

Article original

Mise au point et validation d'une méthode de dosage simultané de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugés totaux par chromatographie liquide d'interactions hydrophiles

Development and validation of a simultaneous determination method of morphine and total morphine glucuronides by hydrophilic interaction liquid chromatography

Yannick Lecompte^{1*}, Olivier Roussel¹, Anne-Laure Pelissier-Alicot², Martine Perrin¹

¹ Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale, 1 boulevard Théophile Sueur, 93111 Rosny-sous-Bois, France

² Service de Médecine Légale, Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

Résumé – Objectif : Dans le cadre d'une étude expérimentale de redistribution *post-mortem* des xénobiotiques menée chez le lapin, une méthode de dosage simultané de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugés totaux dans des échantillons de sang total de faible volume a été développée. **Méthode :** Les étalons internes deutérés sont ajoutés à une prise d'essai de 100 µL. La préparation des échantillons consiste en l'extraction liquide-solide sur des cartouches Oasis[®] HLB (Waters[®], Saint-Quentin-en-Yvelines, France). L'analyse est menée par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation électrospray. Les composés d'intérêt sont élués par chromatographie liquide d'interactions hydrophiles au travers d'une colonne Luna[®] HILIC – 150 mm × 2,0 mm × 3 µm (Phenomenex[®], Le Pecq, France). La méthode de dosage est validée selon le concept de l'erreur totale à l'aide du logiciel e-noval[®] (Chemcad, Obernai, France). **Résultats :** Les fonctions de réponse sont de type quadratique non pondéré. Les résultats sont linéaires sur l'ensemble de l'intervalle de dosage des analytes soit de 10 à 300 ng/mL pour la morphine et de 750 à 10 000 ng/mL pour ses métabolites glucuroconjugés totaux. La limite de détection estimée est de 3,5 ng/mL pour la morphine et de 250 ng/mL pour ses métabolites glucuroconjugés totaux. Les incertitudes de mesure sont respectivement de 15 % et de 9 %. **Conclusion :** L'extraction liquide-solide sur cartouches Oasis[®] HLB et la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles, adaptées à la séparation des molécules polaires, ont permis de mettre au point une méthode de dosage simultané de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugés totaux sur de faibles volumes d'échantillons.

Mots clés : Morphine, métabolites glucuroconjugés, chromatographie liquide haute pression, chromatographie liquide d'interactions hydrophiles

Abstract – Aim: As part of an experimental *post-mortem* drugs' redistribution study in rabbits, a method for simultaneous determination of morphine and total morphine glucuronides in small volume whole blood samples was developed. **Method:** The deuterated internal standards are added to a sample of 100 µL. Sample preparation is performed by solid-phase extraction on Oasis[®] HLB cartridges (Waters[®], Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The analysis is carried out by high performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. The separation of analytes is obtained by hydrophilic interaction liquid chromatography with a Luna[®] HILIC column – 150 mm × 2.0 mm × 3 µm (Phenomenex[®], Le Pecq, France). Analytical method is validated according to the total error approach with e-noval[®] software (Chemcad, Obernai, France). **Results:** Response functions are unweighted quadratic regressions. Analytical method is linear in measuring intervals: from 10 to 300 ng/mL for morphine and 750 to 10 000 ng/mL for total morphine glucuronides. The estimated detection limit is 3.5 ng/mL for morphine and 250 ng/mL for total morphine glucuronides. Measurement uncertainties are respectively 15% and 9%. **Conclusion:** The solid-phase extraction on Oasis[®] HLB cartridges and hydrophilic interaction liquid chromatography allowed to develop a method for simultaneous determination of morphine and total morphine glucuronides.

Key words: Morphine, glucuronides, high pressure liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography

Reçu le 5 octobre 2009, accepté après modifications le 26 février 2010

Publication en ligne le 7 avril 2010

* Correspondance : Yannick Lecompte, lecompte.yann@free.fr

Tableau I. Principales propriétés pharmacocinétiques et physicochimiques de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués.

	Morphine	Morphine-3-glucuronide	Morphine-6-glucuronide
Constante d'acidité pKa	gpt amine : 7,93 gpt phénol : 9,63 [6]	gpt acide carboxylique : 2,83 [6]	gpt acide carboxylique : 3,23 [6]
Coefficient de distribution log D (pH = 7,4 ; n-octanol/eau)	-0,07 [7]	-1,12 [7]	-0,79 [7]
Volume de distribution Vd (L/Kg)	2 à 5 [3]		0,28 [3]

(gpt : groupement)

1 Introduction

L'intensité des phénomènes de redistribution *post-mortem* des xénobiotiques dépend pour une large part de leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques [1,2]. Des études récentes ont en effet permis de confirmer l'influence de l'état d'ionisation [Péllissier-Alicot AL, données non publiées], et de la liposolubilité [3] des xénobiotiques sur les phénomènes de redistribution *post-mortem*. Afin de compléter les connaissances sur le rôle de l'hydrophilie dans les mécanismes de redistribution *post-mortem*, une étude expérimentale de la redistribution *post-mortem* de la morphine et de la morphine glucuroconjuguée, au niveau des vaisseaux thoraciques et des cavités cardiaques, a été menée. Le modèle animal utilisé est le lapin, modèle préalablement validé pour ce type d'études [3].

La glucuroconjugaison constitue la voie métabolique principale de la morphine. Selon qu'elle se produit sur l'hydroxyle phénolique en position 3 ou en position 6, la glucuroconjugaison conduit respectivement à la morphine-3-glucuronide (M3G) ou à la morphine-6-glucuronide (M6G) (figure 1). Chez l'Homme, le taux d'excrétion urinaire est de 45 à 55 % pour la M3G et de 10 à 15 % pour la M6G [4, 5]. La glucuroconjugaison confère à la M3G et à la M6G une hydrophilie supérieure à celle de la morphine (tableau I).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) après extraction liquide-liquide, technique fréquemment employée pour le dosage de la morphine en toxicologie médico-légale, ne permet pas l'analyse simultanée de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués. En effet, seule la morphine libre est dosée par cette méthode : une seconde analyse, réalisée après une étape d'hydrolyse acide ou enzymatique, est nécessaire pour déterminer la morphine totale et permettre de déduire la concentration des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine [8, 9]. Compte tenu du faible volume attendu des prélèvements sanguins chez le lapin, une méthode de dosage simultané de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués totaux par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été développée. La séparation de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués totaux est réalisée par chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (*hydrophilic interaction liquid chromatography* : *HILIC*) après préparation des échantillons par extraction liquide-solide (*solide phase extraction* : *SPE*).

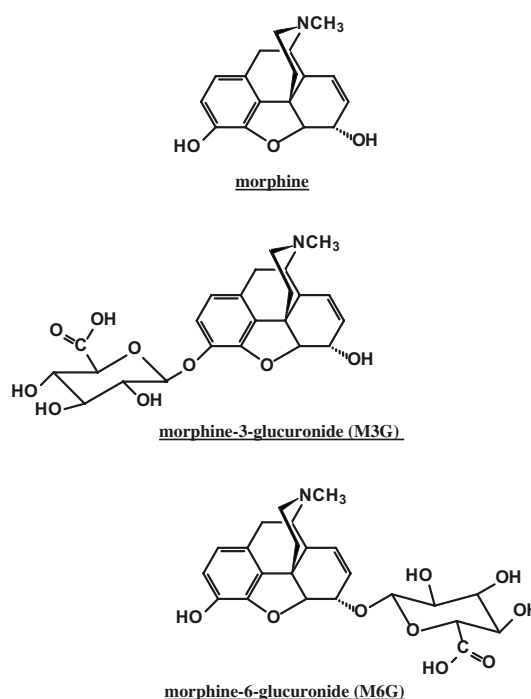


Fig. 1. Structures moléculaires de la morphine, de la morphine-3-glucuronide (M3G) et de la morphine-6-glucuronide (M6G).

2 Matériels et méthodes

2.1 Réactifs

Les réactifs employés sont de qualité « pour analyse » ou « pour chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse » :

- cartouches d'extraction SPE Oasis® HLB – 3cc ; 60 mg – (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France),
- méthanol normapur (VWR, Fontenay-sous-Bois, France),
- carbonate d'ammonium pour analyse (Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France),
- ammoniacque 20 % pour analyse (Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France),
- acide formique pour spectrométrie de masse (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France),
- formiate d'ammonium pour spectrométrie de masse (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France),

- acétonitrile pour LC/MS Riedel-de Haen[®], Chromasolv[®] (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France),
- eau ultrapure produite par un système Millipore[®] (Molsheim, France) gradient A10 équipé de cartouches Q Gard 1 et Quantum EX et d'un filtre Millipack 0,22 µm (résistivité de 18,2 MΩ/cm).

2.2 Solutions de référence

La gamme d'étalonnage et les standards de validation du dosage des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine sont réalisés à l'aide de l'isomère M3G. Les solutions de référence sont de marque Cerilliant[®] (LGC Standards, Molsheim, France) :

- morphine à 1 g/L dans du méthanol,
- morphine-3-β-D-glucuronide à 100 mg/L dans une solution méthanol/eau (50/50 ; V/V),
- morphine trideutérée (morphine-D3) à 100 mg/L dans du méthanol,
- morphine-3-β-D-glucuronide-D3 à 100 mg/L dans une solution méthanol/eau (50/50 ; V/V).

À partir de ces solutions de référence, nous avons constitué une solution mixte d'étalons non deutérés à 0,3 mg/L de morphine et 10 mg/L de morphine-3-β-D-glucuronide et une solution mixte d'étalons internes deutérés à 0,2 mg/L de morphine-D3 et 6 mg/L de morphine-3-β-D-glucuronide-D3 diluées dans un mélange méthanol/eau (50/50 ; V/V).

Les références du contrôle de qualité interne sont : Liquicheck[™] urine toxicology control C3 Bio-rad Liquicheck[®] (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

2.3 Préparation des échantillons et de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage comprend trois standards constitués de sang total exempt des xénobiotiques d'intérêt (reconstitué à partir de poches périmées de plasma et de concentrés globulaires, Centre de transfusion sanguine des Armées, Clamart, France) et surchargés à l'aide de la solution mixte d'étalons non deutérés. Les concentrations des trois standards d'étalonnage sont respectivement de 75, 150, 300 ng/mL pour la morphine et 2500, 5000, et 10 000 ng/mL pour la M3G. Cette gamme est complétée par un quatrième standard dépourvu de surcharge. Chaque série d'analyse est composée d'une gamme d'étalonnage, d'un contrôle de qualité interne et des échantillons. L'ensemble des objets d'analyse est préparé par extraction liquide-solide sur les cartouches d'extraction Oasis[®] HLB à l'aide d'un automate d'extraction Aspec[®] Série A (Gilson, Roissy-en-France, France). Les cartouches sont conditionnées successivement par 2 mL de méthanol, 2 mL d'eau ultrapure et 2 mL de carbonate d'ammonium (10 mM, pH = 8,9). La prise d'essai de 100 µL est additionnée de 50 µL de la solution mixte d'étalons deutérés et diluée dans le carbonate d'ammonium (10 mM ; pH = 8,9) pour obtenir un volume final de 1 mL. La solution ainsi constituée est déposée sur la colonne d'extraction. L'élution est effectuée par 2 mL de méthanol.

Tableau II. Paramètres du gradient d'acétonitrile et de formiate d'ammonium de la séparation chromatographique.

Temps (min)	Pourcentage d'acétonitrile	Pourcentage de formiate d'ammonium (5 mM ; pH = 2,3)
5	90 %	10 %
15	63,3 %	36,7 %
16	50 %	50 %

L'éluat est évaporé à sec sous flux d'azote. Le résidu sec est repris par 200 µL de phase mobile (acétonitrile/tampon formiate d'ammonium (5 mM ; pH = 2,3) 90/10 ; V/V) avant analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

2.4 Analyse chromatographique

L'appareil utilisé est un chromatographe en phase liquide haute performance de marque Agilent[®] Série 1100 couplé à un spectromètre de masse Agilent[®] MSD (Agilent Technologies, Massy, France). Le logiciel d'acquisition et d'exploitation des données est le logiciel ChemStation[®] – Rev. A 10. 02 (Agilent Technologies, Massy, France). La colonne chromatographique utilisée est une colonne Luna[®] HILIC – 150 mm × 2,0 mm × 3 µm – protégée par une cartouche de garde HILIC – 4 mm × 2,0 mm (Phenomenex[®], Le Pecq, France). La température de la colonne est maintenue à 20 °C. La phase mobile utilisée est un gradient d'acétonitrile et de formiate d'ammonium (5 mM ; pH = 2,3) selon les conditions chromatographiques définies dans le tableau II. Le débit de la phase mobile est de 0,25 mL/min. Le volume d'échantillon injecté dans le chromatographe est de 20 µL. À la sortie de la colonne, la phase mobile est fractionnée : seul un dixième du flux (0,025 mL/min) est analysé par le spectromètre de masse.

La détection spectrométrique est réalisée après ionisation par électrospray en mode positif (ESI+). La tension d'ionisation appliquée est de 3,5 kV. L'azote est utilisé comme gaz écran à une température de 350 °C et un débit de 5 L/min. La pression de nébulisation est de 20 psig. Le signal est acquis en mode « suivi d'ions sélectionnés » (*selective ion monitoring* : SIM). Le tableau III regroupe les rapports masse sur charge électrique (*m/z*) et les tensions de cône de fragmentation utilisées pour la détection de chaque substance. Pour chacune des molécules analysées, un ion de quantification et un ion de confirmation ont été sélectionnés (figure 2). Les étalons deutérés ont été détectés par un ion.

2.5 Validation

Le plan d'expérience retenu pour la validation de la méthode de dosage de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués totaux comporte deux séries (condition de fidélité) de quatre répétitions (condition de répétabilité). Les standards de validation sont réalisés à l'aide de sang total, exempt de xénobiotiques d'intérêt, surchargé à l'aide des solutions de référence. Ils comprennent 5 niveaux de concentration : 10, 20,

Tableau III. Ions de quantification et ions de confirmation sélectionnés pour la détection et la quantification de la morphine et ses métabolites glucuroconjugués totaux.

Molécules	Temps de rétention (min)	Ion de quantification		Ion de confirmation	
		Rapport masse sur charge électrique (m/z)	Tension de cône de fragmentation (V)	Rapport masse sur charge électrique (m/z)	Tension de cône de fragmentation (V)
morphine	3,8	286 (M+H) ⁺	200	152	350
morphine-D3	3,8	289 (M+H) ⁺	200	152	350
métabolites glucuroconjugués de la morphine	12,3	462 (M+H) ⁺	250	286	250
M3G-D3	12,3	465 (M+H) ⁺	250	289	250

(M+H)⁺ : ion moléculaire protoné

Tableau IV. Rendements de préparation des échantillons à partir d'un échantillon de sang total.

Morphine		Métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine	
Concentration (ng/mL)	Rendement de préparation (%)	Concentration (ng/mL)	Rendement de préparation (%)
20	67,11	750	39,95
100	69,59	5000	46,65
300	75,23	10 000	46,53

50, 150, et 300 ng/mL pour la morphine et 750, 1500, 3750, 5000, et 10 000 ng/mL pour la M3G. La validation du dosage des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine a volontairement été limitée à cette gamme de concentrations compte tenu de la pharmacocinétique et du métabolisme de la morphine chez le lapin [10] et des résultats des dosages réalisés lors des expérimentations animales préliminaires à l'établissement de notre protocole de recherche.

La méthode a été validée selon le principe des profils d'exactitude [11–13]. Le risque β pour la détermination de l'intervalle de confiance des mesures attendues est fixé à 5 % et les limites d'acceptation ±λ à 25 %. Les profils d'exactitudes et les paramètres de validation sont calculés à l'aide du logiciel e-noval[®]. Préalablement, la fonction de réponse optimale a été déterminée à l'aide de la fonction prévalidation de ce logiciel à partir de l'analyse des rapports d'aires obtenus. Les résultats exprimés en concentration, obtenus par la programmation de la fonction de réponse optimisée dans le logiciel Chemstation[®], sont ensuite utilisés pour la validation. Les limites de détection sont estimées au tiers de la limite inférieure de quantification.

3 Résultats

3.1 Rendements de préparation des échantillons

Les rendements de préparation des échantillons ont été évalués par l'ajout d'étalons internes deutérés après la phase d'évaporation, lors de la reprise du résidu sec. Ils prennent en compte l'extraction, la concentration et la reprise du résidu sec. Pour les métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine, les rendements de préparation des échantillons

sont déterminés à l'aide de l'isomère M3G. Les rendements de préparation d'échantillons de sang total de différentes concentrations sont présentés dans le tableau IV.

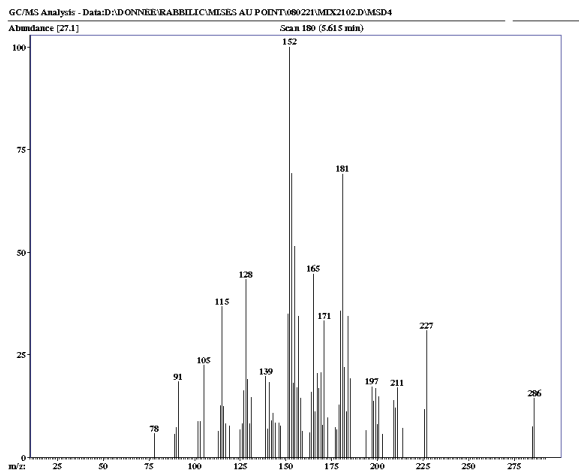
Les rendements de préparation obtenus pour la morphine sont supérieurs à 65 %. En revanche, ceux des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine n'ont pu être optimisés au-delà de 50 %. Les résultats de la validation de la méthode ont cependant confirmé que ces rendements étaient suffisants pour obtenir des limites de quantification satisfaisantes et présentaient une répétabilité convenable.

3.2 Séparation chromatographique

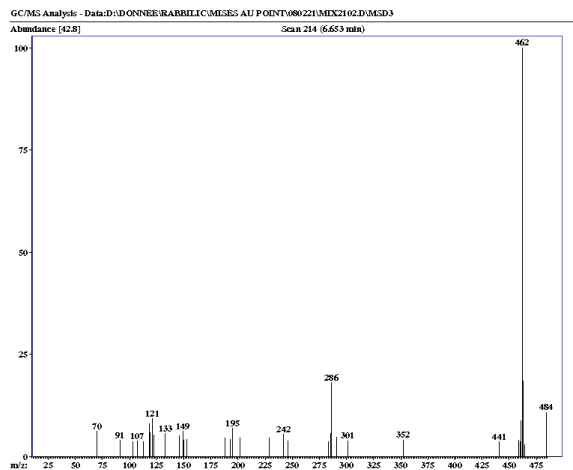
Un exemple de tracé chromatographique obtenu avec la méthode que nous avons développée est présenté en figure 2. Les spectres de masse de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués sont représentés en figure 3.

3.3 Validation

La fonction d'étalonnage optimisée pour les deux analytes lors de la phase de prévalidation est une fonction quadratique non pondérée de type $y = ax^2 + bx + c$. Les paramètres de validation des dosages de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués totaux sont résumés dans les tableaux V et VI. Les profils d'exactitude correspondants sont représentés figures 4 et 5. Le domaine d'exactitude de la méthode de dosage s'étend de 10 à 300 ng/mL pour la morphine et de 750 à 10 000 ng/mL pour ses métabolites glucuroconjugués totaux. Les fonctions de réponse sont monotones et les résultats sont linéaires sur l'ensemble des domaines d'exactitude.



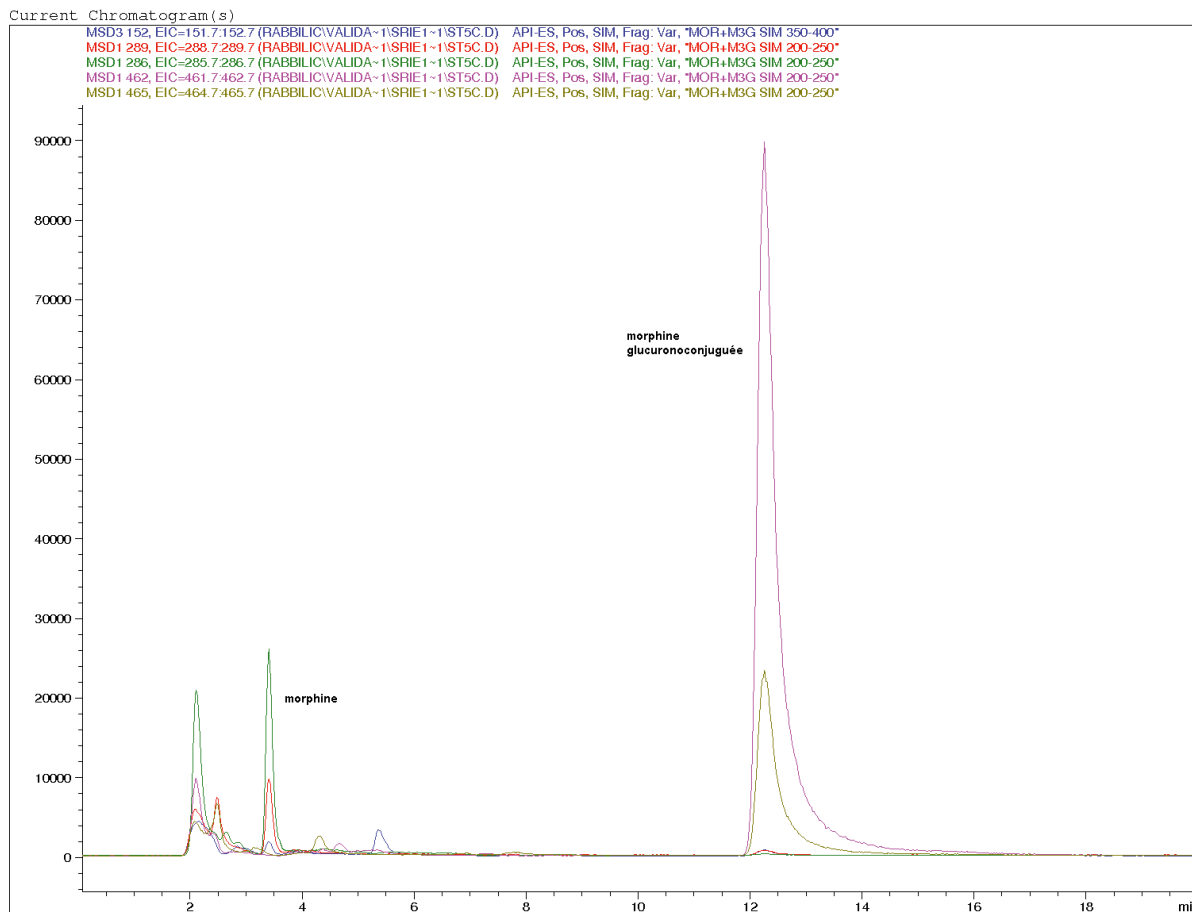
(a) spectre de masse de la morphine (mode balayage ; tension de cône de fragmentation : 350 V)



(b) spectre de masse des métabolites glucuroconjugués de la morphine : exemple du M3G (mode balayage ; tension de cône de fragmentation : 250 V)

Fig. 2. Spectres de masse de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués (choix des ions de confirmation).

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



Instrument 1 12/08/2008 11:45:13 IRCGN-TOX Page 1 of 1

Fig. 3. Séparation chromatographique de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués totaux (morphine : 300 ng/mL; M3G : 10000 ng/mL).

Tableau V. Paramètres de validation de la méthode de dosage de la morphine dans le sang total.

Morphine			
Concentration du standard de validation (ng/mL)	Écart-type de fidélité intermédiaire ¹ (%)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
10	6,752	5,835	105,8
20	4,884	-5,785	94,22
50	4,819	-10,17	89,83
175	5,005	-0,5395	99,46
300	4,345	-2,031	97,97

¹ L'écart-type de fidélité intermédiaire S_{FI} est calculé à partir de la variance de répétabilité S_R^2 et de la variance intersérie S_{IS}^2 selon la formule suivante : $S_{FI}^2 = S_R^2 + S_{IS}^2$.

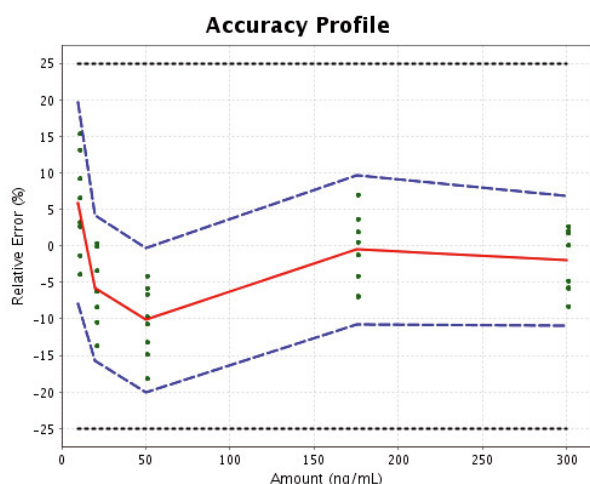


Fig. 4. Profil d'exactitude du dosage de la morphine.

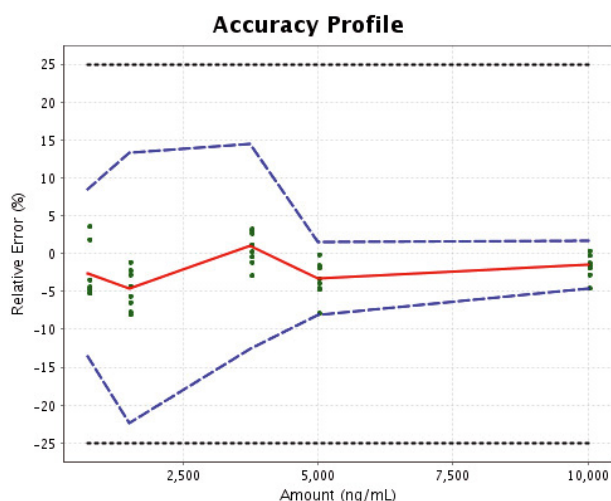


Fig. 5. Profil d'exactitude du dosage des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine.

Les limites de détection (LD) sont estimées respectivement à 3,5 ng/mL pour la morphine et à 250 ng/mL pour ses métabolites glucuroconjugués totaux. La LD réelle du dosage des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine est probablement inférieure à cette valeur. Toutefois, compte

Tableau VI. Paramètres de validation de la méthode de dosage des métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine dans le sang total.

Métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine			
Concentration du standard de validation (ng/mL)	Écart-type de fidélité intermédiaire ¹ (%)	Biais relatif (%)	Recouvrement (%)
750	3,881	-2,552	97,45
1500	3,267	-4,558	95,44
3750	2,706	0,9725	101,00
5000	2,376	-3,263	96,74
10 000	1,522	-1,440	98,56

¹ L'écart-type de fidélité intermédiaire S_{FI} est calculé à partir de la variance de répétabilité S_R^2 et de la variance intersérie S_{IS}^2 selon la formule suivante : $S_{FI}^2 = S_R^2 + S_{IS}^2$.

tenu des concentrations retenues pour les standards de validation, il n'est pas possible d'obtenir une meilleure estimation. Le tableau VII indique les incertitudes relatives élargies déterminées pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour chacun des analytes : l'incertitude relative maximale est de 15 % pour la morphine et de 9 % pour ses métabolites glucuroconjugués totaux.

4 Discussion

4.1 Préparation des échantillons

Les techniques d'extraction liquide-liquide ne permettent pas l'extraction simultanée de molécules de polarités opposées telles que la morphine et ses métabolites glucuroconjugués. Seule une extraction liquide-solide à l'aide d'une phase stationnaire adaptée permet d'y parvenir. La phase stationnaire des cartouches d'extraction SPE Oasis[®] HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) est un copolymère macroporeux composé d'un monomère lipophile (*m*-divinylbenzène) et d'un monomère hydrophile (*N*-vinylpyrrolidone). Ces deux monomères constituent un système de balance hydrophile-lipophile en

Tableau VII. Incertitudes relatives élargies déterminées pour chacune des concentrations de standard de validation.

Morphine		Métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine	
Concentration du standard de validation (ng/mL)	Incertitude relative élargie (%)	Concentration du standard de validation (ng/mL)	Incertitude relative élargie (%)
10	14,32	750	8,846
20	10,36	1500	7,859
50	10,22	3750	6,474
175	10,62	5000	5,041
300	9,218	10 000	3,241

phase inverse permettant l'extraction conjointe de composés aux propriétés chimiques différentes (polaires, apolaires, acides, neutres, basiques) à partir de matrices complexes [14]. L'application de cette technique pour l'extraction simultanée de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués à partir d'échantillons de sang total de faible volume s'est révélée efficace et reproductible. Toutefois, l'optimisation des rendements de préparation des échantillons a été limitée par la nécessité d'employer un solvant de reprise du résidu sec pauvre en phase aqueuse. La chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) met en effet en œuvre une phase stationnaire hydrophile avec une phase mobile composée d'une forte proportion de solvant organique et d'une faible proportion de tampon aqueux. Du fait de la mauvaise solubilité des composés polaires dans l'acétonitrile, le rendement de préparation des échantillons pour les métabolites glucuroconjugués totaux de la morphine n'a pu être amélioré.

4.2 Séparation chromatographique

Contrairement à la chromatographie de phase inverse, la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) s'avère particulièrement adaptée à la séparation des composés basiques polaires et hydrophiles tels que les métabolites glucuroconjugués de la morphine. Le mécanisme de rétention principal en mode HILIC repose sur le système de partition liquide-liquide créé entre la couche fortement aqueuse formée par la phase mobile à la surface de la phase stationnaire d'une part, et la phase mobile faiblement aqueuse d'autre part. En fonction de la nature de la phase stationnaire, d'autres mécanismes de rétention contribuent à la séparation des composés hydrophiles polaires comme les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques fortes ou les échanges d'ions [15, 16]. Dans le cadre du protocole expérimental pour lequel nous avons développé la méthode décrite dans cet article, nous avons choisi de doser les métabolites glucuroconjugués de la morphine de manière globale, sans séparer spécifiquement la M3G et la M6G. En effet, chez le lapin, la M3G est le métabolite glucuroconjugué majoritaire : les taux d'excrétion urinaire après une administration IV d'une dose de morphine de $1,32 \text{ mg kg}^{-1}$ sont en effet de 7,30 % pour la morphine libre, de 88,72 % pour la M3G et de 1,96 % pour la M6G [10]. Du fait des faibles concentrations sanguines attendues en M6G, il aurait ainsi été difficile d'observer, pour cet isomère étudié individuellement, des différences significatives de concentration

entre les différents compartiments vasculaires et de mettre en évidence des phénomènes de redistribution *post-mortem*. La co-élution de la M3G et de la M6G a donc été volontairement recherchée dans notre développement analytique.

Les méthodes de dosage spécifique de la M3G et de la M6G décrites dans la littérature mettent en œuvre des phases stationnaires zwitterioniques (ZIC-HILIC : *zwitterionic ion chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography*) dont les groupements fonctionnels permettent des interactions électrostatiques faibles [17, 18]. Les mécanismes d'échanges d'ions entre ces phases stationnaires et les groupements acide carboxylique des métabolites glucuroconjugués de la morphine (figure 1), caractérisés par des constantes d'acidité différentes (tableau I), permettent alors de séparer spécifiquement les deux isomères [16]. Dans notre mise au point, la phase stationnaire sélectionnée pour obtenir la co-élution des métabolites glucuroconjugués de la morphine est une phase neutre comportant des groupements fonctionnels diols. Ce type de phase favorise les interactions dipôle-dipôle et ne présente pas d'interactions électrostatiques [16]. La rétention des métabolites glucuroconjugués de la morphine repose donc essentiellement sur la formation de liaisons hydrogènes. Le nombre identique de groupements protiques (hydroxyl) entre la M3G et la M6G explique la co-élution de ces deux isomères [19].

5 Conclusion

L'emploi d'une technique d'extraction liquide-solide en phase inverse sur un support polymérique constituant une balance hydrophile-lipophile, pour la préparation des échantillons, et de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) couplée à la spectrométrie de masse, pour la séparation et la détection des analytes, ont permis de développer une méthode de dosage simultané de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués totaux à partir d'échantillons de sang total de faible volume. Cette méthode répond parfaitement aux besoins d'une étude de redistribution *post-mortem* chez un animal de petite taille tel que le lapin et présente des performances analytiques correctes (limite de détection de $3,5 \text{ ng/mL}$ pour la morphine). La méthode de dosage présentée dans cet article constitue une bonne illustration de l'apport de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles dans la séparation des molécules hydrophiles polaires. L'optimisation des conditions chromatographiques demeure toutefois

complexe du fait de la multiplicité des mécanismes de rétention potentiellement impliqués. Le mécanisme de rétention prédominant est en effet difficilement prédictible : il dépend non seulement de la structure de l'analyte mais aussi de la composition de la phase mobile et de la nature des groupements fonctionnels de la phase stationnaire. La méthode que nous avons développée a été validée selon le concept de l'erreur totale à l'aide des profils d'exactitude. Cette approche graphique permet de valider une méthode en examinant de manière globale les paramètres de justesse et de fidélité intermédiaire et d'en déduire aisément les limites de quantification et le domaine de dosage. Elle répond aux exigences fondamentales de la norme ISO/IEC 17025 en terme de validation des méthodes et d'estimation des incertitudes de mesure [20].

Références

- Pélessier-Alicot AL, Gaulier JM, Champsaur P, Marquet P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. *J Anal Toxicol.* 2003; 27(8): 533–544.
- Drummer OH. Post-mortem toxicology. *Forensic Sci Int.* 2007; 165(2-3): 199–203.
- Pélessier-Alicot AL, Gaulier JM, Dupuis C, Feuerstein M, Léonetti G, Lachâtre G, Marquet P. Post-mortem redistribution of three beta-blockers in the rabbit. *Int J Legal Med.* 2006; 120(4): 226–232.
- Milne RW, Nation RL, Somogyi AA. The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev.* 1996; 28(3): 345–472.
- Christrup LL. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1997; 41: 116–122.
- Milne RW, Nation RL, Somogyi AA. The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev.* 1996; 28(3): 345–472.
- Avdeef A, Barrett DA, Shaw PN, Knaggs RD, Davis SS. Octanol-, chloroform-, and propylene glycol dipelargonat-water partitioning of morphine-6-glucuronide and other related opiates. *J Med Chem.* 1996; 39(22): 4377–4381.
- Bosch ME, Sánchez AR, Rojas FS, Ojeda CB. Morphine and its metabolites: analytical methodologies for its determination. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(3): 799–815.
- Wang P, Stone JA, Chen KH, Gross SF, Haller CA, Wu AH. Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(8): 570–575.
- Matsuzawa T, Wada Y, Shimoyama M, Nakajima K, Seki T, Sugibayashi K, Morimoto Y. The effect of different routes of administration on the metabolism of morphine: the disposition of morphine and its metabolites after topical application. *Biopharm Drug Dispos.* 1994; 15(8): 665–678.
- Hubert P et coll. Validation des procédures analytiques quantitatives – harmonisation des démarches – STP Pharma Pratiques. 2003; 13(3): 101–138.
- Feinberg M, Boulanger B, Dewé W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem.* 2004; 380: 502–514.
- Hubert P, Rozet E, Boulanger B, Dewé W, Laurentie M, Dubois N, Charlier C, Feinberg M. Harmonisation of validation strategies and estimation of the associated uncertainty in the framework of assay laboratories accreditation. *Acta Clin Belg Suppl.* 2006; 1: 54–56.
- Blahova E, Brandsteterova E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. *Chem Pap.* 2004; 58(5): 362–373.
- Hsieh Y. Potential of HILIC-MS in quantitative bioanalysis of drugs and drug metabolites. *J Sep Sci.* 2008; 31(9): 1481–1491.
- Dejaegher B, Mangelings D, Vander Heyden Y. Method development for HILIC assays. *J Sep Sci.* 2008; 31(9): 1438–1448.
- Bengtsson J, Jansson B, Hammarlund-Udenaes M. On-line desalting and determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in microdialysis and plasma samples using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19(15): 2116–2122.
- Vikingsson S, Kronstrand R, Josefsson M. Retention of opioids and their glucuronides on a combined zwitterion and hydrophilic interaction stationary phase. *J Chromatogr A.* 2008; 1187(1-2): 46–52.
- Hao Z, Xiao B, Weng N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J Sep Sci.* 2008; 31(9): 1449–1464.
- Organisation internationale de normalisation. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Norme ISO/IEC 17025:2005.