

Soumission chimique. Recherche des benzodiazépines et hypnotiques dans les cheveux par LC-MS/MS

Testing for benzodiazepines and hypnotics in hair by LC-MS/MS with a special focus on drug-facilitated crimes

Marion VILLAIN, Vincent CIRIMELE, Pascal KINTZ*

Laboratoire ChemTox, 3, rue Grüninger - 67400 ILLKIRCH - FRANCE

*Auteur à qui adresser la correspondance : Pascal KINTZ, X'pertise Consulting, Laboratoire ChemTox, 3, rue Grüninger - 67400 ILLKIRCH - FRANCE
Tél : +33 3 90 403 332 - Fax : +33 3 90 400 541 - E-mail : pkintz@labochemtox.com

(Reçu le 10 janvier 2005 ; accepté après modifications le 2 avril 2005)

RÉSUMÉ

La preuve biologique d'un acte délictueux ou criminel est une des bases de l'expertise judiciaire. Dans le cadre de la soumission chimique, l'analyse des cheveux peut se montrer déterminante. Nous présentons ici une méthode de criblage de 16 benzodiazépines et hypnotiques (alprazolam, 7-aminoclonazépam, 7-aminoflunitrazépam, bromazépam, clobazam, diazépam, lorazépam, lormetazépam, midazolam, nordiazépam, oxazépam, temazépam, tetrazépam, triazolam, zaleplon et zolpidem) dans les cheveux et poils en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Cette procédure comporte une étape de décontamination par le dichlorométhane, une segmentation des cheveux (segments de 2 ou 3 cm) suivi d'un découpage plus fin de chaque segment (1-2 mm), une incubation dans un tampon phosphate (pH 8,4) en présence de 1 ng de diazepam-d₅ utilisé comme étalon interne, une extraction de type liquide/liquide par du dichlorométhane / ether diéthylique (90/10), une séparation sur colonne XTerra C18 et une détection par spectrométrie de masse en tandem en utilisant 2 transitions par composé. A partir d'une masse de 20 mg de

SUMMARY

A procedure is presented for the screening of 16 benzodiazepines and hypnotics in human hair by LC-MS/MS (alprazolam, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, bromazepam, clobazam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, midazolam, nordiazepam, oxazepam, temazepam, tetrazepam, triazolam, zaleplon and zolpidem). The method involves decontamination of hair with methylene chloride, segmentation, hair cut into small pieces, incubation of 20 mg in phosphate buffer (pH 8.4) in the presence of 1 ng diazepam-d₅ used as internal standard, liquid-liquid extraction with methylene chloride/diethyl ether (90/10) and separation using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The limits of quantification for all benzodiazepines and hypnotics range from 0.5 to 5 pg/mg using a 20-mg hair sample. Linearity is observed from the limit of quantification of each compound to 200 pg/mg ($r^2 > 0.99$). Coefficients of variation measured on 6 points and at 2 concentrations (10 and 50 pg/mg) range from 5 to 20 % for all drugs but one. Extraction recovery, measured at the 2 same concentrations range from 32 to 76 %. These results were found suitable to

cheveux, les limites de quantification (LOQ) sont de l'ordre de 0,5 à 5 pg/mg. La linéarité a été vérifiée pour chaque composé depuis la LOQ jusqu'à 200 pg/mg. Les coefficients de variation, mesurés en 6 points et à 2 concentrations (10 et 50 pg/mg) ont variés de 5 à 20 % pour toutes les molécules sauf pour le 7-aminoclonazépam. Aux mêmes concentrations, les rendements d'extraction étaient compris entre 32 et 76 %. Ces résultats démontrent que la méthode est efficace pour identifier 16 benzodiazépines et hypnotiques et pour les quantifier à très faibles concentrations, devenant ainsi un outil de choix pour démontrer une exposition unique.

MOTS-CLÉS

benzodiazépines, hypnotiques, cheveux, soumission chimique, LC-MS/MS.

Introduction

Dans le langage courant de la toxicologie, l'analyse des cheveux est essentiellement associée au dépistage des conduites addictives à long terme, en particulier aux stupéfiants. Les concentrations généralement mesurées sont de l'ordre du ng/mg, souvent plus. A la fin des années 90, la mise sur le marché d'outils plus sensibles (couplage MS/MS) a permis d'ouvrir de nouveaux champs d'applications, comme par exemple le dépistage du dopage.

Beaucoup plus récemment, les experts judiciaires se sont intéressés à la possibilité de mettre en évidence dans les cheveux une exposition unique, à une faible dose (1 unité galénique), dans le cadre de la soumission chimique, situation impliquant des vols ou des viols sous l'influence d'une substance psycho-active utilisée comme arme chimique.

Après l'alcool et le cannabis, les benzodiazépines et hypnotiques sont les agents chimiques les plus utilisés comme agent incapacitant, en Europe et aux Etats Unis. Néanmoins, la littérature sur le sujet "benzodiazépine et cheveu" se révèle pauvre.

Un ancien article (1), faisant appel à la radioimmuno-détection, rapportait l'identification par analyse des cheveux de patients traités par le diazépam, mais pas ceux sous alprazolam ni lorazépam. Un peu plus tard (1995), Couper et al (2) confirmaient, par HPLC, la difficulté de retrouver des benzodiazépines dans les cheveux. En effet, leur méthode n'était pas assez sensible pour retrouver du diazépam, du nitrazépam et de l'oxazépam chez des patients sous traitement.

Une grande avancée a été obtenue par l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Tour à tour, Kintz et al (3) pour le nordiazépam et l'oxazépam, Gaillard et Pépin (4) pour l'alprazolam, Cirimele et al pour le flunitrazépam et son métabolite (5) et le lorazépam (6) et enfin

screen for 16 benzodiazepines in hair and detect them at very low concentrations, making this method suitable to monitor single dose.

KEY-WORDS

benzodiazepines, hypnotics, hair, LC-MS/MS.

Negrusz et al (7) pour le clonazépam et son métabolite décrivaient des méthodes applicables à des concentrations thérapeutiques à long terme.

Ces méthodes n'étaient proposées que pour doser une molécule, voire son métabolite. C'est en 1997 que Cirimele et al (8) ont décrit une application pour identifier simultanément 8 benzodiazépines avec des limites de détection (LOD) de l'ordre de 1 à 20 pg/mg. Plus tard, El Mahjoub et al (9), par HPLC et pour 5 molécules avaient une LOD de l'ordre de 200 pg/mg. Plus récemment, Kronstrand et al (10) ont publié une procédure de criblage de 7 composés et métabolites par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) applicable à des cheveux de sujets en psychiatrie, avec des limites de quantification (LOQ) de l'ordre de 25-125 pg/mg.

Les concentrations à mesurer dans le cadre de la soumission chimique étant de l'ordre du pg/mg, nous avons développé une approche analytique simple, ultrasensible, mais aussi hautement spécifique (2 transitions par molécule) grâce à l'emploi de la LC-MS/MS.

Matériel et méthode

Échantillons

Des échantillons témoins négatifs ont été obtenus en coupant des mèches de cheveux au personnel du laboratoire et en vérifiant par cette méthode l'absence de tout signal.

Les cheveux des victimes d'agression sexuelle ou de vol ont été prélevés selon le protocole du laboratoire présenté Figure 1.

Réactifs, produits chimiques

Les molécules suivantes, alprazolam, 7-amino-clonazépam, 7-amino-flunitrazépam, bromazépam, clobazam,

Prélèvement de cheveux en cas de soumission chimique



Quand

3 à 5 semaines après les faits

Combien

4 mèches d'environ 100 cheveux, c'est-à-dire l'équivalent du diamètre d'un crayon de papier par mèche

Où

en vertex postérieur, c'est-à-dire sur l'arrière et le haut du crâne

Comment

- orienter la mèche en maintenant les cheveux ensemble à l'aide d'une cordelette nouée à 1 cm de la racine ; l'orientation est nécessaire pour pouvoir segmenter les cheveux et ainsi retracer l'historique des faits.

- couper avec des ciseaux, de façon nette, le plus près possible de la peau.

Ne pas arracher les cheveux !

Ne pas mettre de scotch !

→ Conservation dans une enveloppe ou un tube sec, à température ambiante

A demander à la victime et à noter sur la réquisition

- Suivait-elle un traitement médicamenteux AVANT les faits ?
- Suit-elle un traitement médicamenteux DEPUIS les faits ?
- Si oui, quels produits et à quelle posologie ?
- Les cheveux ont-ils subi une coloration depuis les faits ?

Figure 1 : Protocole de prélèvement des cheveux de victimes de soumission chimique.

diazépam, lorazépam, lormetazépam, midazolam, nordiazépam, oxazépam, temazépam, triazolam, zolpidem et diazépam-d₅ ont été achetées chez Promochem (Molsheim, France). Le tetrazépam a été acheté chez Euromedex (Souffelweyersheim, France). Le zaleplon a été offert par les laboratoires Wyeth (Paris, France). L'acide formique ultra-pur vient de chez Prolabo (Paris, France). L'acétonitrile, le méthanol et le dichlorométhane, de qualité HPLC, ont été achetés chez Merck (Darmstadt, Germany). L'éther diéthylique provient de SDS (Peypin, France). L'hydrogénophosphate d'ammonium - (NH₄)₂HPO₄ ajusté à pH 8.4 - a été acheté chez Merck (Darmstadt, Germany).

Les xénobiotiques et le diazépam-d₅ ont été préparés dans le méthanol et conservés à +4° C.

Extraction

Après décontamination de la mèche de cheveux par du dichlorométhane (2 x 5 ml pendant 2 min), les cheveux sont segmentés (en fonction des données du dossier, de la date des faits, de la date du prélèvement et sur la base d'une vitesse de pousse de 1 cm/mois) puis chaque segment est coupé en petits fragments de 1 à 2 mm. Environ 20 mg sont incubés toute la nuit dans 1 ml de tampon phosphate pH 8,4, en présence de 1 ng de diazépam-d₅ utilisé comme étalon interne (EI) et extraits par 5 ml de dichlorométhane/éther diéthylique (90/10, v/v). Après agitation (15 min) et centrifugation (10000g pendant 15 min), la phase organique est recueillie et évaporée dans un SpeedVac®. Le résidu est reconstitué dans 60 µl de méthanol.

Analyse par LC-MS/MS

Une fraction de 10 µl de l'extrait a été injectée dans la colonne (XTerra MS C18 3,5 µm, 100 x 2,1 mm i.d.), protégée par un fritté de 1 mm C18. Le cycle d'analyse de 20 min fait appel à un gradient (5 % acétonitrile / 95 % tampon formiate 2 mM + acide formique 0,1 % jusqu'à un rapport 80 / 20 % à 10 min), avec un débit de 200 µl/min. Le système HPLC est un Waters Alliance 2695.

La détection est réalisée par un Micromass Quattro Micro, spectromètre de masse en tandem équipé d'une interface de type ionspray à pression atmosphérique, l'instrument étant en mode ionisation positive. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une tension de capillaire de 1 kV, une température de source à 120° C et de désolvatation de l'azote à 350° C à un débit de 550 L/h. La pression en argon dans la cellule de collision était de 4 mbar.

Les données ont été enregistrées selon le mode multiple

reaction monitoring (MRM). Les ions parents, ions fils, temps de rétention, tensions de cône et énergies de collision, optimisés pour l'ensemble des composés, sont présentés dans le Tableau 1.

Validation de la méthode

La linéarité de la méthode a été vérifiée en préparant des échantillons négatifs de cheveux (20 mg) surchargés par les 16 molécules, pour contenir au final les concentrations suivantes : 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 et 200 pg/mg. Les précisions intra-série et la justesse (n=6) ont été évalués en surchargeant des cheveux négatifs par les 16 molécules à 10 et 50 pg/mg. Le rendement d'extraction a été établi à 10 et 50 pg/mg, en comparant les aires des pics après extraction de cheveux surchargés (n=3) avec les aires des pics après extraction de cheveux négatifs auxquels les molécules ont été ajoutées au moment de l'évaporation de la phase organique.

La limite de quantification (LOQ) est la plus petite concentration qui satisfasse les critères d'identification (2 transitions et précision inférieure à 20 %) et correspond au premier point de la linéarité.

Résultats et discussion

Dans les conditions chromatographiques décrites, il n'a pas été observé d'interférence entre les benzodiazépines et hypnotiques et une quelconque substance endogène, présente dans la matrice capillaire.

La séparation chromatographique des 16 molécules est complète, comme en atteste la Figure 2 (A+B), représentant l'ensemble des molécules, surchargées et extraites d'une mèche de cheveux.

Les paramètres de validation sont donnés dans le Tableau 2. Ils apparaissent comme satisfaisant pour une procédure de criblage. Les limites de quantification pour tous les composés d'intérêt varient de 0.5 à 5 pg/mg en utilisant un échantillon de 20 mg de cheveux. Cela constitue à ce jour, la méthode la plus sensible décrite dans la littérature.

La méthode est linéaire pour chaque molécule entre sa limite de quantification et 200 pg/mg ($r^2 > 0.99$). Les précisions et justesses, à 10 et 50 pg/mg, sont inférieures à 20 % dans tous les cas, sauf pour le 7-amino-clonazépam. Les rendements d'extraction (à 10 et 50 pg/mg) sont compris entre 32 to 76 %, ce qui est très acceptable pour une méthode de criblage.

Applications

Il est connu depuis longtemps que les traitements cos-

Tableau I : Temps de rétention et transitions MRM pour les 16 molécules. La transition de quantification est soulignée.

Molécule	Temps de rétention (min)	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Cône (Volts)	Energie de collision (eV)
Alprazolam	10,9	309,1	205,2	45	40
			<u>274,2</u>	45	26
7-aminoclonazépam	7,5	286,1	222,2	40	25
			<u>250,2</u>	40	20
7-aminoflunitrazépam	8,2	284,2	<u>135,1</u>	40	28
			227,2	40	25
Bromazépam	9,6	316,0	<u>182,3</u>	35	30
			209,3	35	25
Clobazam	11,7	301,1	224,2	30	33
			<u>259,1</u>	30	20
Diazépam	12,0	285,2	<u>154,2</u>	40	25
			193,3	40	30
Lorazépam	11,0	321,1	229,1	30	27
			<u>275,1</u>	30	22
Lormetazépam	11,7	335,1	177,1	28	40
			<u>289,1</u>	28	20
Midazolam	9,3	326,1	244,1	44	25
			<u>291,2</u>	44	28
Nordiazépam	11,1	271,2	<u>140,1</u>	40	25
			165,1	40	28
Oxazépam	10,8	269,1	163,1	45	32
			<u>241,2</u>	45	20
Temazépam	11,5	301,1	283,1	30	40
			<u>255,2</u>	30	20
Tetrazépam	11,1	289,2	225,2	40	26
			<u>253,2</u>	40	22
Triazolam	11,0	343,1	<u>308,1</u>	45	26
			315,1	45	27
Zaleplon	10,4	306,2	<u>236,2</u>	40	28
			264,2	40	20
Zolpidem	8,4	308,2	<u>235,3</u>	40	35
			263,2	40	26
Diazepam-d ₅	12,0	290,2	<u>154,1</u>	40	30
			198,3	40	30

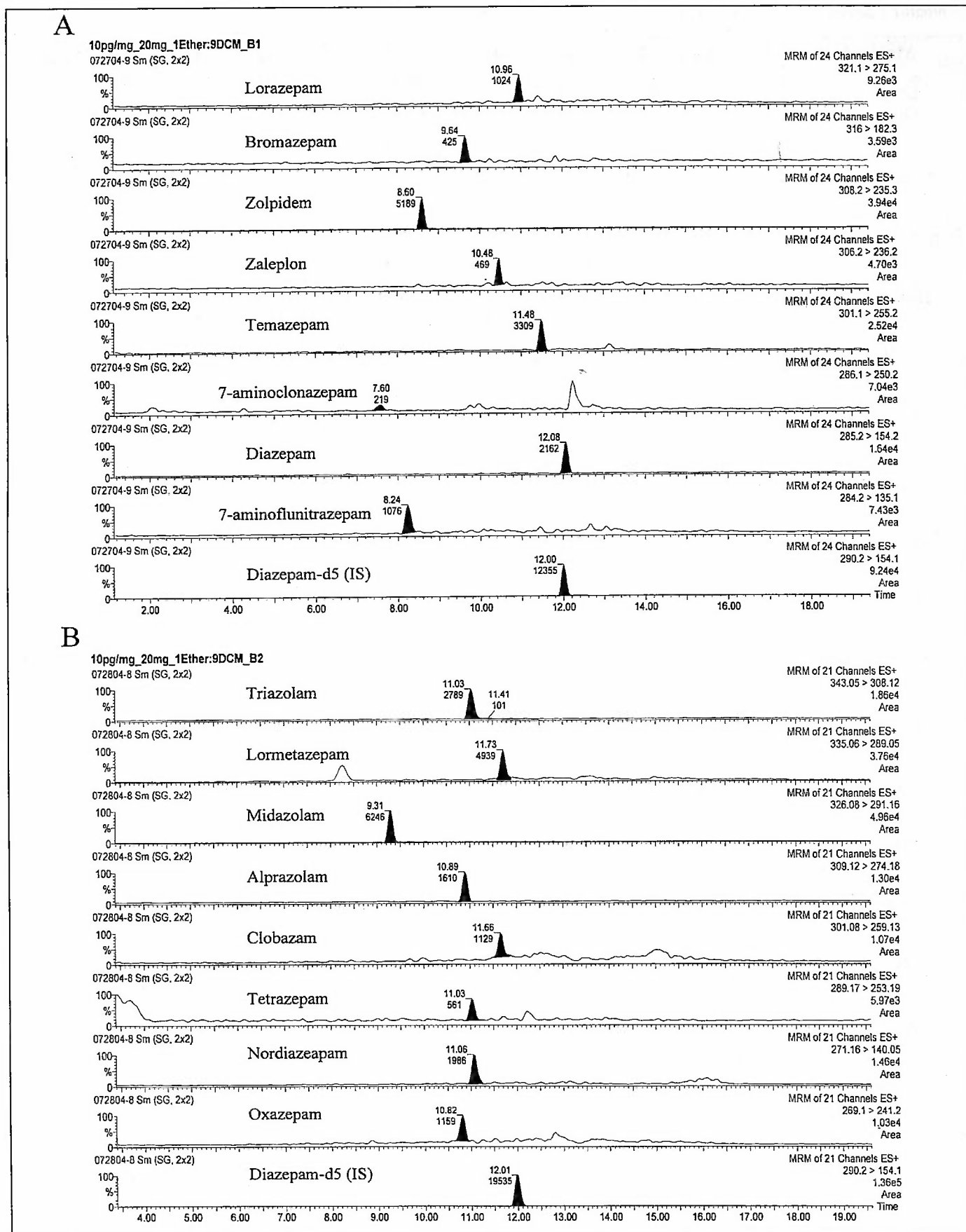


Figure 2 : Chromatogramme d'un extrait de cheveux d'un témoin (20 mg) surchargé à 10 pg/mg avec, du haut vers le bas, les ions de quantification de A : lorazépam, bromazépam, zolpidem, zaleplon, temazépam, 7-amino-clonazépam, diazépam, 7-amino-flunitrazépam et l'étalon interne (50 pg/mg) et B : triazolam, lormetazépam, midazolam, alprazolam, clobazam, tetrazépam, nordiazépam, oxazepam et l'étalon interne (50 pg/mg).

Tableau II : Paramètres de validation.

Molécule	Linéarité	Rendement d'extraction (%)	Précision inter-série (C.V., n=6)	Justesse inter-série (%Bias, n=6)	LOQ (pg/mg)
Alprazolam	1-200 pg/mg $r^2=0,9999$	59,2 (10 pg/mg)	12,9 (10 pg/mg)	10,5 (10 pg/mg)	1
		69,5 (50 pg/mg)	9,9 (50 pg/mg)	3,9 (50 pg/mg)	
7-aminoclonazépam	5-200 pg/mg $r^2=0,9976$	38,5 (10 pg/mg)	28,6 (10 pg/mg)	0,8 (10 pg/mg)	5
		46,1 (50 pg/mg)	14,9 (50 pg/mg)	12,8 (50 pg/mg)	
7-aminoflunitrazépam	2-200 pg/mg $r^2=0,9972$	56,7 (10 pg/mg)	12,1 (10 pg/mg)	3,0 (10 pg/mg)	2
		48,4 (50 pg/mg)	19,7 (50 pg/mg)	0,9 (50 pg/mg)	
Bromazépam	2-200 pg/mg $r^2=0,9977$	51,7 (10 pg/mg)	9,9 (10 pg/mg)	1,3 (10 pg/mg)	2
		45,3 (50 pg/mg)	11,6 (50 pg/mg)	2,4 (50 pg/mg)	
Clobazam	2-200 pg/mg $r^2=0,9985$	56,5 (10 pg/mg)	11,4 (10 pg/mg)	10,7 (10 pg/mg)	2
		75,8 (50 pg/mg)	10,1 (50 pg/mg)	6,2 (50 pg/mg)	
Diazépam	1-200 pg/mg $r^2=0,9994$	54,5 (10 pg/mg)	5,3 (10 pg/mg)	0,8 (10 pg/mg)	1
		59,9 (50 pg/mg)	8,5 (50 pg/mg)	11,2 (50 pg/mg)	
Lorazépam	5-200 pg/mg $r^2=0,9996$	32,2 (10 pg/mg)	6,1 (10 pg/mg)	17,7 (10 pg/mg)	5
		38,0 (50 pg/mg)	9,1 (50 pg/mg)	12,2 (50 pg/mg)	
Lormetazépam	2-200 pg/mg $r^2=0,9978$	59,3 (10 pg/mg)	6,6 (10 pg/mg)	7,9 (10 pg/mg)	1
		63,5 (50 pg/mg)	9,7 (50 pg/mg)	3,3 (50 pg/mg)	
Midazolam	0,5-200 pg/mg $r^2=0,9989$	54,5 (10 pg/mg)	17,9 (10 pg/mg)	4,7 (10 pg/mg)	0,5
		63,8 (50 pg/mg)	7,2 (50 pg/mg)	1,8 (50 pg/mg)	
Nordiazépam	2-200 pg/mg $r^2=0,9999$	49,2 (10 pg/mg)	9,9 (10 pg/mg)	1,1 (10 pg/mg)	2
		60,1 (50 pg/mg)	8,1 (50 pg/mg)	1,7 (50 pg/mg)	
Oxazépam	1-200 pg/mg $r^2=0,9996$	38,6 (10 pg/mg)	13,0 (10 pg/mg)	8,6 (10 pg/mg)	1
		50,3 (50 pg/mg)	7,5 (50 pg/mg)	1,1 (50 pg/mg)	
Temazépam	1-200 pg/mg $r^2=0,9997$	52,5 (10 pg/mg)	5,8 (10 pg/mg)	5,8 (10 pg/mg)	1
		54,4 (50 pg/mg)	8,3 (50 pg/mg)	3,8 (50 pg/mg)	
Tetrazépam	5-200 pg/mg $r^2=0,9999$	35,9 (10 pg/mg)	13,1 (10 pg/mg)	20,2 (10 pg/mg)	5
		41,7 (50 pg/mg)	7,3 (50 pg/mg)	3,0 (50 pg/mg)	
Triazolam	0,5-200 pg/mg $r^2=0,9991$	55,0 (10 pg/mg)	9,2 (10 pg/mg)	11,0 (10 pg/mg)	0,5
		63,0 (50 pg/mg)	6,4 (50 pg/mg)	4,6 (50 pg/mg)	
Zaleplon	1-200 pg/mg $r^2=0,9970$	58,7 (10 pg/mg)	9,3 (10 pg/mg)	3,9 (10 pg/mg)	1
		52,7 (50 pg/mg)	9,4 (50 pg/mg)	4,5 (50 pg/mg)	
Zolpidem	0,5-200 pg/mg $r^2=0,9993$	45,7 (10 pg/mg)	4,6 (10 pg/mg)	4,3 (10 pg/mg)	0,5
		40,9 (50 pg/mg)	19,6 (50 pg/mg)	20,4 (50 pg/mg)	

métiques altèrent la cuticule des cheveux et favorisent ainsi une libération anarchique des xénobiotiques ainsi une libération anarchiques des xénobiotiques incorporés vers le milieu extérieur, conduisant à une diminution de l'ordre de 40 à 80 % des concentrations. Nous présentons ici le cas d'une jeune fille de 27 ans, divorcée, présentant des signes de fatigue importante, sans raison apparente. Elle soupçonne son ex-mari de lui administrer un psychotrope pendant ses jours de congé.

La chronologie des événements est la suivante :

- période des faits : juin 2004
- décoloration / coloration : août 2004
- prélèvement des cheveux : 14 octobre 2004

La mise en œuvre de la méthode de criblage a permis d'identifier dans le segment 4 à 6 cm (à partir de la racine), du lormetazépam à la concentration de 1,2 pg/mg (Figure 3). Le lormetazépam est un hypnotique

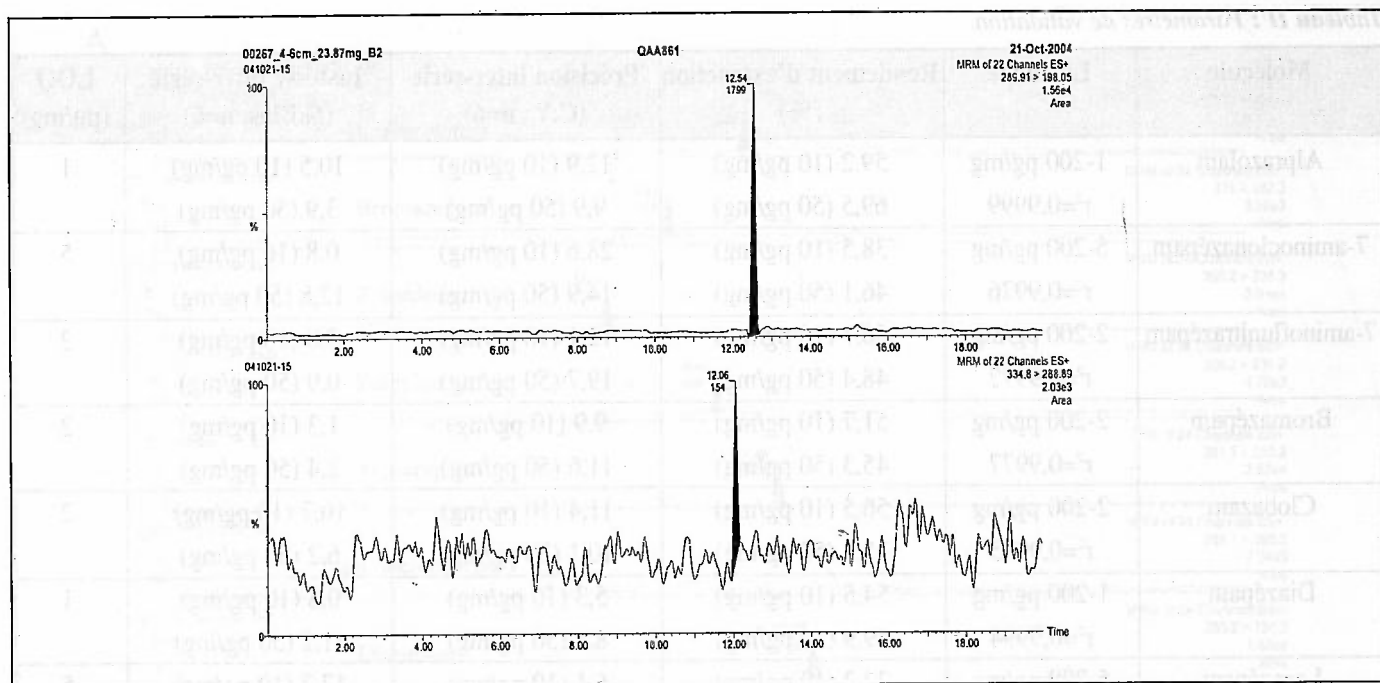


Figure 3 : Chromatogramme obtenu après analyse d'un segment de cheveux. Il a été retrouvé du lormetazéпам à la concentration de 1,2 pg/mg (transition du bas). Le diazépam-d₅ est utilisé comme étalon interne (transition du haut en utilisant l'ion de qualification).

mercialisé sous la dénomination Noctamide. Il n'existe pas à ce jour de référentiel permettant d'interpréter cette concentration. Aucune étude contrôlée n'a été publiée dans la littérature. Ce résultat, confirmé par un 2^{ème} laboratoire indépendant, démontre que la LC-MS/MS apporte une réponse satisfaisante, même dans les conditions les plus difficiles, comme l'application d'un traitement cosmétique.

Ainsi que l'ont proposé d'autres auteurs (5,7), dans le cas des nitro-benzodiazépines, l'analyte cible est le métabolite 7-amino. Il est plus stable que le composé parent et certainement mieux incorporé dans les cheveux du fait de la présence d'une amine, permettant une liaison d'énergie plus forte sur la mélanine chargée négativement. Grâce à leur stabilité en milieu très alcalin, à la différence des autres benzodiazépines, ces molécules peuvent être extraites après désintégration dans la soude, ce qui permet d'obtenir une limite de quantification abaissée d'environ 5 fois (11). A titre d'exemple, nous présentons ici, Figure 4 le cas d'une jeune fille, séquestrée et violée plusieurs fois sous l'influence d'une substance sur une période d'une semaine. Le prélèvement a été réalisé mi-décembre, alors que les faits se seraient produits fin septembre. Le segment correspondant à la période des faits (Fig 4A), soit de la racine à 3 cm, est positif pour le 7-aminoflunitrazéпам à la concentration de 31,7 pg/mg, le suivant (3 à 6 cm, Fig 4B) également, à la concentration de 2,0 pg/mg (probablement due aux cheveux mal alignés lors de la coupe) et négatif pour le segment distal (6 à 9 cm, Fig 4C). Ces analyses démontrent une exposition au

Rohypnol, compatible avec la période des faits.

La procédure décrite est appliquée en routine depuis l'été 2003 dans le cadre des expertises judiciaires. Elle a permis de mettre en évidence la forte prévalence du zolpidem (12) et du bromazéпам (13) dans les affaires qui nous ont été confiées.

Au total, cette méthode apparaît comme rapide et simple, permettant la recherche simultanée de 16 benzodiazépines et hypnotiques à partir d'un seul extrait et pouvant ainsi être utilisée pour un grand nombre d'échantillons. Sur le plan judiciaire, la spécificité des investigations est assurée par l'identification simultanée de 2 transitions par molécule. Enfin, du fait de sa flexibilité, il est toujours possible d'inclure de nouveaux composés, comme par exemple le phénazéпам, anxiolytique non commercialisé en France mais dans les pays de l'Est et qui peut se retrouver dans les échantillons du fait de l'ouverture des frontières et des voyages.

Conclusion

Face à la demande de techniques de plus en plus performantes, tant sur le plan de la sensibilité que celui de la spécificité, la LC-MS/MS constitue à ce jour la meilleure des réponses. La préparation de l'échantillon apparaît comme réduite et permet d'effectuer des analyses à grande cadence. Cette technologie représente donc la référence absolue en matière d'investigations toxicologiques, en particulier dans les affaires de soumission chimique.

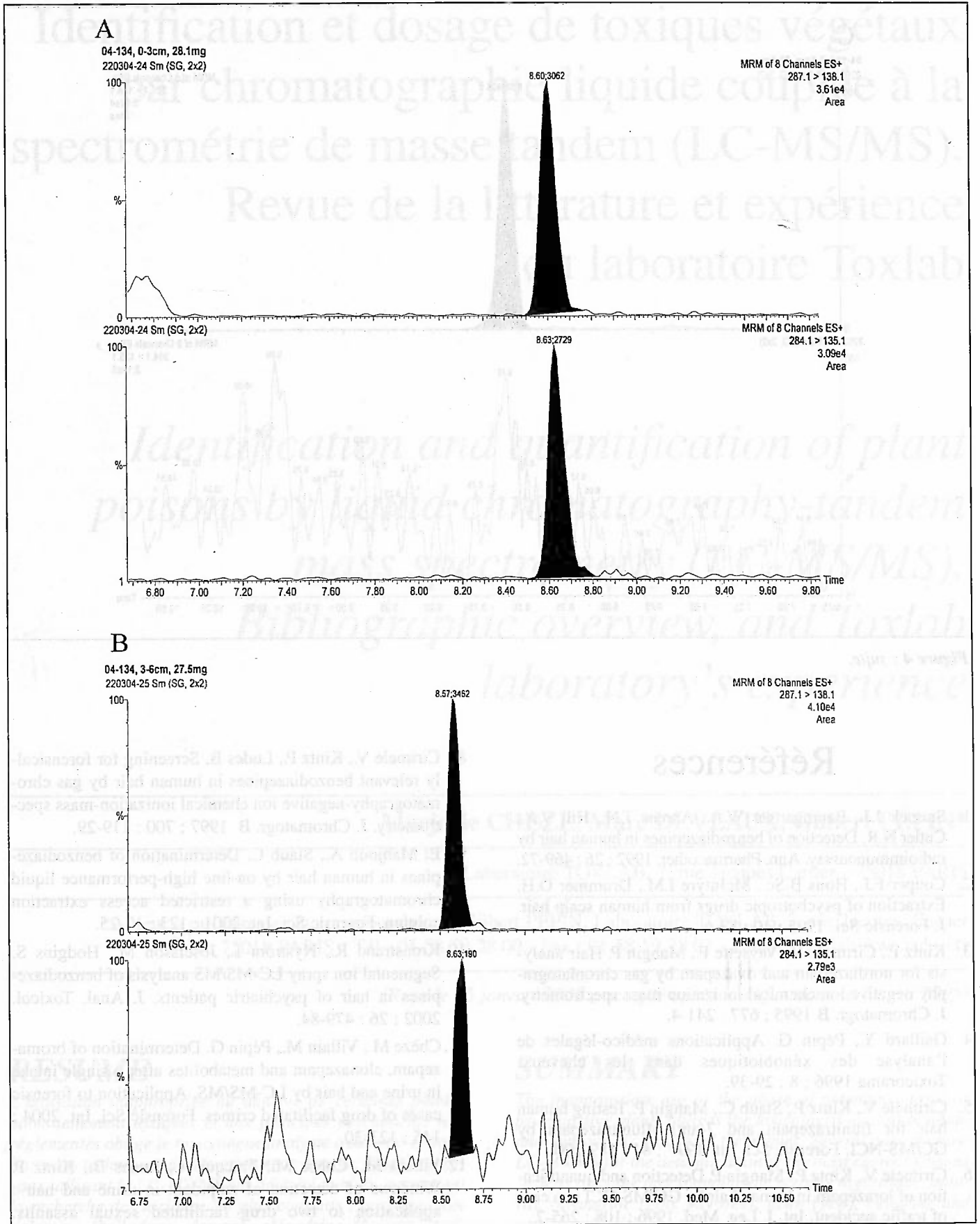


Figure 4 : Chromatogrammes d'extraits de cheveux d'une victime d'agression sexuelle. A-segment proximal, racine à 3 cm et identification de 7-aminoflunitrazéпам à 31,7 pg/mg ; B-segment 3 à 6 cm et identification de 7-aminoflunitrazéпам à 2,0 pg/mg ; C-segment 6 à 9 cm, absence de 7-aminoflunitrazéпам. Les extraits ont été préparés dans de la soude IN, en présence de 7-aminoflunitrazéпам-d₃, représenté à chaque fois sur la transition du haut.

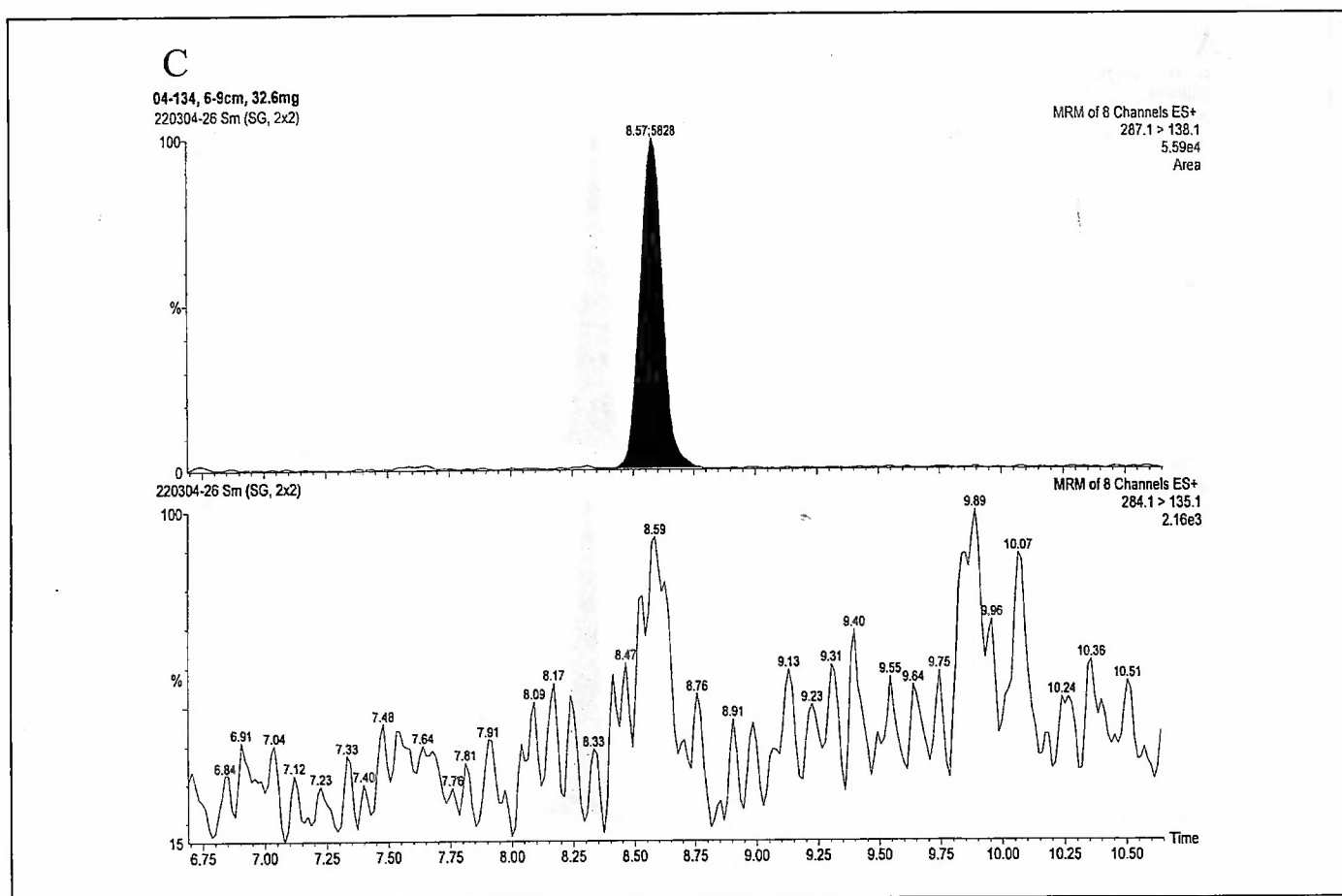


Figure 4 : suite.

Références

1. Sramek J.J., Baumgartner W.A., Ahrens T.N., Hill V.A., Cutler N.R. Detection of benzodiazepines in human hair by radioimmunoassay. *Ann. Pharmacother.* 1992 ; 26 : 469-72.
2. Couper F.J., Hons B.Sc., McIntyre I.M., Drummer O.H. Extraction of psychotropic drugs from human scalp hair. *J. Forensic Sci.* 1995 ; 40 : 83-6.
3. Kintz P., Cirimele V., Vaysette F., Mangin P. Hair analysis for nordiazepam and oxazepam by gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1995 ; 677 : 241-4.
4. Gaillard Y., Pépin G. Applications médico-légales de l'analyse des xénobiotiques dans les cheveux. *Toxicorama* 1996 ; 8 : 29-39.
5. Cirimele V., Kintz P., Staub C., Mangin P. Testing human hair for flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam by GC/MS-NCI. *Forensic Sci. Int.* 1997 ; 84 : 189-200.
6. Cirimele V., Kintz P., Mangin P. Detection and quantification of lorazepam in human hair by GC/MS-NCI in a case of traffic accident. *Int. J. Leg. Med.* 1996 ; 108 : 265-7.
7. Negrusz A., Moore C., Kern J.L., Janicak P.G., Strong M.J., Levy N.A. Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair. *J. Anal. Toxicol.* 2000 ; 24 : 614-20.
8. Cirimele V., Kintz P., Ludes B. Screening for forensically relevant benzodiazepines in human hair by gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1997 ; 700 : 119-29.
9. El Mahjoub A., Staub C. Determination of benzodiazepines in human hair by on-line high-performance liquid chromatography using a restricted access extraction column. *Forensic Sci. Int.* 2001 ; 123 : 17-25.
10. Kronstrand R., Nyström I., Josefsson M., Hodgins S. Segmental ion spray LC-MS/MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *J. Anal. Toxicol.* 2002 ; 26 : 479-84.
11. Chèze M., Villain M., Pépin G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 145 : 123-30.
12. Villain M., Chèze M., Tracqui A., Ludes B., Kintz P. Windows of detection of zolpidem in urine and hair : application to two drug facilitated sexual assaults. *Forensic Sci. Int.* 2004 ; 143 : 157-61.
13. Villain M., Chèze M., Dumestre V., Ludes B., Kintz P. Hair to document drug-facilitated crimes : four cases involving bromazepam. *J. Anal. Toxicol.* 2004 ; 28 : 516-9.