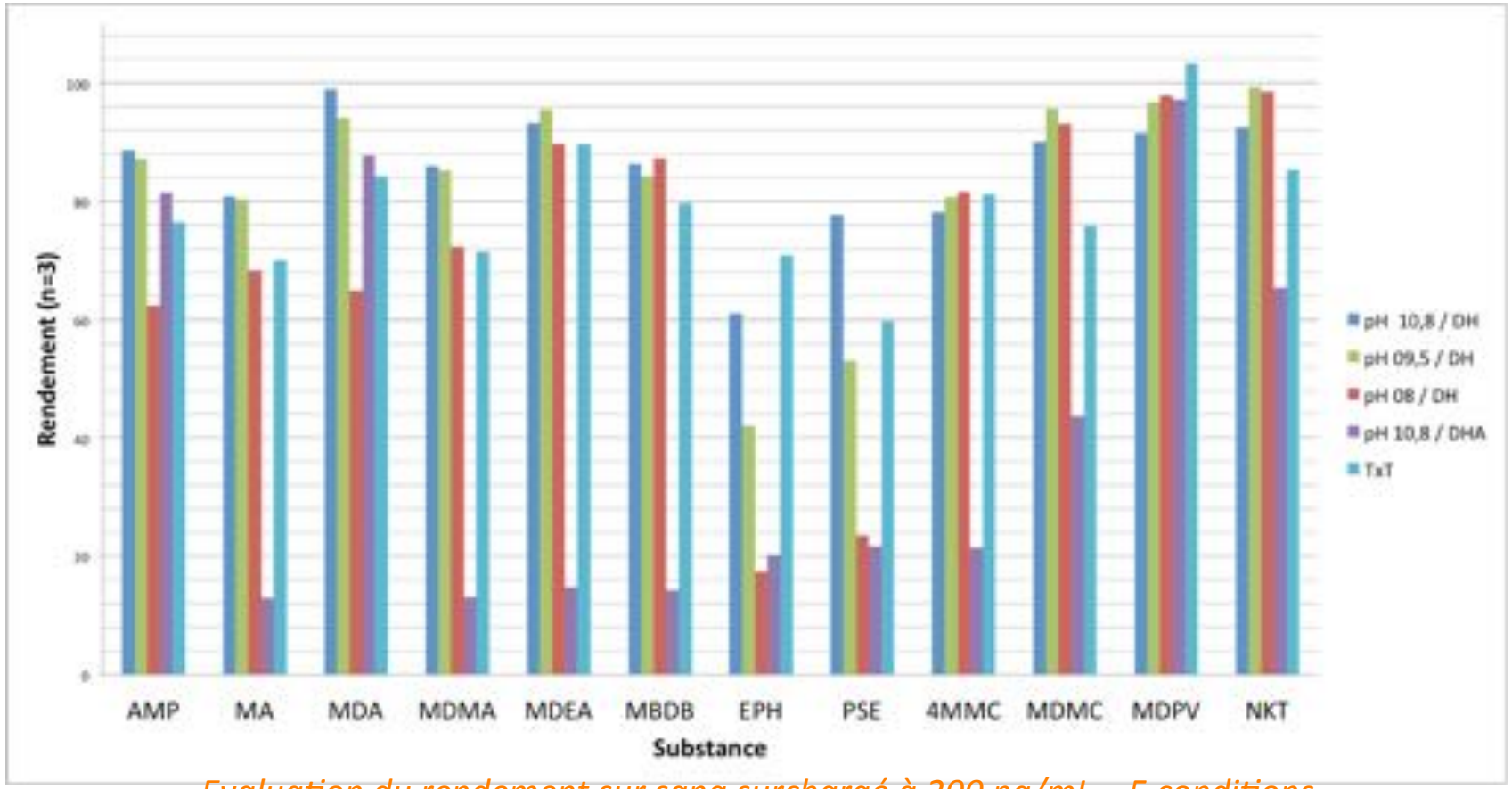
- Ensemble des substances évaluées : 95% sous forme neutre d'un pH **X** à pH 14
- Modélisation de ce point **X** en fonction du logP *(logiciel R)*



1. Amphetamines & Amphetamine-like

Choix du pH et du solvant : évaluation des rendements

Meilleur compromis testé = pH ++ basique (10,8) et mélange Dichlo/ hexane



Evaluation du rendement sur sang surchargé à 200 ng/mL – 5 conditions

2. Cocaïne et Opiacés

2. Cocaïne et Opiacés

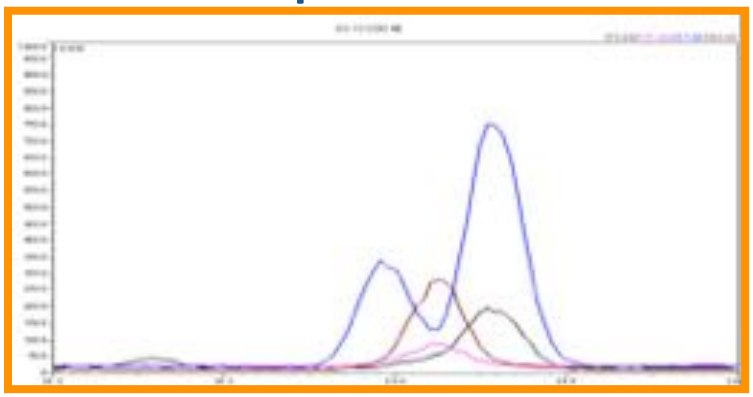
Objectifs et contraintes

- Applications
  - Sécurité routière : CPG-SM ; Dosage ; consensus SFTA
  - Intoxications aux opiacés : criblage large
- Objectifs majeurs
  - Ajout oxycodone
  - Augmenter la sensibilité et le rendement
  - Optimiser le temps de traitement (méthode à 3 extractions)
  - Automatiser la préparation ?
  - Réduire l'utilisation de solvants chlorés ?

2. Cocaïne et Opiacés

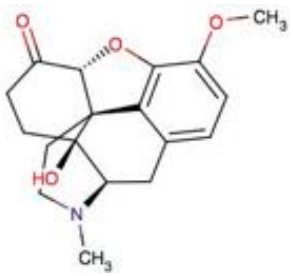
Ajout de l'oxycodone → impact sur la dérivation

- **Méthode précédente**

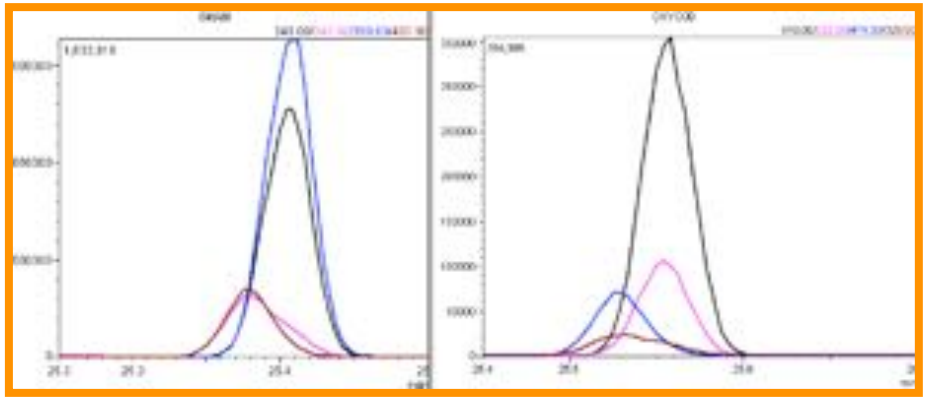


Sang surchargé à 500 ng/mL par oxycodone et 6MAM et leur deutérés – ions de suivi de l'oxycodone et de son deutéré

→ Substances coéluées, ion des deutérés communs, signal faible



- **Méthode avec dérivation pré-extraction de la cétone**
  - Dérivation par méthoxyamine (15min, Temp. Ambiante) → cétoxime
  - Dérivation BSTFA post-extraction

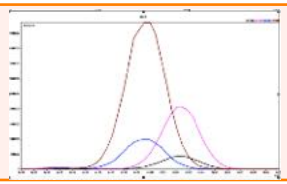
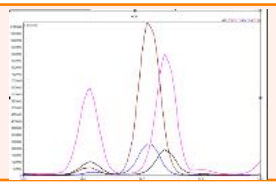
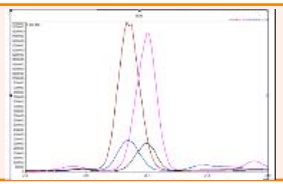


  - Substances séparées, ions différents
  - Validation [10-500] ng/mL COC&OP

- Dérivation efficace sur morphones

2. Cocaïne et Opiacés

Extraction liquide simplifiée (SLE)

	Méthode précédente	Méthode SLE
Déprotéinisation	Acétonitrile	Ultrasons + acidification (méthoxyamine)
Extraction	3 extractions	Passage sur cartouche NOVUM 12CC de l'échantillon tamponné puis du solvant
Temps technicien	8 heures Non automatisable	3 heures Automatisable
Rendement morphine (n=3)	40,2%	67, 1 % - 24,9% - 2,9% - 86,7 %
Bruit de fond		 
Validation	Opiacés + Cocaïniques [10 - 500] ng/mL	Prometteur opiacés, peu efficace cocaïniques ➔ Poursuite du développement

3. Cheveux et Stupéfiants

3. Cheveux et Stupéfiants

Objectifs et contraintes

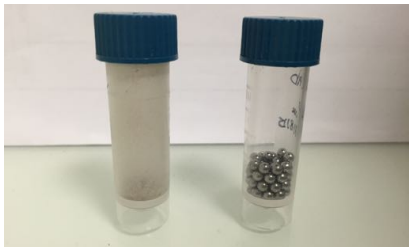
- Applications
  - Recherche des causes de la mort
  - Soumission chimique
  - Évaluation des conduites addictives
- Objectifs majeurs
  - CPG-SM^2
  - 1 seule préparation pour tous les stupéfiants → *deux dérivations différentes, stabilité des substances*
  - Atteindre LQ compatibles avec seuils de la SOHT
  - Limiter les effets matrices et encrassement (et donc maintenance)

3. Cheveux et Stupéfiants

Digestion et extraction phase solide (SPE

Digestion

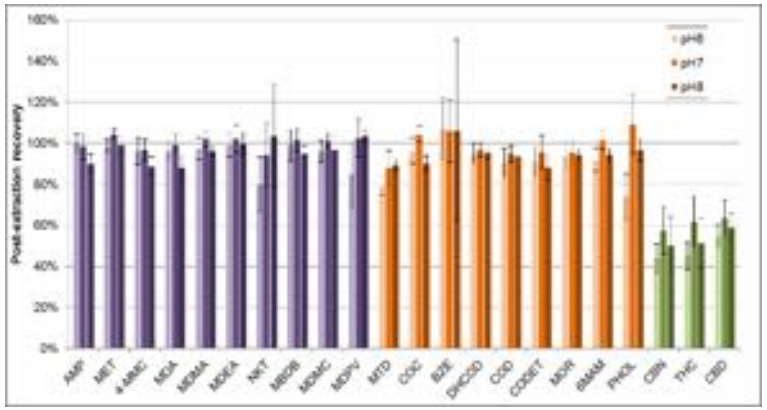
- Poudre de cheveux par broyeur à billes *(Bullet blender Storm 5®, Next advance)*



- Mise en solution dans Méthanol (50°C, 12h)
  - Essais au méthanol acidifié (HCl 0,1M) à 0,5 et 10 cut-offs
  - dégradation 6MAM et Cannabinol

Extraction : SPE

- Cartouche HLB 1cc Oasis, Waters
- Application du protocole fournisseur
- Optimisation du pH tampon de reconstitution post-digestion pH 7 rendement moyen 94,4%



4. Précipitation / dilution

4. Précipitation / dilution / filtration

GHB et fluides biologiques (sang et urines)

Objectifs et contraintes

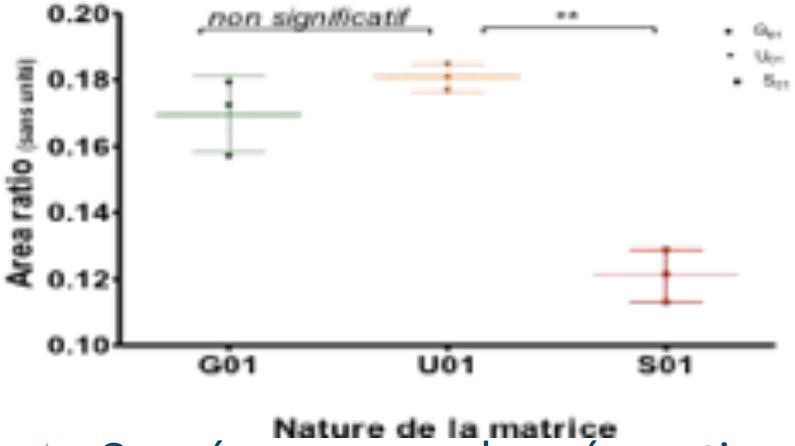
- GHB : petite molécule polaire
- Molécule endogène
- En CPG-SM ions communs à urée ➔ CPG-SM²
- Concentrations cibles (mg/L)

	Répertoriées après usage		Seuil de positivité	
	vivant	*décédé*	*vivant*	*décédé*
sang	≈ 100	≈ 300	5	50
urine	≈ 1000	≈ 2000	10	10

➔ Choix précipitation à acétonitrile de 50µL d'échantillon qsp 1mL

Impact du volume d'ACN

- Séquestration du GHB dans culot

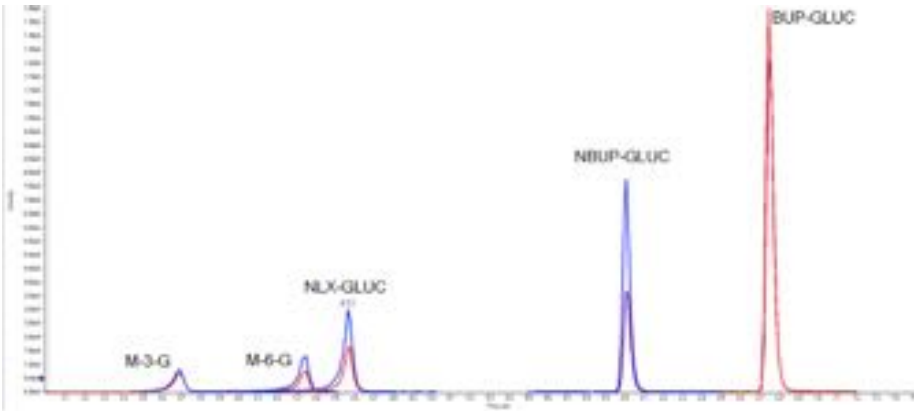


- Conséquence sur la préparation
  - Dilution préalable de l'échantillon dans 4 volumes d'eau
  - Gamme unique de 1 à 50 mg/L mais validation jusqu'à 500 dans le sang et 2500 dans l'urine par **variation du volume de la prise d'essai (5 et 1µL)**

4. Précipitation / dilution

Agonistes/antagonistes des opioïdes et leurs glucuronides/sang de rat

- Objectifs et contraintes
  - Dosage de buprénorphine, norbuprénorphine, morphine et naloxone et de leurs glucuronides → *extraction commune non réalisable, CLHP-SM²*
  - Cinétique chez le rat → *très faible volume (<200µL)*
  - → Choix
    - → précipitation de 50µL d'échantillon au ¼ dans acétonitrile puis dilution au ¼ de 100µL dans l'eau
    - → Colonne core-shell greffage Biphényl
- Sensibilité et robustesse
  - Run unique pour toutes les substances

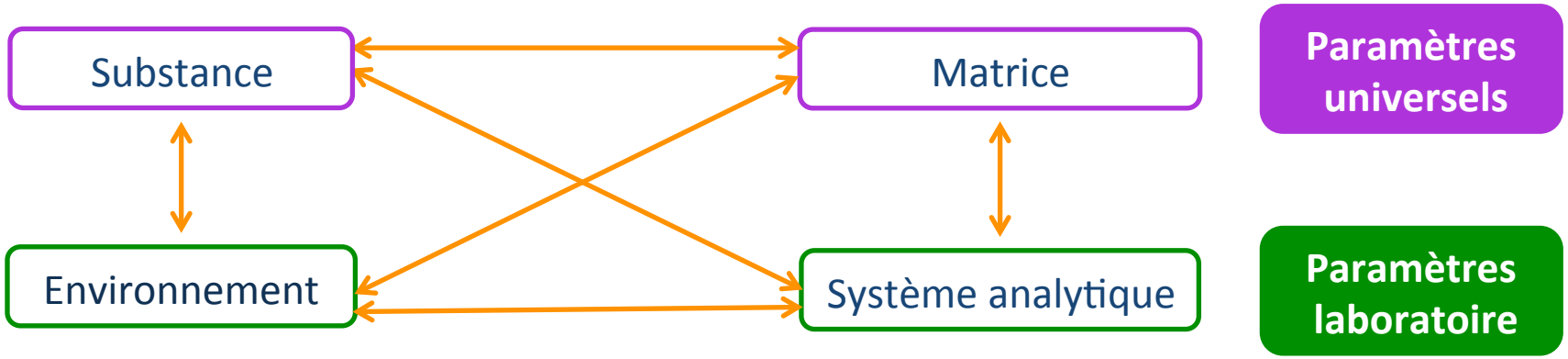


  - Méthode validée
    - LQ de 1,9 / 3,5 à 4000 ng/mL
    - LD de 0,1 à 0,5 ng/mL

Conclusion

CONCLUSION

- **Paramètres à prendre en compte lors du développement**



- A chaque laboratoire de trouver son compromis
  - Rationalisation du temps
  - Equilibre entre méthode idéale et réaliste

MERCI DE VOTRE ATTENTION