

DOSAGE DE LA COCAINE, DES OPIACES ET DES AMPHETAMINES DANS LE SERUM PAR LC/MSMS



Nathalie Dubois, Prof. Corinne Charlier

*Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale,
de l'Environnement et en Entreprise
CHU, Liège, Belgique*

5èmes JOURNEES INTERNATIONALES DE TOXICOLOGIE

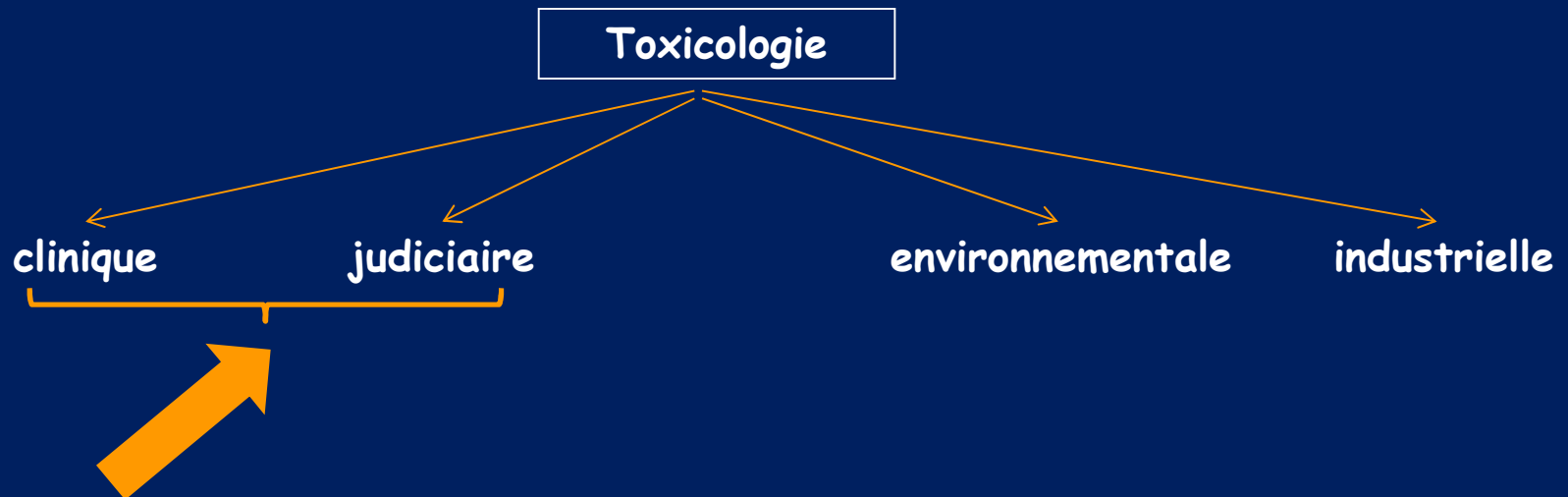
LIEGE, 17 et 18 octobre 2013

www.chuliege.be/congrestoxicoliege2013

INTRODUCTION

LC/MS : outil performant pour les laboratoires de Biologie Clinique

→ Nombreux domaines d'application
(Toxicologie, Chimie clinique, Microbiologie, Génétique,...)



INTRODUCTION

OBJECTIFS D'UNE RECHERCHE DE STUPEFIANTS DANS UN PRELEVEMENT BIOLOGIQUE

En Toxicologie clinique :

- Identifier le produit consommé en cas d'intoxication
- Faire l'état des lieux de la consommation d'un patient

En Toxicologie judiciaire :

- Confirmer une consommation de stupéfiants

Influence sur le comportement de sujets

- responsables d'actes délictueux
- conducteurs de véhicules
- sur leur lieu du travail (accident, ...)
- victimes d'actes délictueux (soumission chimique)

En cas de décès :

- évaluation de la responsabilité du stupéfiant
- délai entre la consommation du produit et la mort
- détermination du statut toxicomanogène du sujet décédé (naïf ou tolérant)

MENU ANALYTIQUE

COCAINE:

cocaïne, benzoylecgonine, cocaéthylène

OPIACES:

6-MAM, morphine, normorphine, M3G, M6G, codéine, norcodéine, codéine-6-glucuronide,

+ papavérine, noscapine, méconine, 7-déméthylméconine, acétylcodéine

+ dihydrocodéine, éthylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, pholocodine

+ méthadone, EDDP, EMDP, buprénorphine, norbuprénorphine

+ naloxone, naltrexone, β -naltrexol

AMPHETAMINES:

amphétamine, méthamphétamine, MDMA, MDA, MDEA, MBDB,

+ 4BDMPA, 2CI, 2CT-2, 2CT-7 DMA, DOB, éthylamphétamine, HMA, HMMA, MCPP, MDDMA, 4MTA, PMA, PMMA, propylamphétamine

+ éphédrine, pseudoéphédrine

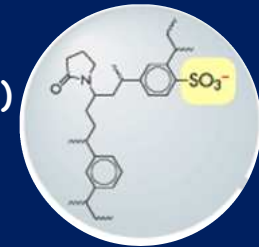
AUTRES:

cathine, cathinone, kétamine, méphédrone, PCP, phentermine



SPE sur cartouches OASIS® MCX, 1 cc, 30 mg (Waters)

Phase inverse + échanges cationiques (dérivé acide sulfonique)



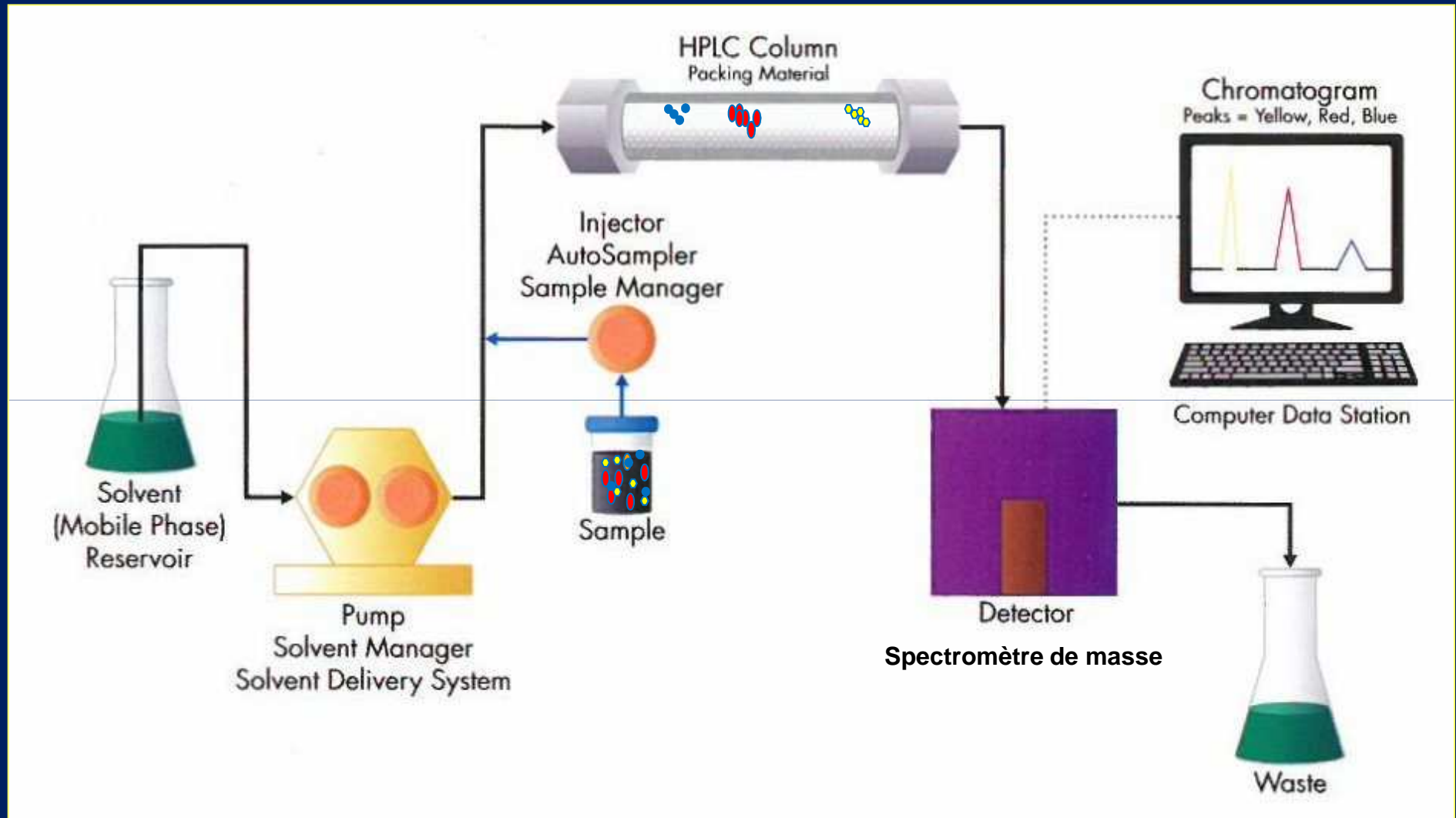
Sérum	500 µl
SI deutérés	50 µl
HCl 0.15 N	500 µl

<u>Conditionnement</u>	
Méthanol	2 x 1ml
H ₂ O	1ml
Tampon citrate pH3	2 x 1ml
<u>Chargement du sérum acidifié (après ajout des SI)</u>	
<u>Lavage</u>	
Acide formique 2%	500µl
→ Sécher 1 minute	
<u>Elution</u>	
Ammoniaque 5% dans méthanol	1ml
→ Evaporer à 30°C sous N ₂	
→ Reprendre par 100 µl de mélange formiate d'ammonium pH3/méthanol pH3 (90/10 : v/v)	

Les bases sont ionisées
→ retenues sur le sorbent par échange cationique

→ Elimination des protéines

→ Elution des composés basiques

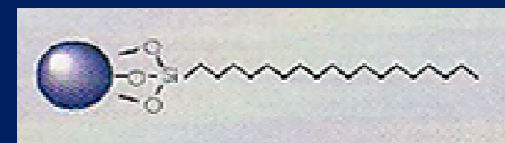


Source : Waters



Système UPLC **Acquity**[®] Waters couplé à
un spectromètre de masse tandem
Quattro Premier Waters

Colonne : HSS T3 Waters 100 × 2,1mm ; 1,8μm
t° colonne : 40°C



Gradient :

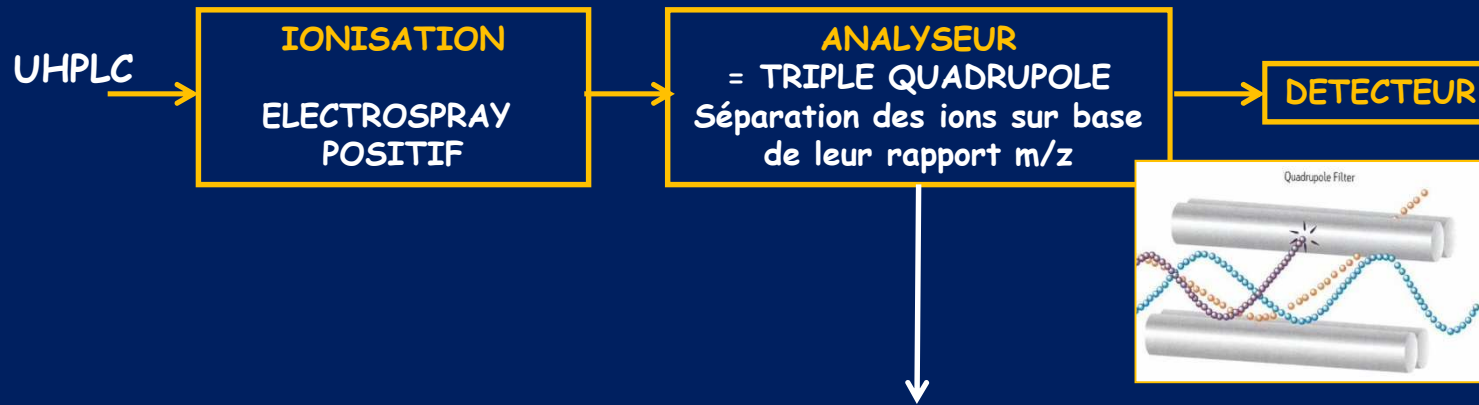
Temps (min.)	% A	% B
0,0	100	0
1,0	100	0
2,0	92,5	7,5
5,5	89	11
16,0	10	90
17,0	10	90
18,0	100	0
19,0	100	0

Phase mobile : A = Formiate d'ammonium 5mM, pH 3

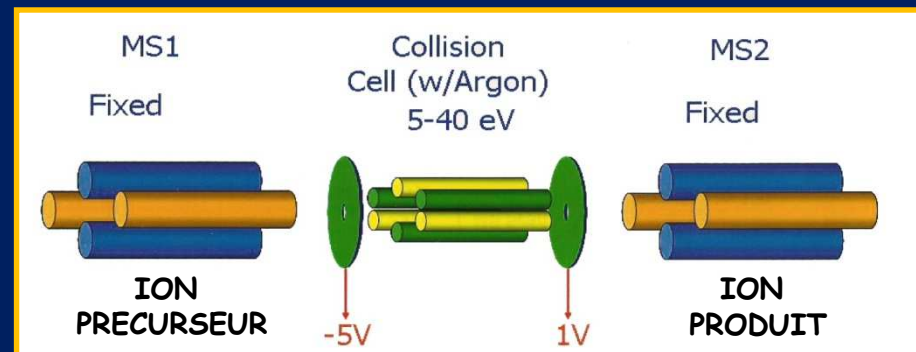
B = Méthanol pH3

débit : 0,5 ml/min

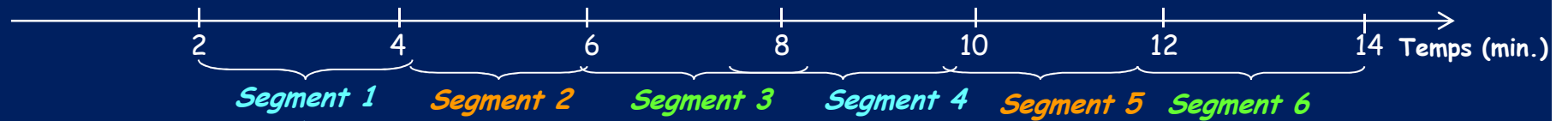
Volume injection : 10 μl



Mode MRM (Multiple Reaction Monitoring)



Source : Waters

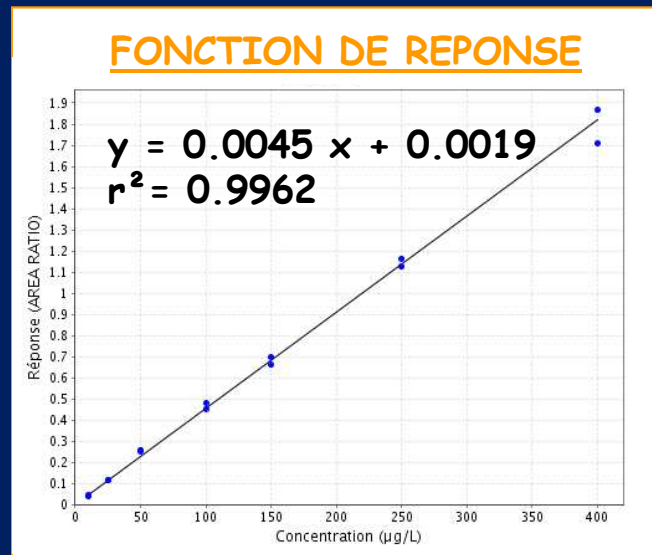


M3G-d ₃ M6G-d ₃ M3G M6G	465.1>289.2 462.2>286.2 462.2>462.2
PHOLCODINE	399.2>114.1 399.2>399.2
HYDROMORPHINE-d ₃ HYDROMORPHINE	289.1>185.1 286.1>185.0 286.1>286.1
MORPHINE-d ₃ MORPHINE	289.0>201.2 286.1>201.1 286.1>286.1
NORMORPHINE	272.2>272.2
CATHINE	152.1>134.1 152.1>117.1
CATHINONE	150.1>132.0 150.1>117.0

NALTREXONE-d ₃ NALTREXONE	345.1>327.2 342.1>324.1 342.1>
β-NALTREXOL	344.2>326.2 344.2>308.2
6MAM-d ₃ 6MAM	331.2>211.1 328.2>211.1 328.2>165.1
OXYCODONE-d ₃ OXYCODONE	319.1>301.2 316.2>298.3 316.2>241.2
HYDROCODONE-d ₃ HYDROCODONE	303.1>215.1 300.1>215.1 300.1>300.1
MDDMA	208.0>163.1 208.0>105.1
MDMA-d ₅ MDMA	199.0>165.0 194.0>163.0 194.0>105.0
HMMA	196.0>165.1 196.0>105.1
HMA	182.0>137.1 182.0>105.1
MDA-d ₅ MDA	185.0>168.0 180.0>163.1 180.0>105.0
METHAMPHETAMINE-d ₈ METHAMPHETAMINE	158.0>124.0 150.0>119.1 150.0> 91.0
AMPHETAMINE-d ₈ AMPHETAMINE	144.0>127.1 136.0>119.1 136.0> 91.0

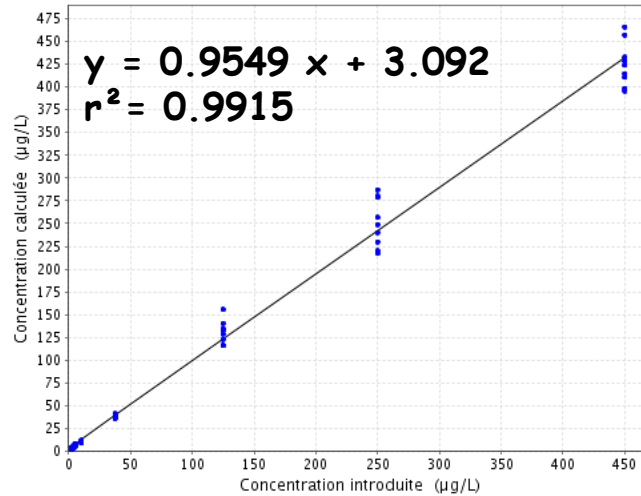
BUPRENORPHINE-d ₄ BUPRENORPHINE	472.2>400.2 468.1>396.1 468.1>414.1
NORBUPRENORPHINE	414.4>101.1 414.4> 83.1
NOSCAPINE	414.2>353.2 414.2>220.2
PAPAVERINE	340.2>202.2 340.2>171.1
COCAETHYLENE-d ₃ COCAETHYLENE	321.1>199.1 318.2>196.2 318.2> 82.1
METHADONE-d ₃ METHADONE	313.2>268.2 310.2>265.2 310.2>310.2
2CI	307.9>291.1 307.9>276.1
EDDP-d ₃ EDDP	281.1>249.2 278.1>249.2 278.1>234.1
DOB	275.9>259.1 275.9>229.1
EMDP	264.2>235.2 264.2>220.2
2CT-7	256.0>239.2 256.0>192.2
PCP-d ₅ PCP	248.9>163.9 243.9>158.9 243.9>116.8
2CT-2	242.0>225.2 242.0>210.2

Régression linéaire pondérée en 1/x



C (µg/L)	JUSTESSE Biais (%)	REPETABILITE CV (%)	PRECISION INTERMEDIAIRE CV (%)	INCERTITUDE DE MESURE (%)
5.0	32.39	11.26	24.43	55.42
10.0	2.38	8.25	9.57	20.69
37.5	2.29	4.71	4.71	9.93
125.0	4.95	6.72	10.73	23.96
250.0	0.39	6.12	11.73	26.48
450.0	-5.46	4.74	5.54	11.99

LINEARITE



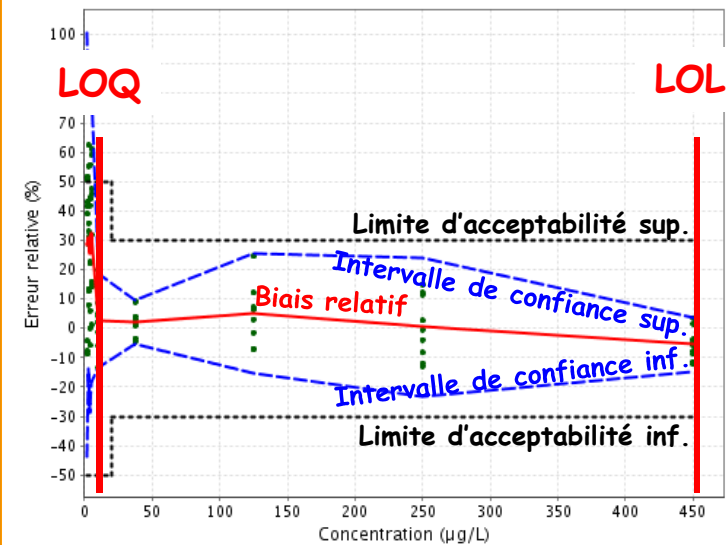
SENSIBILITE

LOD = 2.3 µg/L
LOQ = 7.5 µg/L

EFFETS MATRICES

Effet matrice moyen : 105.0%
CV : 3.60 %

PROFIL D'EXACTITUDE



APPLICATION DE LA METHODE A D'AUTRES MATRICES BIOLOGIQUES

SANG TOTAL

SPE sur cartouches OASIS® MCX, 1 cc, 30 mg (Waters)

Sang	500 µl
SI deutérés	50 µl
HCl 0.15 N	1000 µl

Conditionnement

Méthanol	2 x 1ml
----------	---------

H ₂ O	1ml
------------------	-----

Tampon citrate pH3	2 x 1ml
--------------------	---------

Chargement du **sang** acidifié (après ajout des SI)

Lavage

Acide formique 2%	500µl
-------------------	-------

→ Sécher 1 minute

Elution

Ammoniaque 5% dans méthanol	1ml
-----------------------------	-----

→ Evaporer à 30°C sous N₂

→ Reprendre par 100 µl de mélange formiate d'ammonium pH3/méthanol pH3 (90/10 : v/v)

APPLICATION DE LA METHODE A D'AUTRES MATRICES BIOLOGIQUES

URINE

SPE sur cartouches OASIS® MCX, 3 cc, 60 mg (Waters)

Urine	500 µl
SI deutérés	50 µl
HCl 0.15 N	500 µl

Conditionnement

Méthanol	2 x 1ml
----------	---------

H ₂ O	1ml
------------------	-----

Tampon citrate pH3	2 x 1ml
--------------------	---------

→ Chargement de l'urine acidifiée (après ajout des SI)

Lavage

Acide formique 2%	500µl
-------------------	-------

→ Sécher 1 minute

Elution

Ammoniaque 5% dans méthanol	1ml
-----------------------------	-----

→ Evaporer à 30°C sous N₂

→ Reprendre par 100 µl de mélange formiate d'ammonium pH3/méthanol pH3 (90/10 : v/v)

APPLICATION DE LA METHODE A D'AUTRES MATRICES BIOLOGIQUES

CHEVEUX

SPE sur cartouches OASIS® MCX, 1 cc, 30 mg (Waters)

- **Décontamination** des cheveux dans du dichlorométhane
- **Découper** les cheveux en petits segments de 3 à 5 mm
- **Hydrolyse** :

Cheveux	20 mg
SI deutérés	50 µl
HCl 0.15 N	1 ml

- Incuber pendant au moins 12 h à 60°C
- Centrifuger

Conditionnement

Méthanol	2 x 1ml
H ₂ O	1ml
Tampon citrate pH3	2 x 1ml

Chargement du surnageant

Lavage

Acide formique 2%	500µl
-------------------	-------

→ Sécher 1 minute

Elution

Ammoniaque 5% dans méthanol	1ml
-----------------------------	-----

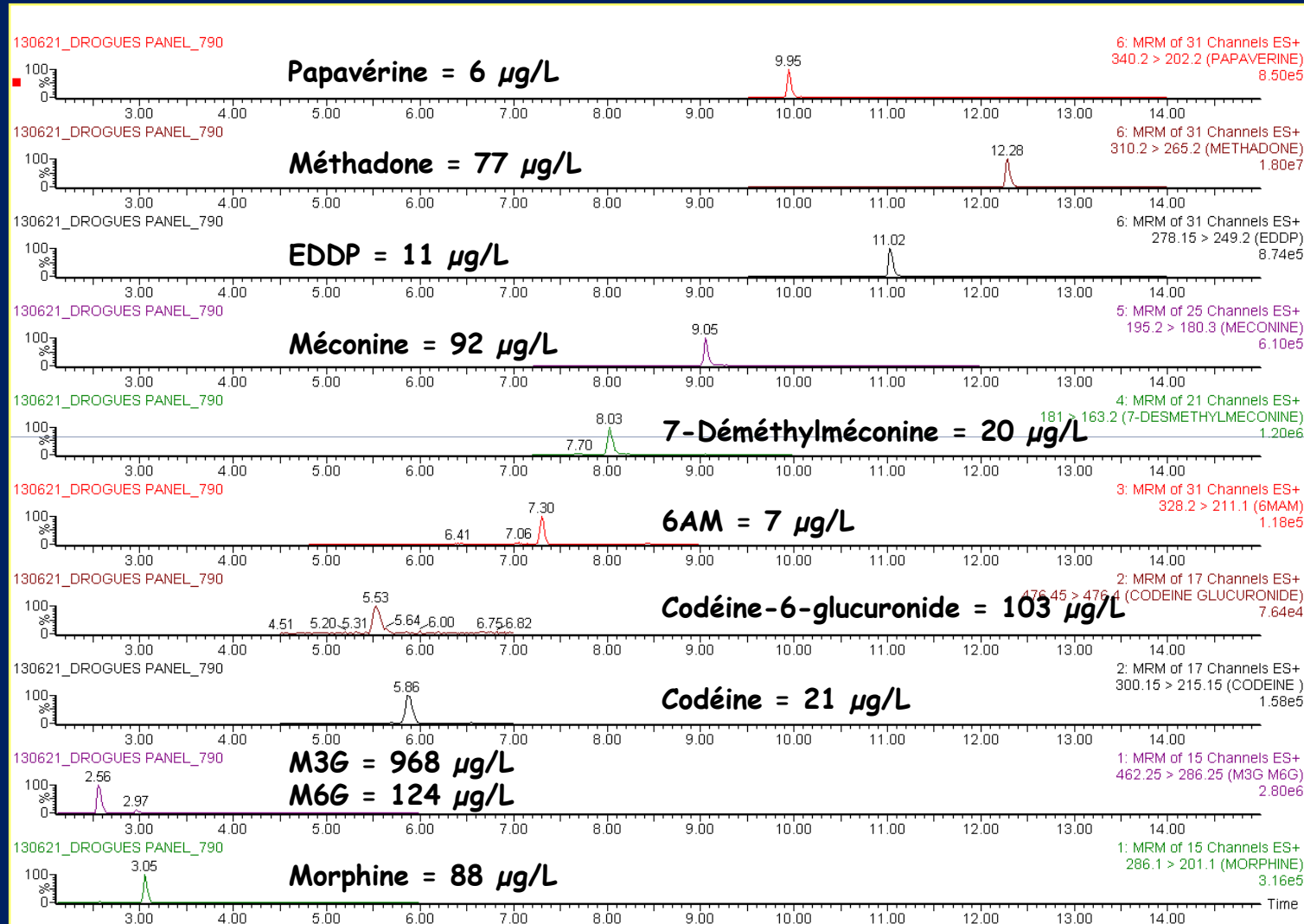
→ Evaporer à 30°C sous N₂

→ Reprendre par 100 µl de mélange formiate d'ammonium pH3/méthanol pH3 (90/10 : v/v)

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

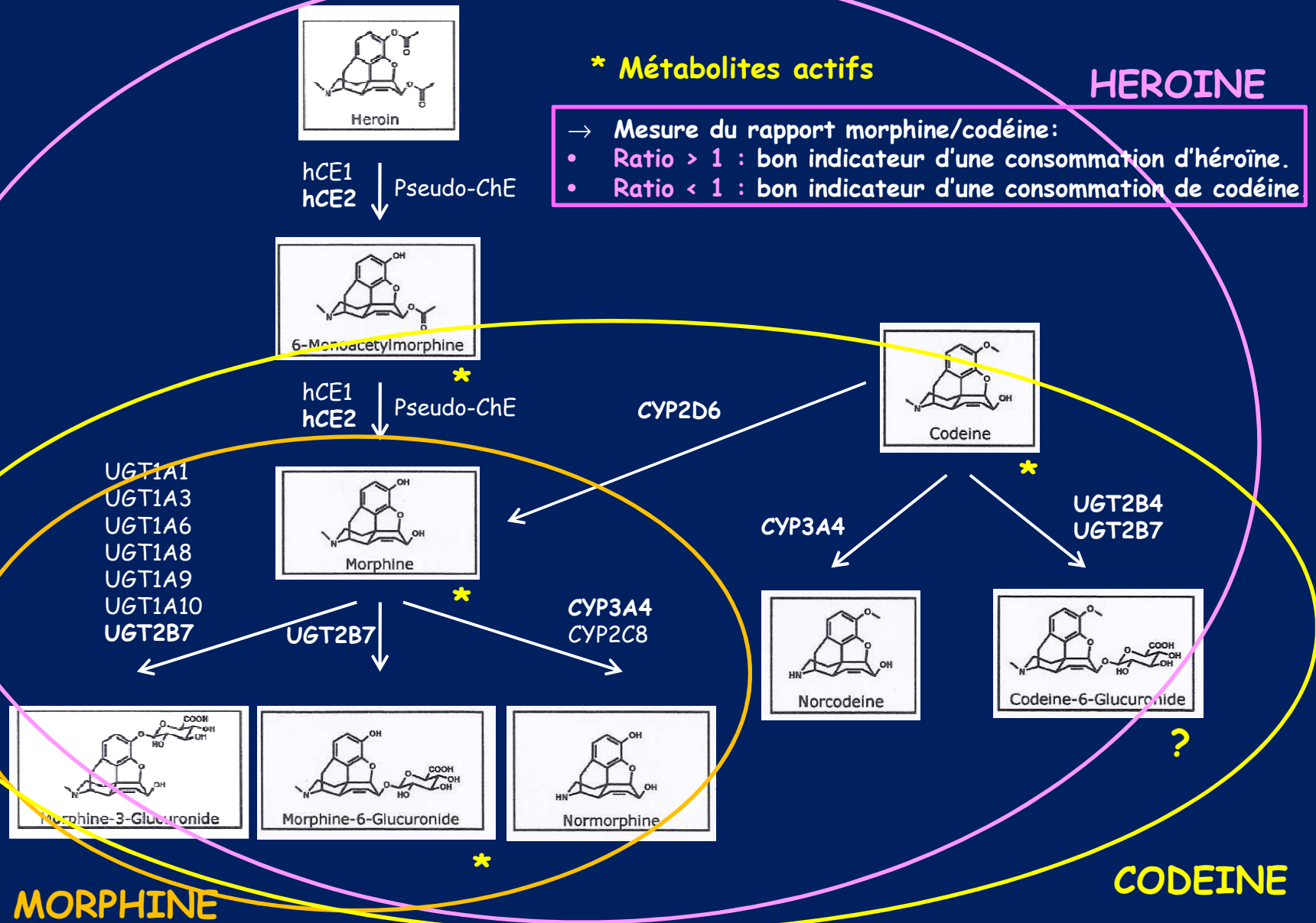
Homme, 45 ans, admis pour dyspnée, fumeur d'héroïne

Echantillon : Sérum



APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Métabolisme de l'héroïne, de la morphine et de la codéine

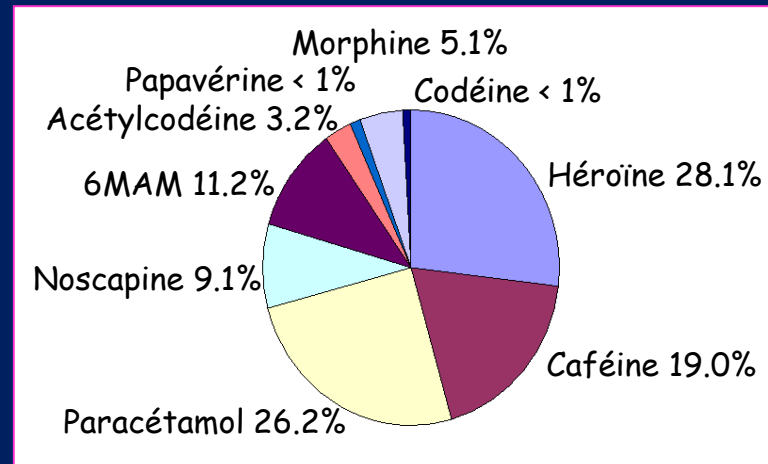


Composition de l'héroïne

L'héroïne est fabriquée à partir du pavot.
Elle contient les alcaloïdes du pavot + des composés issus des procédés chimiques utilisés lors de la fabrication.

Teneur médiane des différents composants :

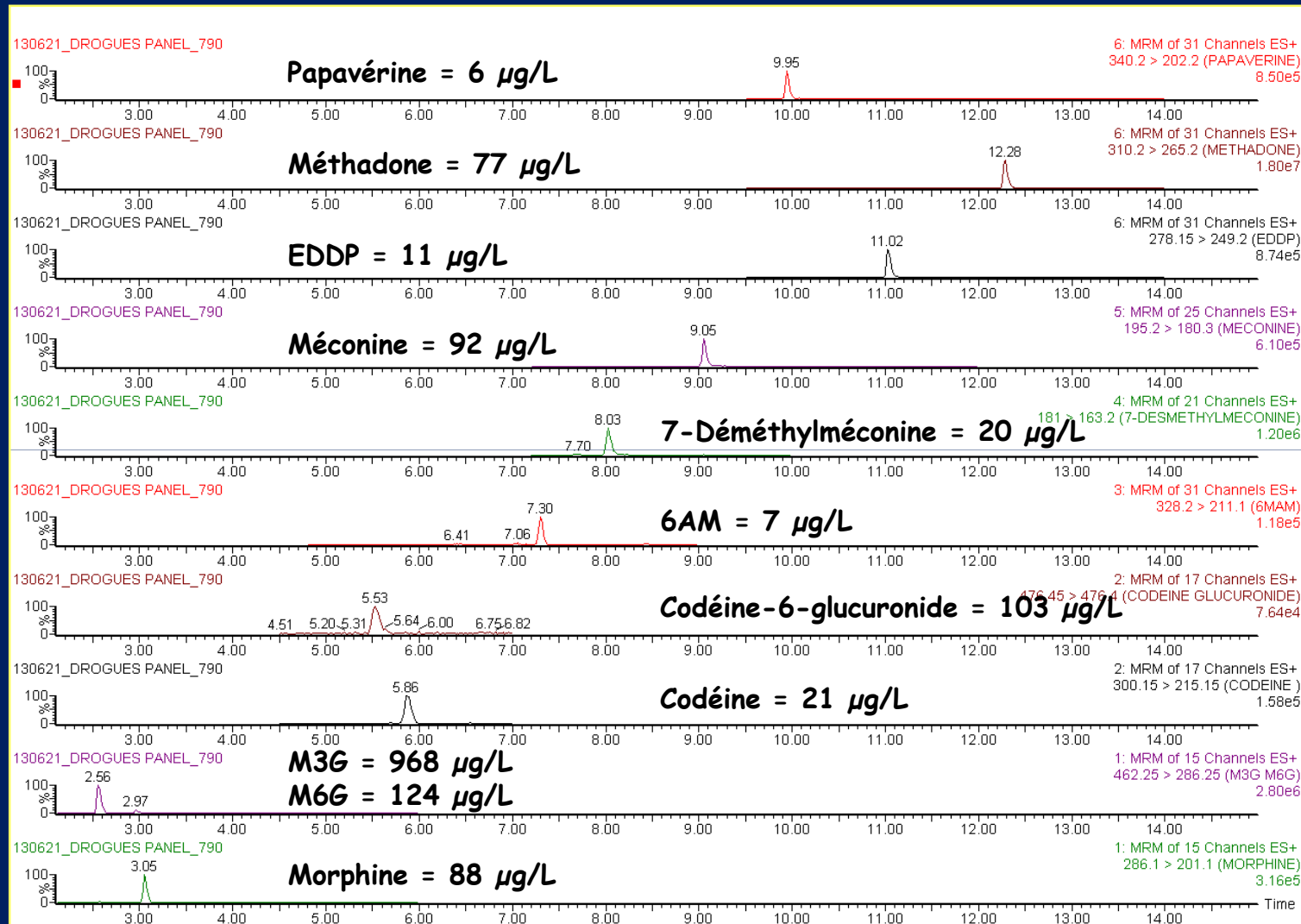
11 échantillons analysés en 2010.



APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, 45 ans, admis pour dyspnée, fumeur d'héroïne

Echantillon : Sérum

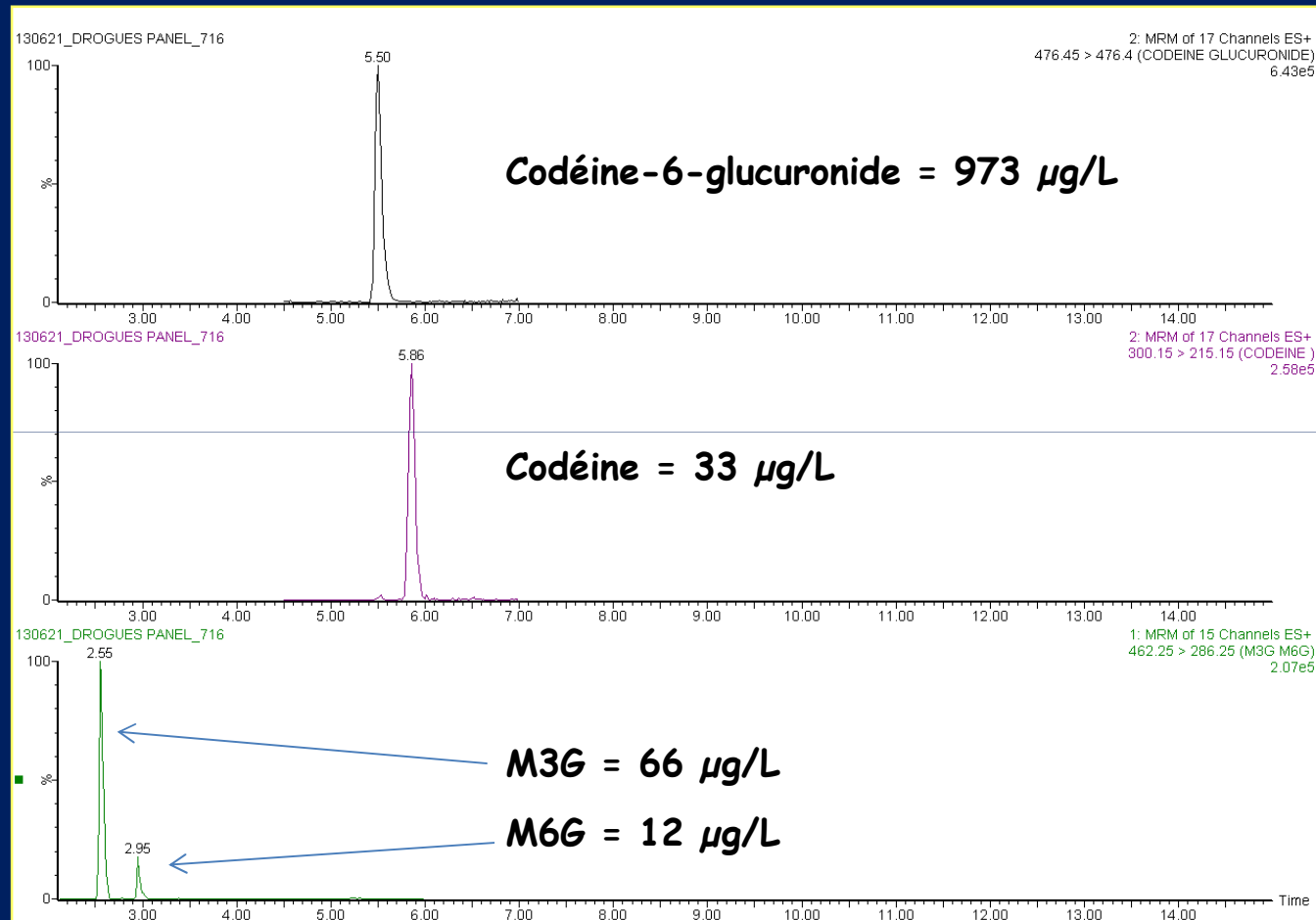


- Présence de 6AM, de méconine avec un rapport [morphine]/[codéine] > 1
- Le patient a consommé de l'héroïne et de la méthadone

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, 54 ans, admis pour malaise sur intoxication éthylique

Echantillon : Sérum

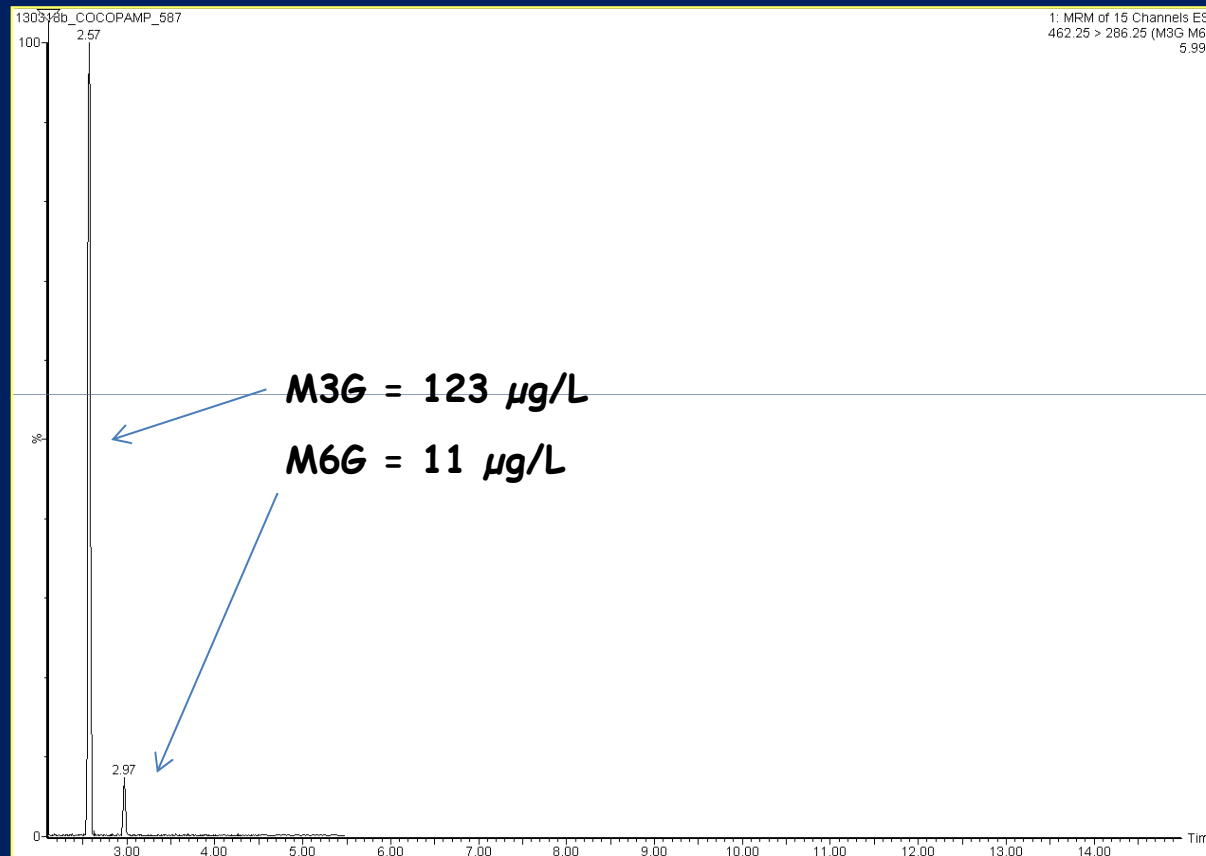


→ Le rapport [morphine]/[codéine] est > à 1
→ Le patient a consommé de la codéine

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Femme, 41 ans, admise pour intoxication médicamenteuse et éthylique
Traitement : MS Contin® (sulfate de morphine)

Echantillon : Sérum

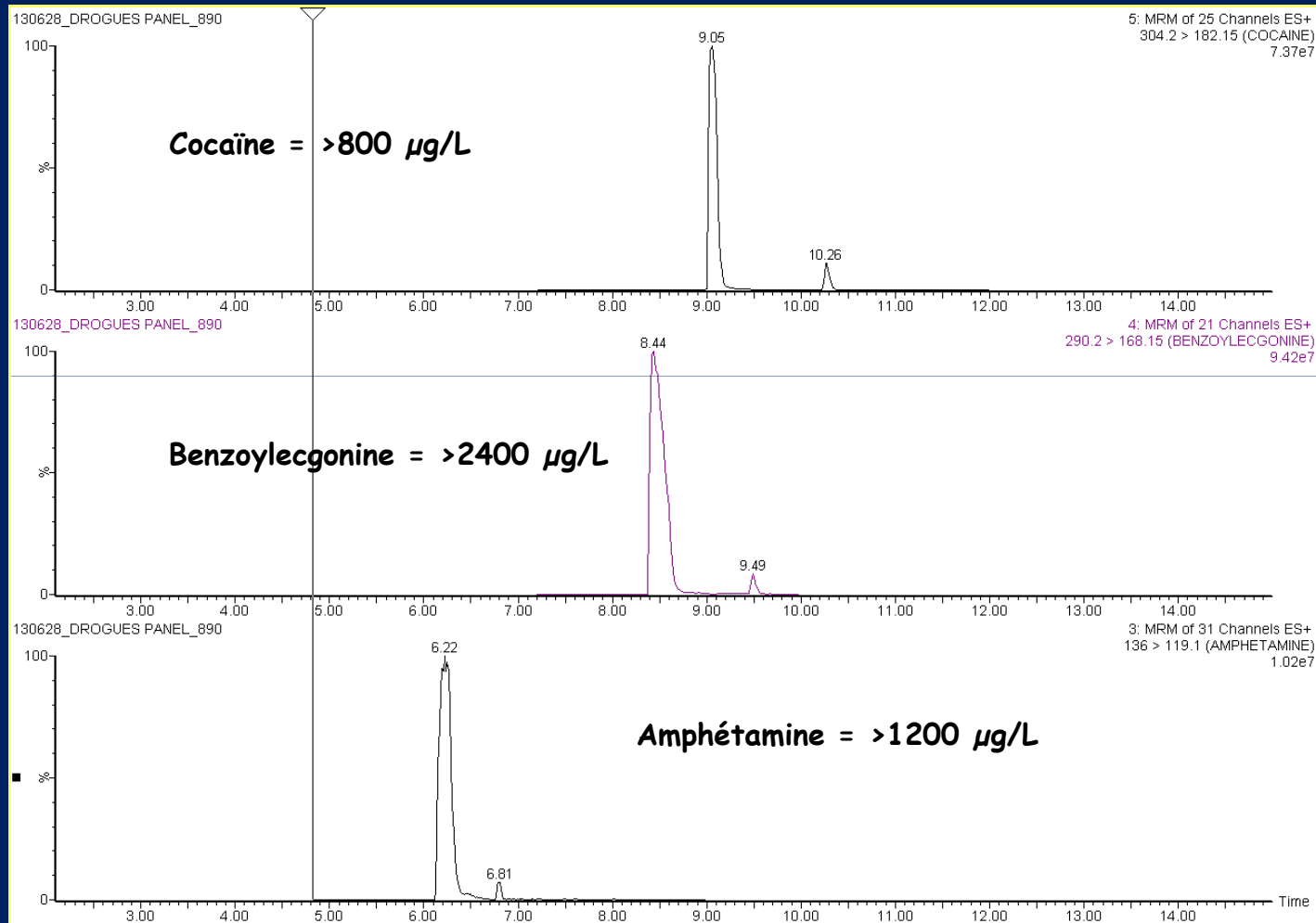


→ Il est impossible de dire quel opiacé la patiente a consommé
→ Les métabolites retrouvés sont compatibles avec une prise de morphine

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, 25 ans, admis pour céphalées.
Il dit avoir consommé de la cocaïne et des amphétamines

Echantillon : Urine

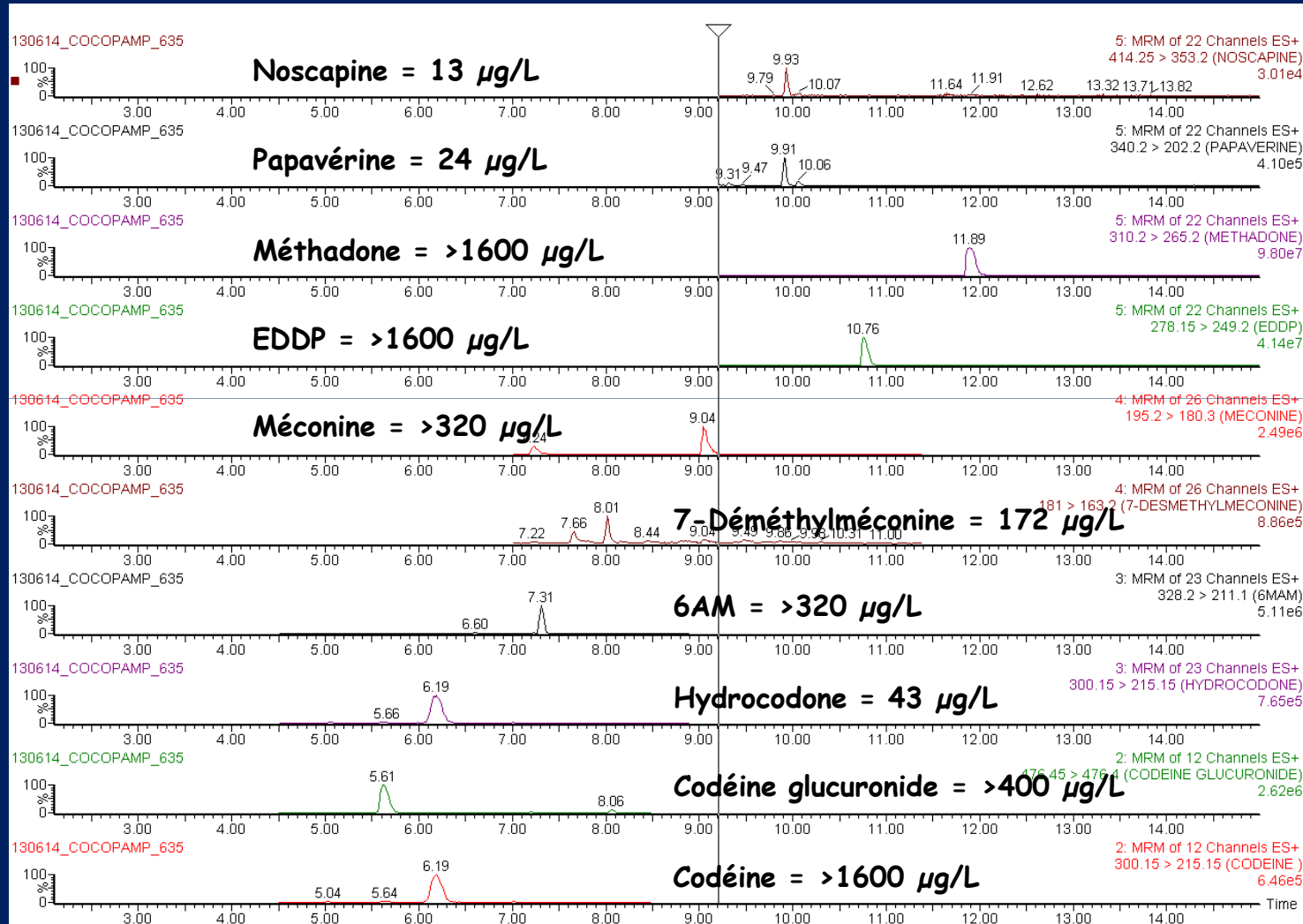


→ Le patient a consommé de la cocaïne et de l'amphétamine

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, 36 ans, pas d'information

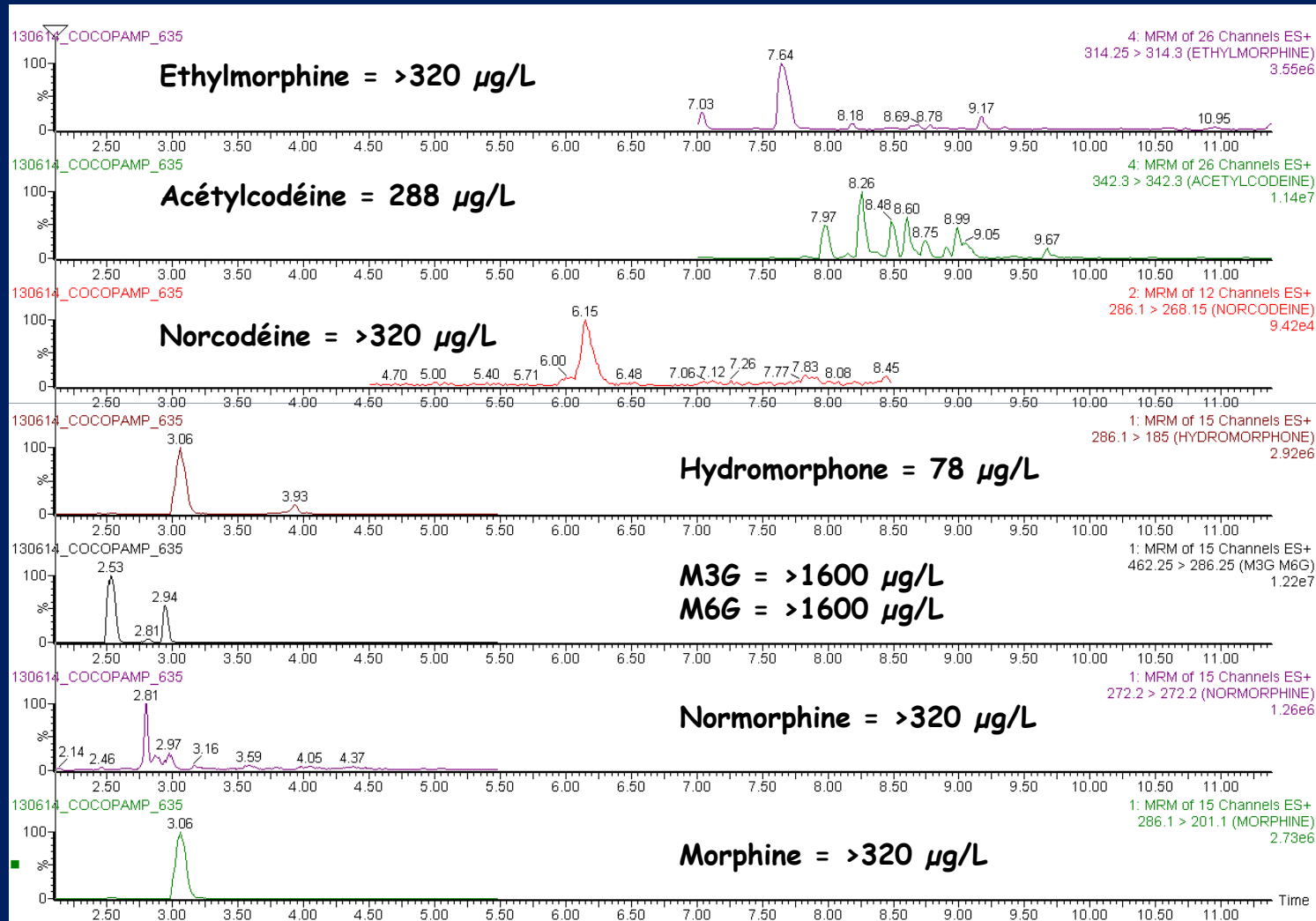
Echantillon : Urine



APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, 36 ans, pas d'information (suite)

Echantillon : Urine

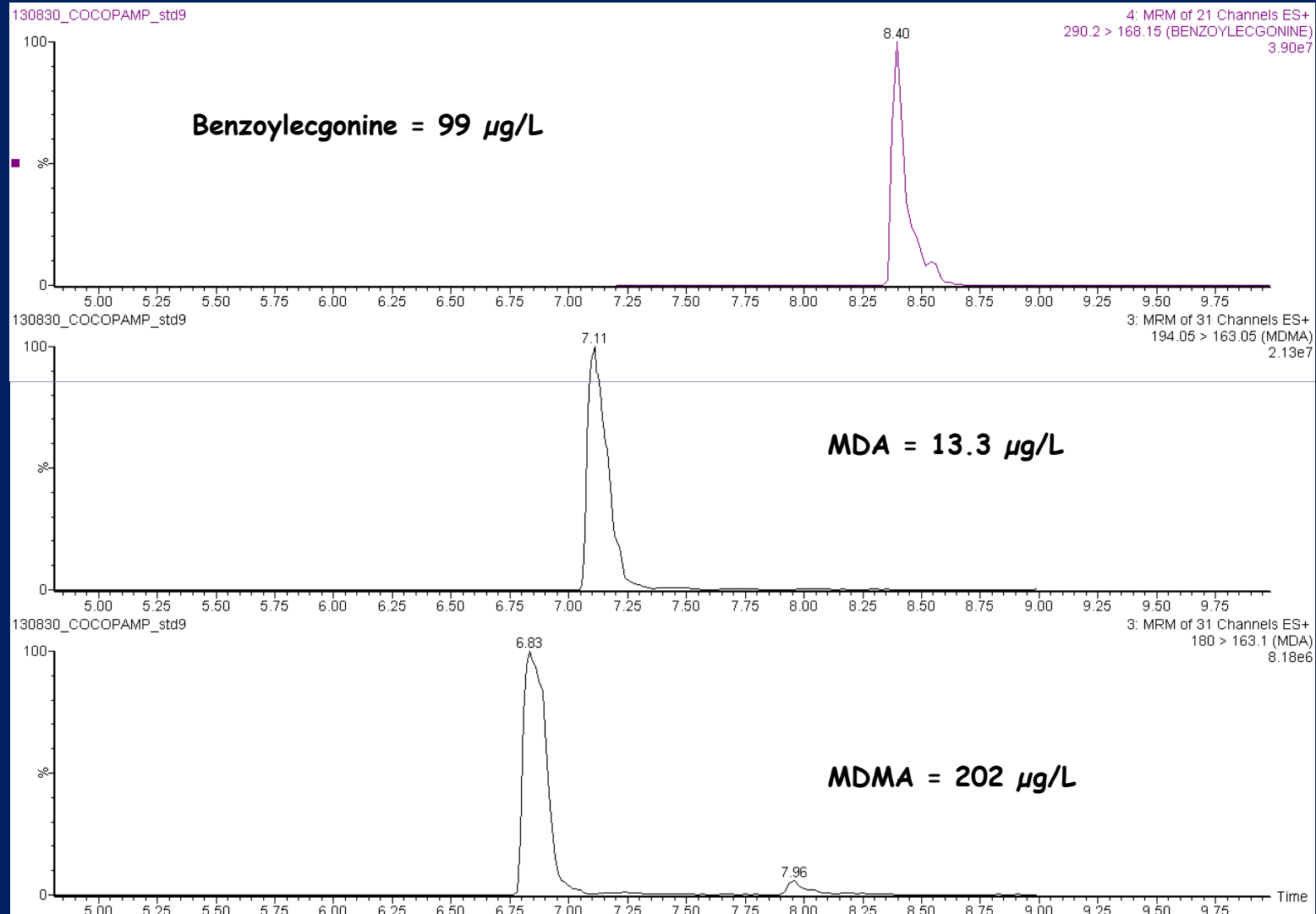


→ Le patient a consommé de l'héroïne, de la méthadone et de l'éthylmorphine

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Femme, viol

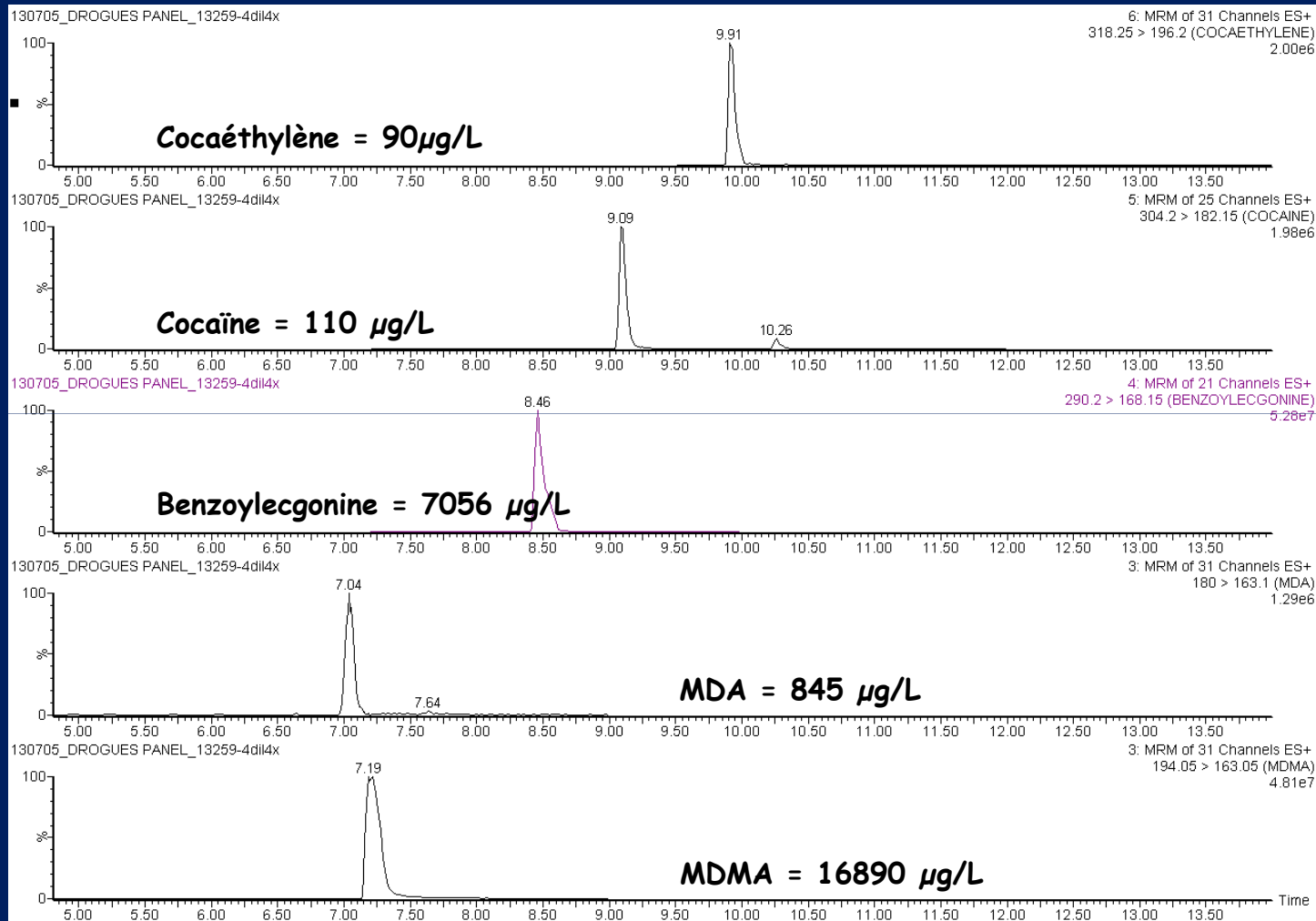
Echantillon : Sérum



APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Femme, viol, suite

Echantillon : Urine

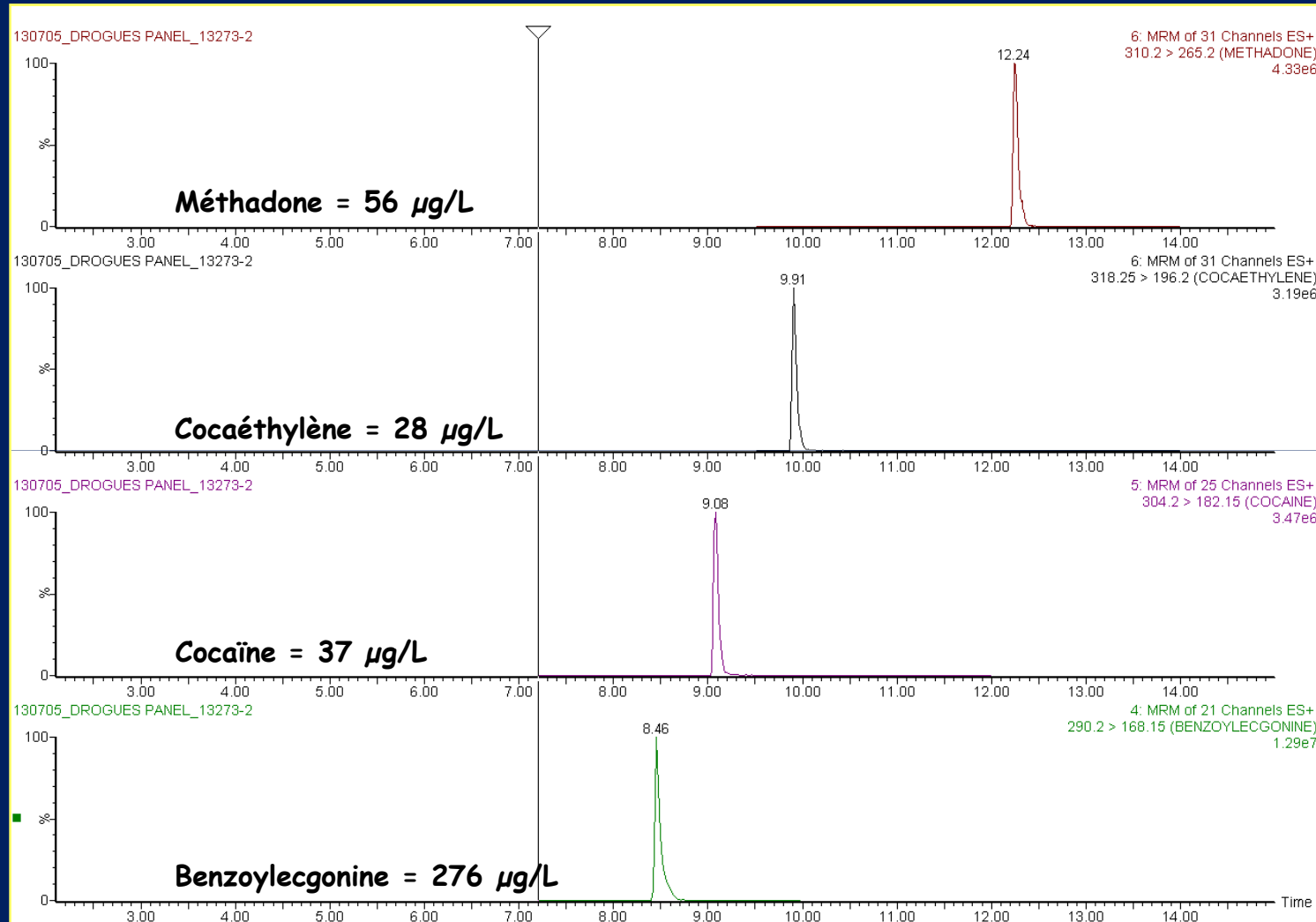


→ La victime a consommé de la cocaïne, de l'alcool et de l'ectasy

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, suspicion d'overdose

Echantillon : Sang

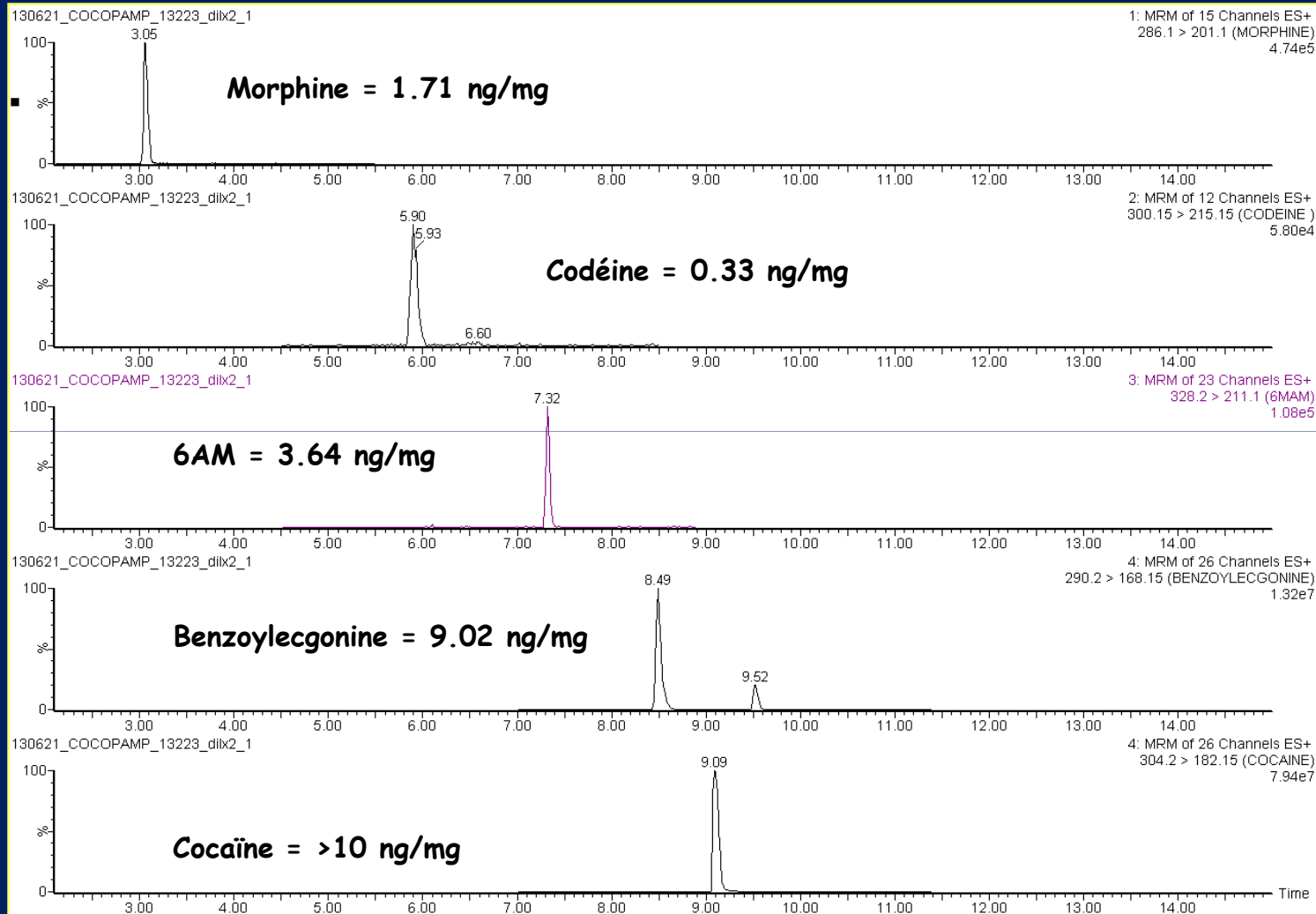


→ Le sujet est sous l'influence de cocaïne et de méthadone et avait consommé de l'alcool

APPLICATION DE LA METHODE A LA ROUTINE DU LABORATOIRE

Homme, suspect, vérifier une consommation de stupéfiants

Echantillon : Cheveux d'une longueur de 2 cm



→ Le sujet a consommé de l'héroïne et de la cocaïne endéans les 2 mois du prélèvement capillaire

CONCLUSION

PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- ✓ Méthode d'extraction rapide, applicable à une grande variété d'échantillons biologiques et utilisant un faible volume d'échantillon. Les composés glucuroconjugués étant dosés, elle ne nécessite pas une hydrolyse préalable à la SPE.

METHODE UHPLC/MSMS

- ✓ Méthode très spécifique et très sensible (MS/MS).
- ✓ Dosage SIMULTANE d'un grand nombre de molécules.
Le menu analytique peut-être étendu à la demande.

CONTRAINTE

- ✓ Disposer de standards purs pour les molécules dosées.
- ✓ Disposer de standards internes deutérés pour chaque molécule dosée.