

## Article original

# Quantification des opiacés, cocaïniques et amphétaminiques par chromatographie liquide haute performance / spectrométrie de masse en tandem après préparation en ligne de l'échantillon

Christian Lacroix\*, Elodie Saussereau, Gérard Bodin, Jean-Pierre Goullé

Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Cliniques, Groupe Hospitalier du Havre, BP 24, 76083 Le Havre, France

**Résumé – Objectif :** Une méthode de dosage de substances stupéfiantes et de médicaments morphiniques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM), après déprotéinisation acide et extraction-purification en ligne, a été développée au sein de notre laboratoire. **Méthodes :** Le système utilise deux pompes (Alliance 2795 et 1525 Micro, Waters), une vanne 6 voies de commutation, une colonne de concentration-purification Oasis HLB (Waters) et une colonne analytique en phase inverse (C18 Atlantis, Waters). Les différents composés retenus sur l'Oasis HLB, sont élués à contre courant sur la colonne analytique puis séparés par chromatographie. L'acquisition des données en spectrométrie de masse s'effectue en mode MRM (*multiple reaction monitoring*). La durée totale d'un cycle analytique est de 16 minutes. **Résultats :** La méthode développée est sensible, spécifique et linéaire de 2,5 à 200 ng/mL pour les molécules non conjuguées, et de 5 à 200 ng/mL pour les métabolites glucuroconjugués. Les limites de détection s'échelonnent de 0,2 à 1,3 ng/mL pour les molécules non conjuguées, et de 1,5 à 2,5 ng/mL pour les glucuroconjugués. **Conclusion :** Cette méthode, simple et rapide, de préparation en ligne des échantillons couplée à la CL-SM/SM permet de quantifier simultanément, dans le plasma, sérum, sang total, ou les urines, des molécules de différentes familles : opiacés et glucuroconjugués, amphétaminiques, cocaïniques, buprénorphine et norbuprénorphine.

**Mots clés :** CL-SM/SM, préparation en ligne, opiacés, amphétaminiques, cocaïniques

**Abstract – Simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines by on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography / tandem mass spectrometry. Objectives:** A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method (LC-MS/MS) for determination of opiates, cocaine and amphetamines, without time-consuming sample pre-treatment was developed. The method used acid deproteinization and on-line solid phase extraction followed by LC-MS/MS. **Methods:** The system consisted of two pumps for mobile phase delivery (Alliance 2795 and 1525 Micro, Waters), a six-port switching valve, a pre-column (Oasis HLB, Waters) and a reversed phase column (C18 Atlantis, Waters). The analytes were trapped on the pre-column, and after the valve was switched, the retained analytes were flushed on the analytical column for chromatographic separation. The total analysis time for a single analysis run was 16 minutes. The mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results:** The method was accurate and precise across a linear dynamic range of 2,5 to 200 ng/mL, and of 5 to 200 ng/mL for glucuronides. The detection limits ranged from 0,2 to 1,3 ng/mL depending on the analyte, and from 1,5 to 2,5 ng/mL for glucuronide metabolites. **Conclusion:** The present method allowed on-line clean-up and enrichment, leading to improved sensitivity. This LC-MS/MS method proved to be suitable for the quantification of opiates and glucuronide metabolites, amphetamines, cocaine, buprenorphine and norbuprenorphine, in plasma, serum, whole blood or urine

**Key words:** LC-MS/MS, on-line extraction, opiates, amphetamines, cocaine

Reçu le 15 décembre 2007, accepté après modifications le 25 février 2008

Publication en ligne le 6 juin 2008

\* Correspondance : Christian Lacroix, Tél. 02 32 73 32 18, Fax 02 32 73 32 38, [clacroix@ch-havre.fr](mailto:clacroix@ch-havre.fr)

## 1 Introduction

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) est devenue un outil analytique offrant, par sa spécificité et sa sensibilité, une alternative à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) pour l'identification et la quantification des molécules stupéfiantes dans les échantillons biologiques. Le dosage des molécules stupéfiantes par CL-SM/SM peut être effectué dans le plasma, sérum ou sang total, ainsi que dans les urines dans lesquelles les métabolites sont détectables plusieurs jours après la consommation du ou des produit(s) stupéfiant(s) [1–8]. Ces analyses sont généralement précédées d'une phase d'extraction en phase solide (SPE) [3, 5–8] ou liquide/liquide [1]. Pour l'urine, des techniques de CL-SM/SM avec injection directe de l'échantillon ont été développées [2, 4]. La préparation en ligne des échantillons (PLE) est un rêve depuis longtemps caressé par les analystes mais longtemps décevant surtout face à la complexité des matrices biologiques. Le couplage chromatographie liquide haute performance-spectrophotomètre UV constituait déjà un premier écueil car la longueur d'onde unique abolissait tout contrôle de la pureté du pic chromatographique et la difficulté de purification de l'échantillon était inversement proportionnelle au maximum d'absorption UV du soluté. Cette situation a évolué grâce à deux progrès sensibles :

- la détection en barrette de diodes qui a permis de vérifier la pureté du pic élué ;
- la diversité des phases stationnaires et notamment les premières colonnes polymériques. En effet, le succès d'une PLE passe par la possibilité de purifier et concentrer l'échantillon sur un type de colonne et de chromatographier l'éluat sur une colonne analytique de nature différente. Il était, par exemple, assez peu concluant de purifier l'échantillon sur une courte colonne C18 puis d'élué et de chromatographier sur une autre C18 d'une longueur supérieure : les substances parasites retenues sur la colonne préparative se retrouvant sur la seconde. Il était donc nécessaire de jouer sur les différents types de greffon entre la colonne d'extraction-purification et la colonne analytique [9, 10]. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, ou mieux, couplée à la spectrométrie de masse en tandem, a radicalement modifié l'approche de cette préparation. Ces dernières années, de nombreux travaux ont conjugué l'utilisation de grands débits sur des colonnes préparatives de grosse granulométrie (25-50  $\mu\text{m}$ ) et de « colonnes à accès restreints » [11, 12]. Ces grosses particules autorisent de hauts débits de 2 à 4 mL/min (vitesse linéaire 8-10 cm/seconde) qui transforment le flux laminaire en flux turbulent (d'où la notion de *turbulent flow chromatography*, TFC) sans générer de pressions trop élevées : ce courant tourbillonnant facilite les transferts de masses entre les phases [13, 14]. Les techniques par TFC sont généralement conduites sur des phases polymériques mélangées hydrophile-hydrophobe qui supportent l'injection de gros volumes de plasma. Les protéines ne pénètrent pas dans les pores et sont éluées pendant que les petites molécules y sont retenues. L'élué se fait généralement à contre-courant (*back flush*) vers la source du détecteur de

masse ou vers une colonne analytique si une chromatographie préalable est nécessaire [11–15].

La méthode proposée et appliquée au dosage de multiples molécules stupéfiantes et de médicaments morphiniques, conjugue une préparation en ligne des échantillons biologiques après déprotéinisation acide du sérum, du plasma, ou du sang total, une étape d'extraction-purification sur une colonne de copolymère suivie d'une chromatographie sur une colonne à polarité de phases inversées.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Réactifs et solutions standards

Les solvants, méthanol et acétonitrile, de qualité chromatographie liquide haute performance, proviennent respectivement de Prolabo (Fontenay sous Bois, France) et de Panreac Química (Barcelone, Espagne). L'acide formique est obtenu chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Le formate d'ammonium et l'acide 5-sulfosalicylique sont fournis respectivement par Fluka (Buchs, Suisse) et Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le sérum Technicon est obtenu chez Bayer HealthCare (Tarrytown, EU). Les opiacés et analogues deutérés : morphine et  $\beta$ 3- et  $\beta$ 6-glucuroconjugués (M3G et M6G), codéine et  $\beta$ 6-glucuroconjuguée (C6G), 6-acétyl-morphine (6-MAM), 6-acétylcodéine, dihydrocodéine, oxycodone, noroxycodone, oxymorphone, hydromorphone, sont des produits Promochem (Molsheim, France). La pholcodine, 6-acétylcodéine-D3 et codéine- $\beta$ 6-glucuroconjuguée-D3 sont des produits Lipomed (Mundolsheim, France). Les cocaïniques (cocaïne, méthylecgonine (ME), benzoylecgonine (BE), cocaéthylène), les amphétaminiques (amphétamine, méthamphétamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB), la buprénorphine, la norbuprénorphine et leurs métabolites glucuroconjugués (BUPG et NBUPG), ainsi que les analogues deutérés sont des produits Promochem. Pour chaque famille de molécules analysées (opiacés, cocaïniques, amphétaminiques, buprénorphine), une solution mère est préparée à une concentration de 10  $\mu\text{g/mL}$  dans du méthanol. Les solutions étalons sont obtenues par dilution dans du sérum Technicon. La solution d'étalons internes deutérés est préparée dans un mélange eau-méthanol (V/V) à une concentration finale de 100 ng/mL. Un blanc sérum est obtenu par dilution au 1/10<sup>e</sup> du sérum Technicon dans l'eau pure.

### 2.2 Préparation de l'échantillon

100  $\mu\text{L}$  d'échantillon (sérum, plasma ou sang total) sont dilués au 1/10<sup>e</sup> avec 850  $\mu\text{L}$  du blanc sérum et 50  $\mu\text{L}$  de la solution d'étalons internes deutérés. La déprotéinisation du mélange s'effectue, après homogénéisation, avec 50  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse d'acide sulfosalicylique à 0,5 g/mL pendant 15 minutes. Après centrifugation à 10900 g pendant 5 minutes, 50  $\mu\text{L}$  du surnageant sont injectés. Les urines sont diluées au 1/10<sup>e</sup> voire au 1/100<sup>e</sup> dans l'eau et le volume d'injection est réduit à 5 ou 10  $\mu\text{L}$ .

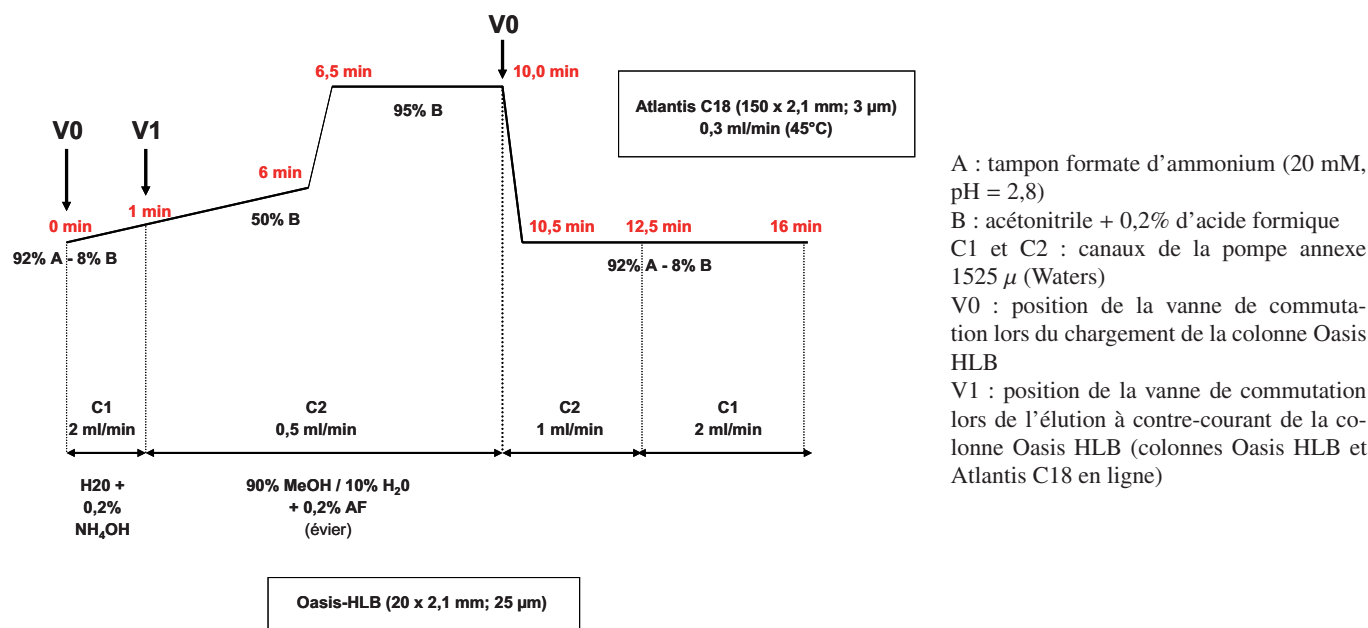


Fig. 1. Partie supérieure : gradient analytique (colonne C18 Atlantis). Partie inférieure : enchaînement des étapes d'extraction-purification de l'échantillon et de son élution de la colonne Oasis.

### 2.3 Analyse par CL-SM/SM

Le dosage s'effectue après une phase d'extraction-purification en ligne sur une colonne Oasis HLB (20 × 2,1 mm ; 25 µm, Waters) reliée à une vanne de commutation. Le couplage d'une pompe annexe à deux canaux (1525 Micro Binary Pump System, Waters) au système chromatographique Alliance 2795 (Waters), permet le chargement de la colonne Oasis HLB, le lavage avec une solution aqueuse ammoniacuée (0,2% d'ammoniac) à un débit de 2 mL/min pendant une minute, puis l'élution à contre-courant (*back flush*) sur la colonne analytique. Le cycle de rinçage de la colonne Oasis HLB s'effectue avec une solution méthanol - eau - acide formique (90 - 10 - 0,2; V / V / V), à 1 mL/min pendant 2 min (figure 1). Le système Alliance 2795 (Waters) utilisé, comporte 4 canaux. La colonne analytique est une C18 Atlantis (150 × 2,1 mm ; 3 µm), thermostatée à 45 °C. La phase mobile est composée d'une solution de formate d'ammonium à 20 mM (pH = 2,8) (solution A) et d'acétonitrile avec 0,2 % d'acide formique (solution B). Le cycle analytique de 16 minutes, utilise un gradient de 8 % à 95 % de la solution B en 6,5 min, avec un débit de 0,3 ml/min (figure 1). La détection s'effectue sur un spectromètre de masse en tandem de type Quattro Micro<sup>TM</sup> API (Waters), équipé d'une interface de type ionspray à pression atmosphérique. L'instrument est utilisé en mode electrospray positif (ESI +). L'enregistrement des données s'effectue avec 3 fenêtres d'acquisition, en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Les transitions MRM, temps de rétention, tensions de cône et énergies de collision optimisées pour l'ensemble des molécules étudiées, sont présentés dans les tableaux I et II.

### 2.4 Préparation en ligne simplifiée

Il est également possible de réaliser la phase d'extraction-purification en ligne sans pompe annexe et sans vanne de com-

mutation supplémentaire. Seules sont utilisées la pompe analytique Alliance 2795 (Waters) et la vanne 6 voies pré-installée sur le spectromètre de masse Quattro Micro<sup>TM</sup> API (Waters). Pour cette préparation en ligne simplifiée, le traitement des échantillons sérique, plasmatique ou de sang total, le volume injecté, les colonnes Oasis HLB et Atlantis C18, la phase mobile et les solutions de rinçage sont identiques à la préparation en ligne précédemment décrite. Pour la phase d'extraction-purification de l'échantillon et du rinçage de la colonne Oasis HLB, ce sont deux canaux (A et B) de la pompe Alliance 2795 qui sont utilisés. Après un lavage d'une minute avec la solution aqueuse ammoniacuée à 0,2 %, l'élution de la colonne Oasis HLB s'effectue dans le sens normal et non à contre-courant. Le gradient analytique, identique à celui décrit précédemment, utilise les deux autres canaux (C et D) du système Alliance 2795. En fin de cycle, les deux colonnes restant en ligne, la colonne analytique est équilibrée sur le tampon formate pendant 2,5 minutes. Après bascule de la vanne pré-installée, la colonne Oasis HLB est rincée avec la solution méthanol - eau - acide formique (90 - 10 - 0,2; V / V / V) pendant une minute, puis ré-équilibrée sur l'eau ammoniacuée à 0,2 %, à un débit de 2 mL/min (figure 2).

### 2.5 Validation analytique

La linéarité a été évaluée à 6 niveaux de concentrations pour l'ensemble des molécules (2,5 - 5 - 10 - 50 - 100 - 200 ng/mL), exception faite des molécules glucuroconjuguées dont la linéarité a été étudiée de 5 à 200 ng/mL. Les précisions intra- et inter-série (n = 5), ainsi que la justesse (biais) de la méthode ont été évaluées en surchargeant du sérum Technicon à 2 niveaux de concentrations (10 et 50 ng/mL). La limite de quantification (LOQ) est la plus petite concentration pour laquelle les critères d'acceptabilité de fidélité (CV < 20 %) et de justesse (biais < 20 %) sont respectés ; elle correspond au

**Tableau I.** Temps de rétention et transitions MRM pour les opiacés.

Molécules	Temps de rétention	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de cône (V)	Énergie de collision (eV)
<b>Morphine</b>	3,85	286,4	289,4	35	10
			201,1	45	24
D3		289,4	289,3	35	10
			201,1	45	26
<b>M3G, M6G</b>	<b>M3G</b>	462,2	462,1	40	20
			3,37	286,3	50
D3	<b>M6G</b>	465,2	465,1	40	20
			3,55	289,3	50
<b>6-MAM</b>	5,38	328,3	211,2	45	24
			D3	331,3	211,2
<b>Codéine</b>	5,02	300,1	215,1	45	22
			D3	303,1	215,1
<b>C6G</b>	5,91	476,3	476,2	30	10
			D3	479,1	479,0
<b>6-acétyl-codéine</b>	6,66	342,3	225,3	30	30
			D3	345,2	225,2
<b>Dihydrocodéine</b>	4,93	302,3	199,3	40	35
			D6	308,3	202,2
<b>Oxycodone</b>	5,34	316,2	298,2	35	25
			D3	319,2	301,1
<b>Noroxycodone</b>	5,24	302,1	284,1	30	20
			D3	305,1	287,1
<b>Oxymorphone</b>	4,14	302,2	284,2	35	20
			D3	305,1	287,1
<b>Hydromorphone</b>	4,39	286,3	185,3	32	35
			D3	289,3	185,3
<b>Pholcodine*</b>	3,41	399,3	114,1	35	35

\*La codéine-D3 est utilisée comme étalon interne pour le dosage de la pholcodine.

premier point de la gamme d'étalonnage. La limite de détection (LOD) est calculée à partir de la mesure du bruit de fond sur 30 blancs (moyenne + 3 écart-types). Afin d'évaluer une éventuelle perte d'analytes au cours de la préparation en ligne des échantillons, ainsi que de possibles effets de matrices, des étalons plasmatiques (ou sanguins) et aqueux ont été préparés et analysés comme précédemment décrit. La détermination des ratios « surface du pic plasmatique/surface du pic aqueux » permet d'évaluer le recouvrement de la méthode.

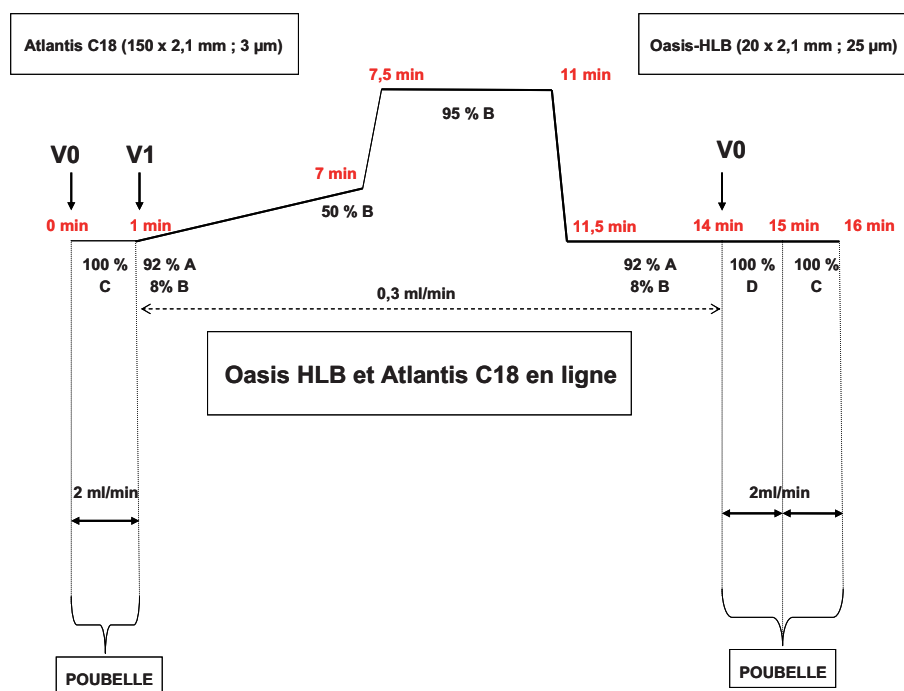
### 3 Résultats

Le gradient chromatographique permet une séparation complète des molécules, dont les substances de même masse molaire et se fragmentant à l'identique. Cette séparation chromatographique de l'ensemble des molécules permet, en pratique, de répartir les transitions MRM sélectionnées dans trois fenêtres d'acquisition. Chacune de ces fenêtres d'acquisition ne contient pas plus de 19 transitions MRM. Les figures 3 à 7 présentent les chromatogrammes de l'ensemble des molécules dosées en routine dans notre laboratoire : opiacés, cocaïniques,

amphétaminiques, buprénorphine et ses métabolites, après déprotéinisation acide et préparation en ligne d'échantillons sanguins médico-légaux. Les limites de quantification, correspondant au premier point de gamme, sont respectivement de 2,5 ng/mL pour les molécules non conjuguées et de 5 ng/mL pour les molécules glucuroconjuguées. Les paramètres de validation de la méthode sont présentés dans les tableaux III à V. La méthode est linéaire pour chaque molécule de sa limite de quantification à 200 ng/mL ( $r^2 > 0,99$ ). Pour les molécules non glucuroconjuguées, la limite de détection est inférieure ou égale à 1,3 ng/mL (noroxycodone). Pour les molécules les plus sensibles, 6-MAM, amphétamine, méthamphétamine, MDEA et MBDB, cette limite de détection est de 0,2 ng/mL. Pour les métabolites glucuroconjugués, la limite de détection est plus élevée, jusqu'à 2,5 ng/mL. En ce qui concerne la précision et la justesse de la méthode, les coefficients de variation (%) et les biais (%), à 10 et 50 ng/mL, sont inférieurs à 20 % dans tous les cas. Le recouvrement de la méthode varie en fonction des molécules analysées; pour les opiacés et les amphétaminiques, il est de l'ordre de 80 %. Pour les cocaïniques, le recouvrement est d'environ 90 %; il est supérieur à 90 % pour la buprénorphine et la norbuprénorphine. La préparation en ligne

**Tableau II.** Temps de rétention et transitions MRM pour les cocaïniques et les amphétaminiques, la buprénorphine et norbuprénorphine.

Molécules	Temps de rétention	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de cône (V)	Énergie de collision (eV)
<b>Cocaïne</b>	6,85	304,3	182,2	30	20
D3		307,4	185,3	35	20
<b>Cocaéthylène</b>	7,41	318,1	196,2	30	20
D3		321,3	199,3	30	20
<b>Méthylecgonine</b>	3,37	200,3	182,3	30	16
D3		203,3	185,3	30	16
<b>Benzoylcgonine</b>	5,80	290,3	168,2	40	30
D3		293,3	171,2	40	30
<b>Amphétamine</b>	5,09	136,2	119,1	20	10
D5		141,4	124,1	18	10
<b>Méthamphétamine</b>	5,35	150,1	119,0	20	14
D5		155,1	121,2	20	14
<b>MDA</b>	5,22	180,2	163,2	18	12
D5		185,2	168,2	18	12
<b>MDMA</b>	5,44	194,2	163,0	18	11
D5		199,2	165,2	18	11
<b>MDEA</b>	5,80	208,2	163,2	25	15
D5		213,2	163,2	20	15
<b>MBDB</b>	6,02	208,2	135	25	15
D5		213,2	136	25	15
<b>Buprénorphine</b>	8,34	468,2	468,1	35	20
			54,8	65	55
D4		472,3	472,2	35	10
			58,6	55	50
<b>Norbuprénorphine</b>	7,21	414,4	414,3	50	20
			83,1	45	40
D3		417,4	417,3	50	20
			83,1	55	40



A : tampon formate d'ammonium (20 mM, pH = 2,8)  
 B : acétonitrile + 0,2 % d'acide formique  
 C : eau + 0,2 % NH<sub>4</sub>OH  
 D : méthanol - eau - acide formique (90 - 10 - 0,2 ; V / V / V)  
 V0 : position de la vanne pré-installée sur le Quattro Micro (Waters) lors du chargement de la colonne Oasis HLB  
 V1 : position de la vanne pré-installée sur le Quattro Micro (Waters) lors de l'élution de la colonne Oasis HLB et Atlantis C18 en ligne

**Fig. 2.** Enchaînement des étapes d'extraction-purification et d'élution de l'échantillon dans le cadre d'une préparation en ligne simplifiée.

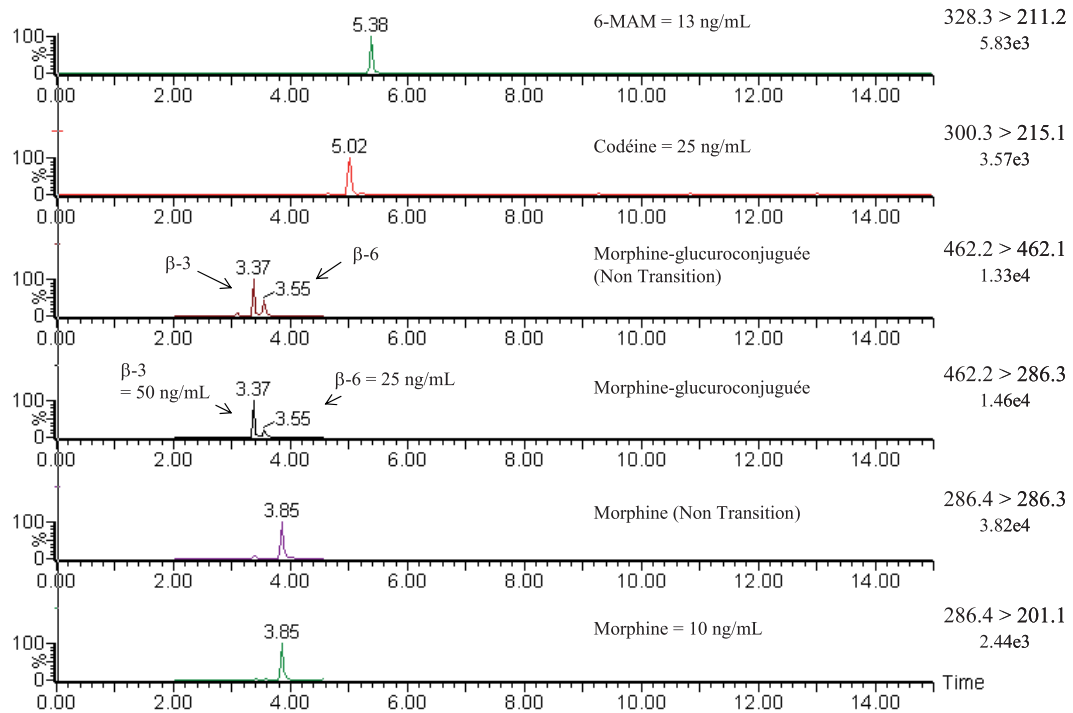


Fig. 3. Chromatogrammes des molécules opiacées après préparation en ligne d'échantillons sanguins médico-légaux.

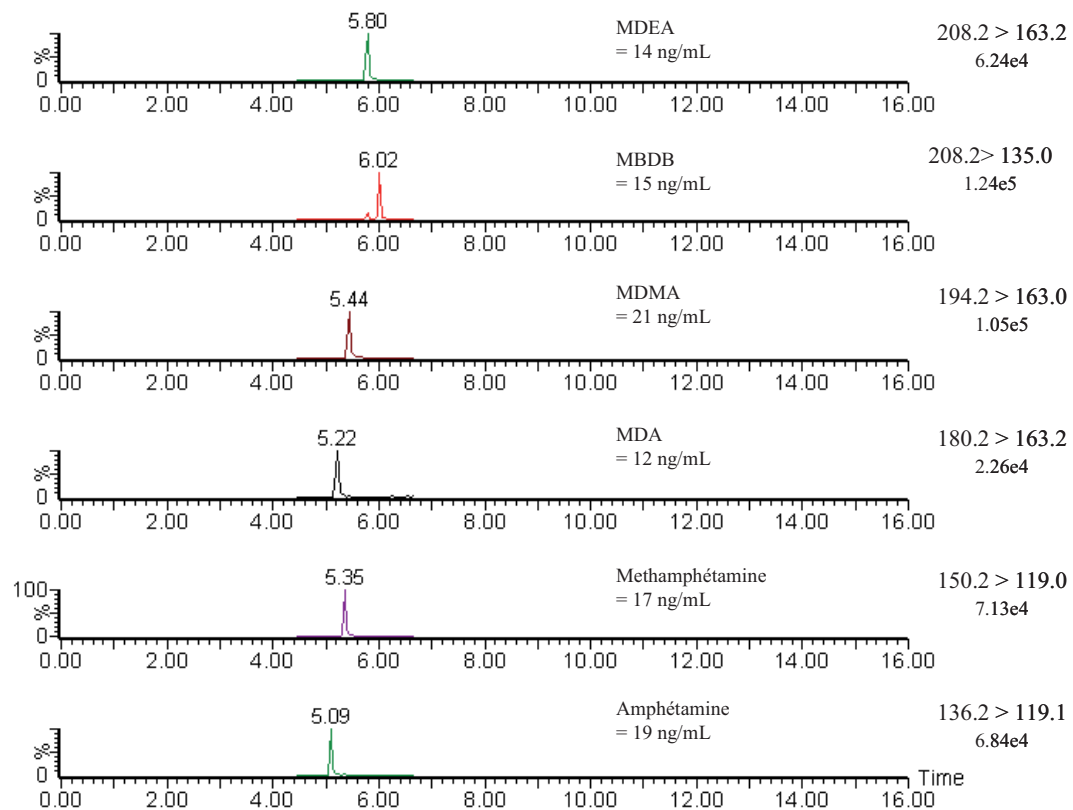


Fig. 4. Chromatogrammes des molécules amphétaminiques après préparation en ligne d'échantillons sanguins médico-légaux.

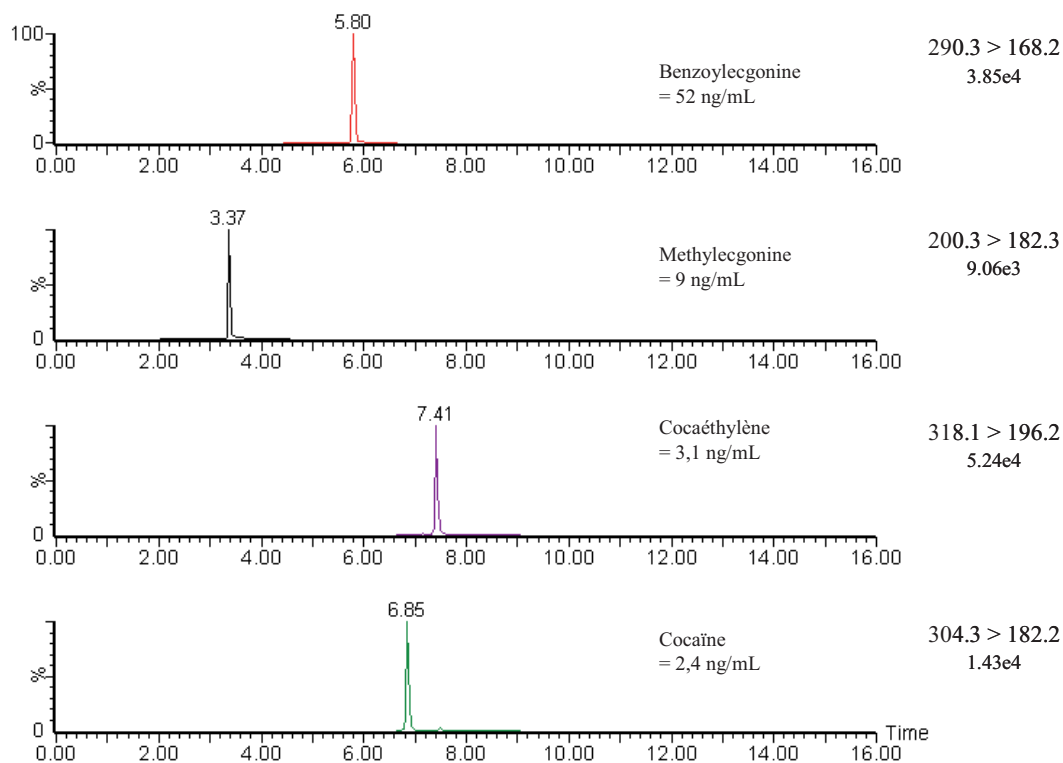


Fig. 5. Chromatogrammes des molécules cocaïniques après préparation en ligne d'échantillons sanguins médico-légaux.

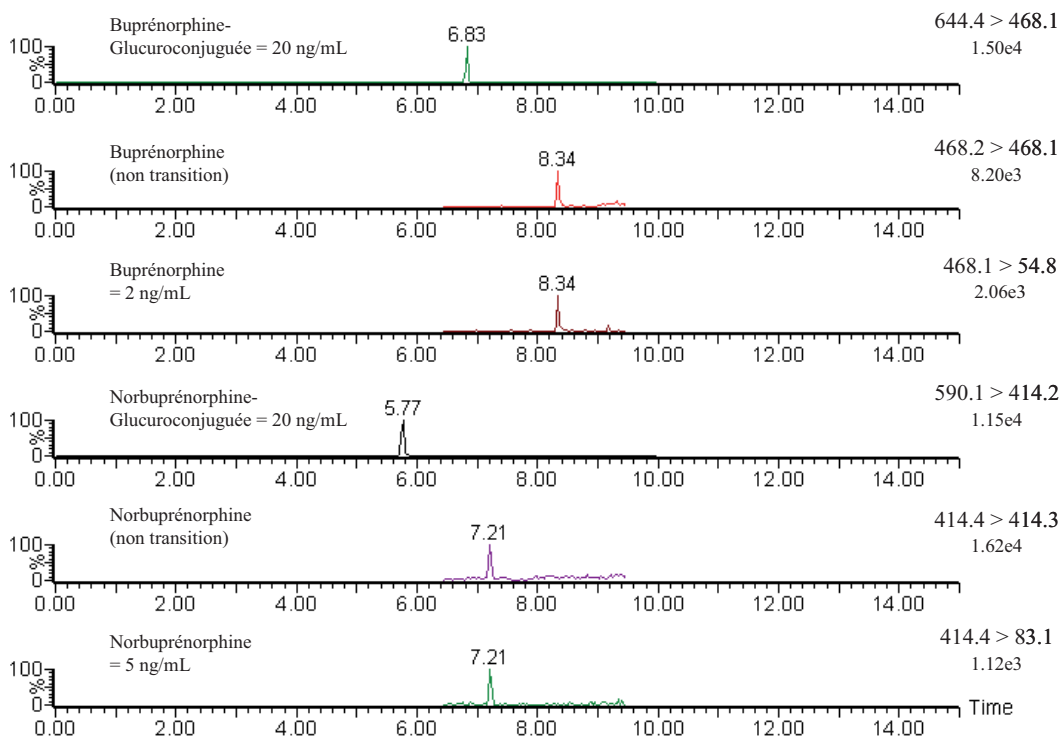


Fig. 6. Chromatogrammes de la buprénorphine, norbuprénorphine et des métabolites glucuroconjugués après préparation en ligne d'échantillons sanguins médico-légaux.

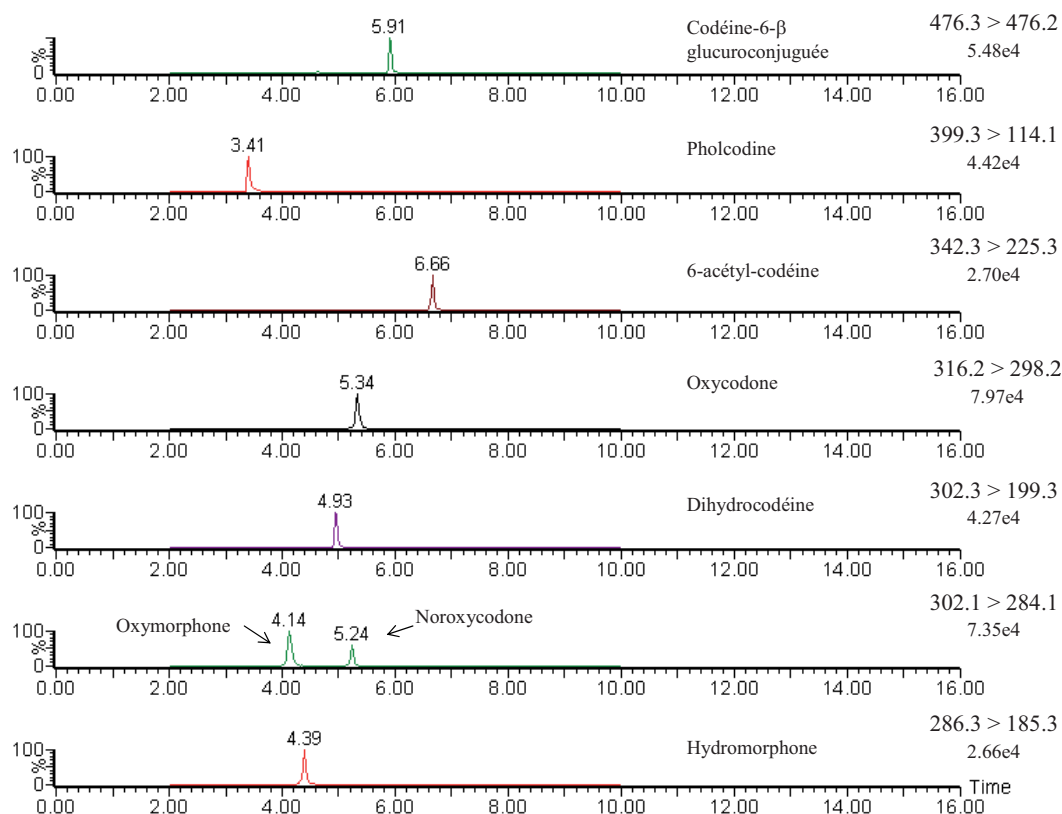


Fig. 7. Chromatogrammes des molécules opiacés autres que la morphine, M3G, M6G, 6-MAM, et codéine, après préparation en ligne d'un sérum surchargé à une concentration de 50 ng/mL pour chaque molécule.

Tableau III. Paramètres de validation des opiacés.

Molécule	LOD (ng/mL)	Précision <sup>(1)</sup> (CV %, n = 5)		Justesse <sup>(1)</sup> (biais %, n = 5)	
		Intra-série	Inter-série	Intra-série	Inter-série
Morphine (286,4/201,1)	1,1	3,4	10,3	7,8	5,6
Morphine (286,4/286,3)	0,4	6,7	4,7	-2,4	-2,0
6-MAM	0,2	5,5	5,8	-2,4	-1,0
		6,8	2,9	1,9	-4,5
Codéine	1,0	9,0	2,7	0,4	5,4
		3,3	2,2	-1,2	1,2
6-acétyl-codéine	0,8	8,8	6,1	-2,4	-3,2
		2,1	3,0	0,3	0,6
Dihydro-codéine	0,4	4,3	10,0	-2,4	5,3
		3,7	4,6	-1,9	0,9
Oxycodone	0,4	8,5	7,9	-1,6	2,2
		4,3	3,2	-1,3	-1,7
Noroxy-codone	1,3	6,3	7,7	6,3	1,0
		2,0	4,6	-0,2	-3,6
Oxy-morphone	1,0	5,7	3,9	-3,3	-2,2
		6,7	3,2	-1,3	-1,8
Hydro-morphone	0,9	8,7	4,7	2,4	6,5
		3,8	5,5	-1,4	-0,5
Hydro-morphone	0,9	8,7	4,7	2,4	6,5
		3,8	5,5	-1,4	-0,5
Pholcodine	0,6	6,6	6,8	-3,2	1,0
		5,3	8,4	3,8	-3,6

<sup>(1)</sup> La précision et la justesse ont été évaluées respectivement à 10 ng/mL et 50 ng/mL.



**Tableau IV.** Paramètres de validation des cocaïniques, amphétaminiques, buprénorphine et norbuprénorphine.

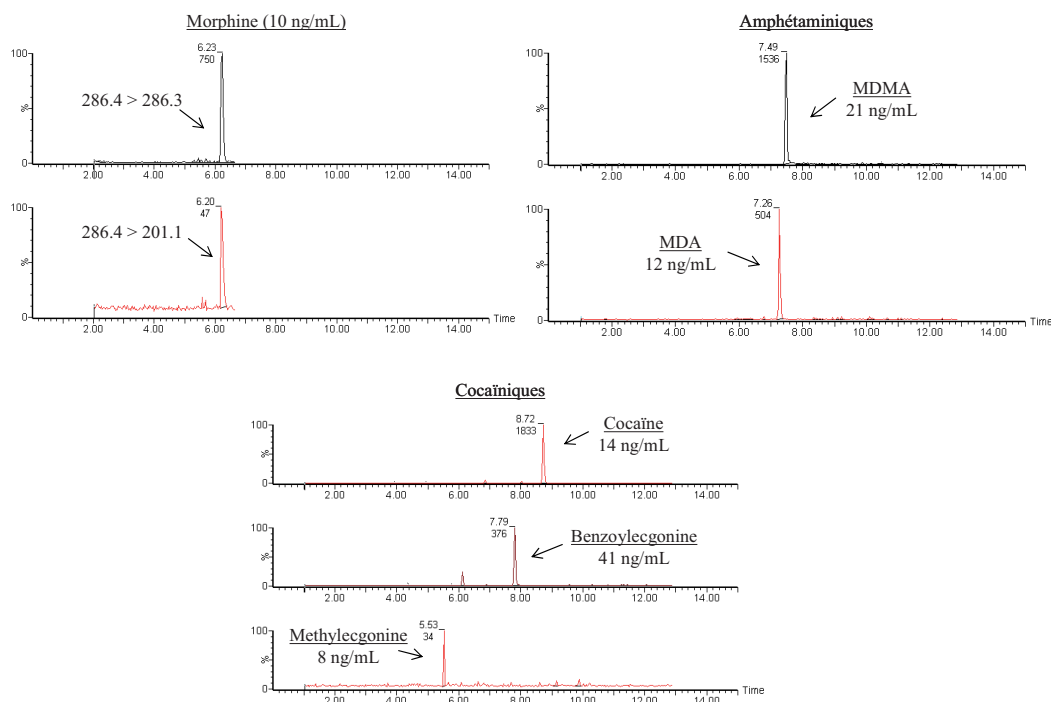
Molécule	LOD (ng/mL)	Précision <sup>(1)</sup> (CV %, n = 5)		Justesse <sup>(1)</sup> (biais %, n = 5)	
		Intra-série	Inter-série	Intra-série	Inter-série
Cocaïne	0,7	4,0	3,0	-2,8	-0,8
		3,3	2,2	2,5	-1,1
Coca-éthylène	0,4	3,6	3,1	-1,8	-0,8
		2,3	2,9	0,9	-0,7
Méthyl-ecgonine	0,5	3,8	8,4	6,8	5,0
		5,3	2,9	-1,0	0,6
Benzoyl-ecgonine	0,6	3,1	3,3	1,0	-0,6
		2,7	3,2	2,7	-0,2
Amphé-tamine	0,2	8,0	2,2	4,6	1,0
		2,3	1,6	-2,2	0,9
Métamphé-tamine	0,2	3,8	3,0	4,0	3,2
		2,9	2,1	2,6	-0,2
MDA	0,6	6,5	4,8	-0,2	1,0
		5,1	2,6	0,1	-0,9
MDMA	0,6	5,6	4,3	1,4	3,0
		1,1	4,9	-0,1	-3,1
MDEA	0,2	7,8	4,8	-0,6	-0,2
		2,6	2,5	-1,2	-0,3
MBDB	0,2	4,5	4,7	0,4	4,8
		2,4	1,6	-0,3	-0,2
Bupré-norphine	0,7	4,4	4,9	-5,6	2,8
		3,9	1,6	-6,8	-0,5
Norbupré-norphine	0,3	2,2	8,7	-2,8	-0,4
		2,5	4,5	10,0	-1,7

<sup>(1)</sup> La précision et la justesse ont été évaluées respectivement à 10 ng/mL et 50 ng/mL.

**Tableau V.** Paramètres de validation des métabolites glucuroconjugués.

Molécule	LOD (ng/mL)	Précision <sup>(1)</sup> (CV %, n = 5)		Justesse <sup>(1)</sup> (biais %, n = 5)	
		Intra-série	Inter-série	Intra-série	Inter-série
M3G (462,2 / 286,3)	2,5	13,4	9,4	6,1	-0,8
		8,2	3,3	-2,4	2,7
M3G (462,2 / 462,1)	1,5	9,0	8,1	10,4	4,5
		9,0	8,0	0,6	-3,1
M6G (462,2 / 286,3)	2,5	13,1	11,4	13,4	11,2
		7,6	8,1	5,0	-0,9
M6G (462,2 / 462,1)	1,5	8,5	8,0	0,8	8,0
		3,9	6,6	2,5	-0,8
C6G	2,5	8,9	12,3	2,5	7,1
		10,9	6,0	2,1	4,9

<sup>(1)</sup> La précision et la justesse ont été évaluées respectivement à 10 ng/mL et 50 ng/mL.



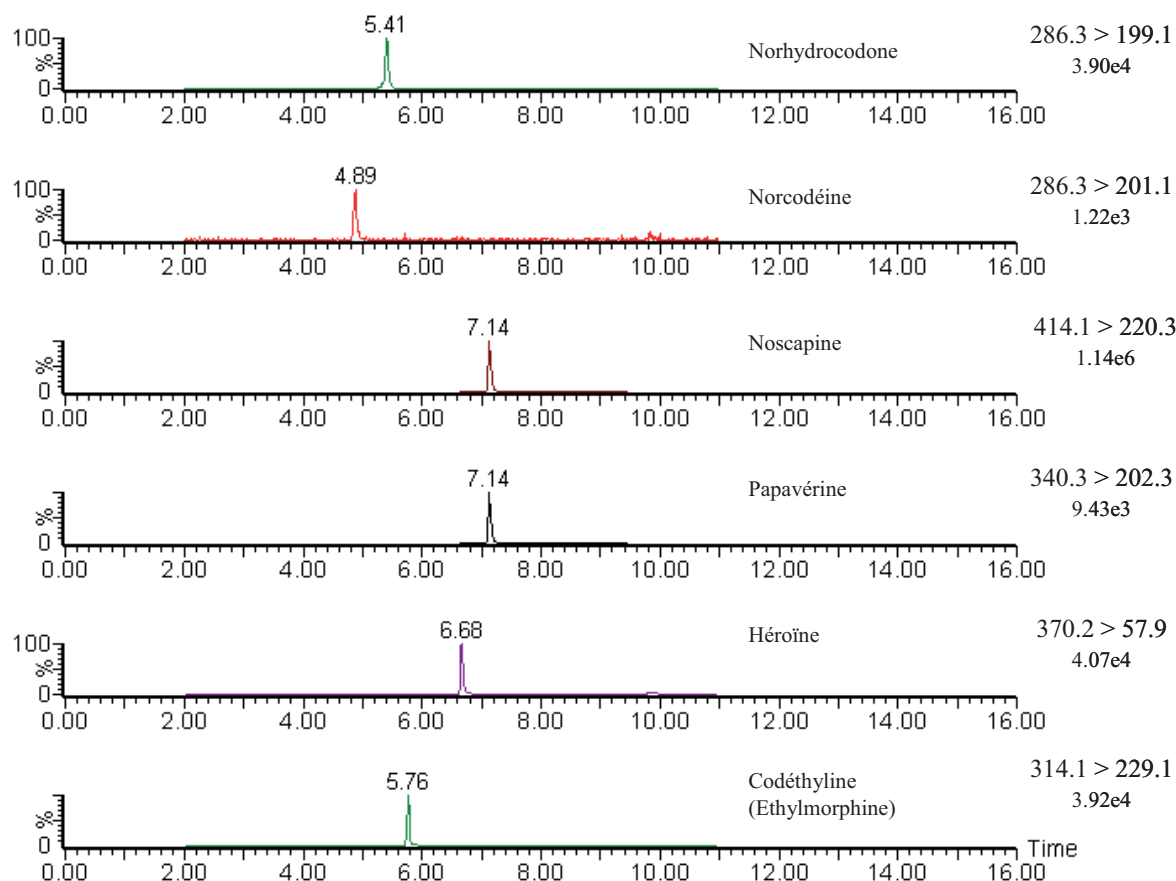
**Fig. 8.** Chromatogrammes de la morphine, MDMA, MDA, cocaïne, benzoylecgonine et methylecgonine après préparation en ligne simplifiée d'échantillons sanguins médico-légaux.

simplifiée permet d'obtenir des résultats de qualité voisine de ceux obtenus avec la préparation en ligne utilisant la pompe annexe et la vanne de commutation. La séparation chromatographique de l'ensemble des molécules est complète; les temps de rétention sont supérieurs d'environ 2 minutes (figure 8). L'enregistrement des données en mode MRM s'effectue également avec 3 fenêtres d'acquisition adaptées au décalage des temps de rétention.

#### 4 Discussion

La préparation en ligne des échantillons (PLE) constitue une avancée analytique importante de ces dernières années, autorisée par l'essor de la CL-SM/SM. La méthode analytique développée et validée, permet après une simple déprotéinisation acide de l'échantillon (plasma, sérum ou sang total) et une phase d'extraction-purification en ligne, la quantification de 25 molécules stupéfiantes et médicaments morphiniques. La quantification de ces molécules nécessite une phase de chromatographie, notamment pour retarder l'élution des substances les plus polaires (métabolites glucuroconjugés, methylecgonine...). Ces molécules, éluées trop rapidement, peuvent être à l'origine de suppression d'ionisation. La colonne analytique utilisée, une C18 Atlantis (Waters), permet une rétention sensible des composés polaires supérieure à celle des colonnes C18 conventionnellement utilisées, sans exercer de rétention excessive sur les composés hydrophobes. De plus, cette colonne présente une compatibilité avec des phases mobiles aqueuses et une forte stabilité à faible pH. L'analyse chromatographique est également nécessaire pour sépa-

rer les métabolites des molécules mères, essentiellement les glucuroconjugés (M3G, M6G, C6G, BUPG, NBUPG) qui, dans la cellule de collision s'hydrolysent et génèrent la molécule non glucuroconjugée (morphine, codéine, buprénorphine, norbuprénorphine). Ainsi, pour la morphine, il est possible de quantifier séparément la morphine libre, la M3G et la M6G. D'autre part, la séparation chromatographique des molécules analysées est nécessaire pour identifier les composés de même masse molaire et se fragmentant à l'identique. C'est le cas, par exemple, de la noroxycodone ( $T_R = 5,24$  min) et de l'oxymorphone ( $T_R = 4,14$  min), de la morphine ( $T_R = 3,85$  min) et de la norcodéine ( $T_R = 4,89$  min), de la M3G ( $T_R = 3,37$  min) et de la M6G ( $T_R = 3,55$  min), de la benzoylecgonine ( $T_R = 5,80$  min) et de la norcocaïne ( $T_R = 7,07$  min). Enfin, cette séparation chromatographique de l'ensemble des molécules permet d'optimiser la sensibilité de la méthode. En effet, l'acquisition des données peut se répartir dans différentes fenêtres d'acquisition ne contenant pas plus de 19 transitions MRM chacune. Ainsi, le nombre de scan par molécule (*dwell time*) peut être optimisé afin d'obtenir une sensibilité satisfaisante. Pour certaines molécules dont la sensibilité est plus faible, par exemple la morphine, M3G et M6G, la buprénorphine et la norbuprénorphine, l'acquisition peut s'effectuer avec une « non-transition ». La « non-transition » permet de sélectionner l'ion parent successivement dans les deux quadripôles, en appliquant une faible énergie de collision afin de ne pas fragmenter cet ion parent (exemple : « non-transition » de la morphine :  $286,4 \rightarrow 286,3$ ). Cette double filtration de l'ion parent permet d'augmenter significativement la sensibilité du signal pour ces molécules. Cependant, la « non-transition » peut-être associée à une augmentation du bruit de

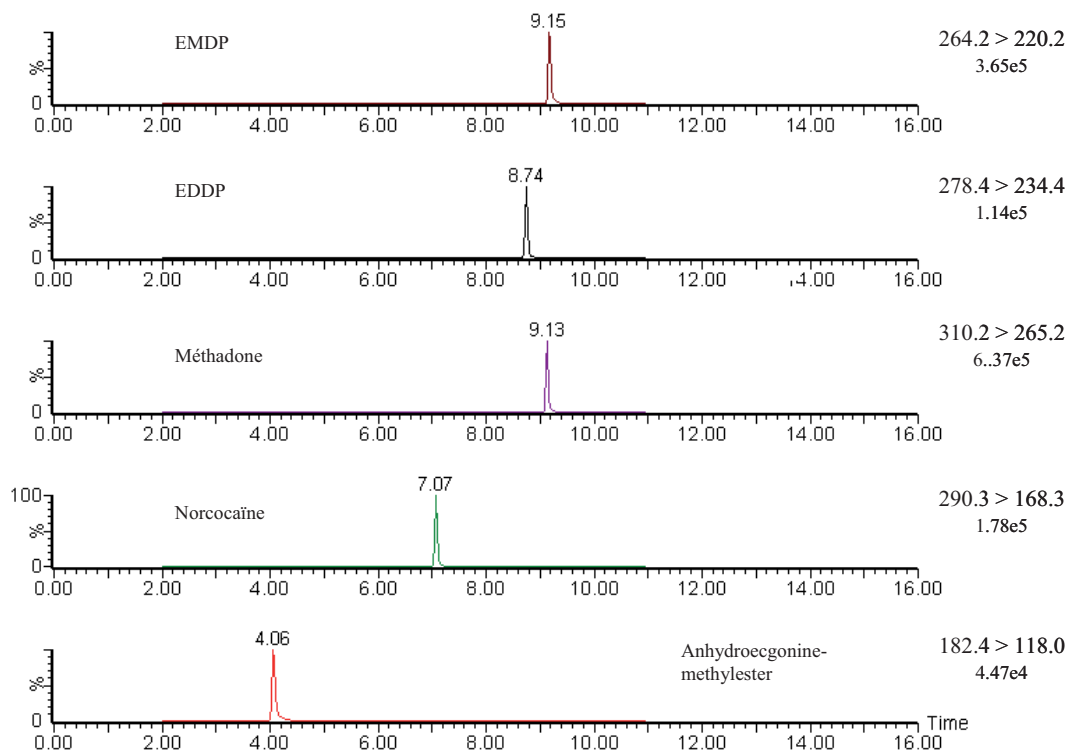


**Fig. 9.** Chromatogrammes des molécules identifiées par la méthode décrite mais non validées analytiquement : méthadone et ces métabolites (EMDP, EDDP), papavérine et noscapine, autres molécules opiacés, cocaïniques et amphétaminiques (à partir d'un sérum surchargé à une concentration de 50 ng/mL pour chaque molécule).

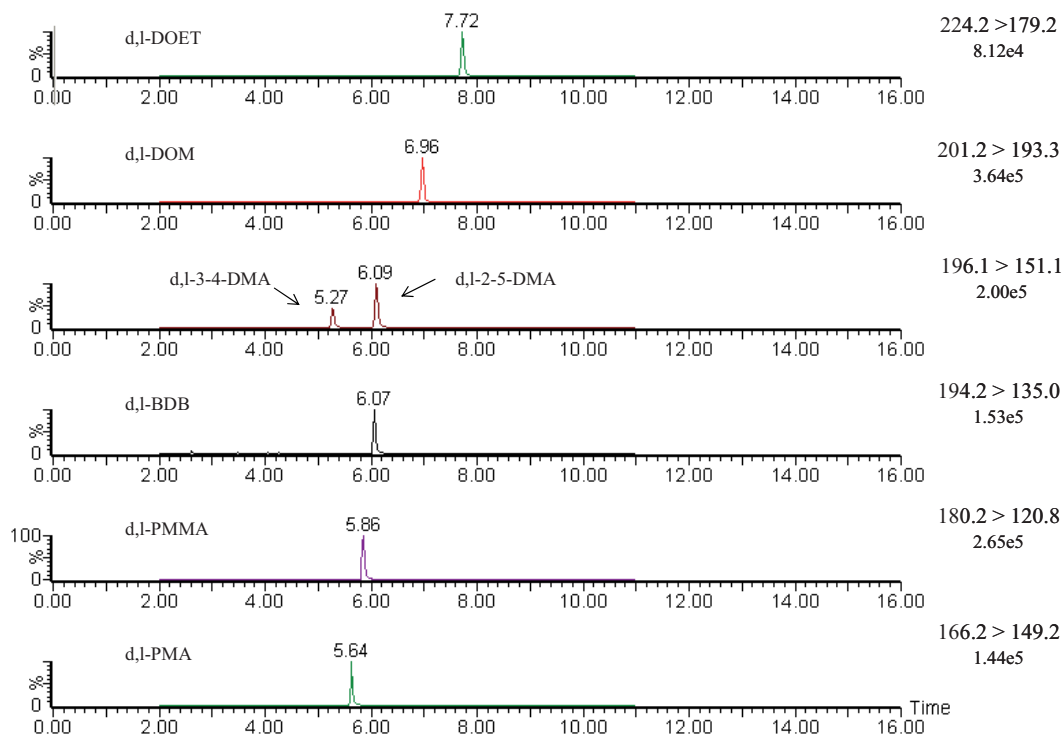
fond et, est donc utilisée principalement pour confirmer la présence de ces molécules. D'autre part, l'évaluation du recouvrement de la préparation en ligne a permis de mettre en évidence l'existence d'effets de matrice pour l'ensemble des molécules, cependant sans conséquence sur l'identification et la quantification des molécules analysées. L'utilisation des étalons internes deutérés ainsi que la dilution au  $1/10^{\circ}$  de l'échantillon permettent de corriger ces effets de matrice. Malgré cela, il peut arriver que ces effets de matrice persistent, notamment sur des échantillons de sang total dégradés. C'est pourquoi cette dilution au  $1/10^{\circ}$  s'effectue avec un blanc sérum (sérum Technicon ou autre) lui-même dilué au  $1/10^{\circ}$  dans l'eau, ceci afin de diminuer les effets de matrice mais aussi de rendre reproductibles ceux qui persistent. Le système proposé est totalement indépendant du matériel CL-SM/SM utilisé et ne nécessite pas de système dédié et coûteux de préparation en ligne. La forme simplifiée de cette PLE permet d'adapter cette méthode sans pompe annexe ni vanne de commutation supplémentaire. La vanne pré-installée sur le spectromètre de masse et une pompe CL à 4 canaux sont suffisantes. De plus, l'injection d'une faible quantité d'échantillon (50  $\mu$ L d'une dilution au  $1/10^{\circ}$ , soit 5  $\mu$ L de l'échantillon pur) déprotéinisé permet d'augmenter la durée de vie des colonnes Oasis (entre 600 et 700 injections/colonne).

## 5 Conclusion

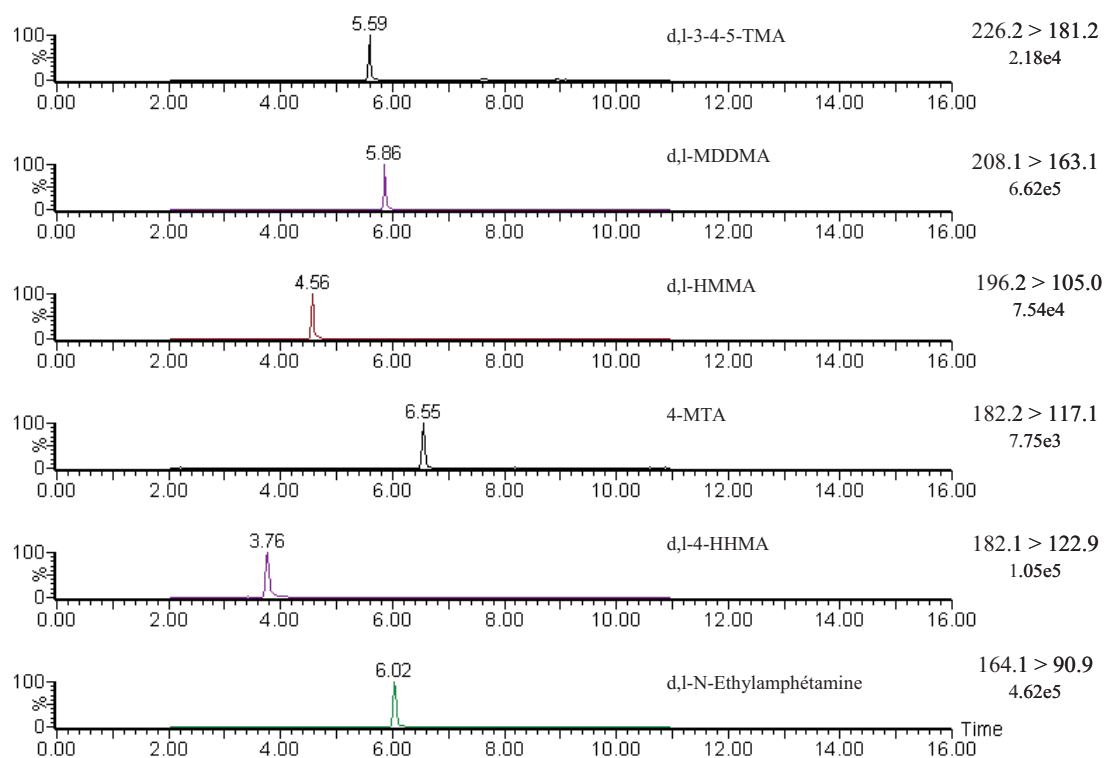
Cette méthode CL-SM/SM de dosage de multiples molécules stupéfiantes et médicaments morphiniques, est simple et rapide. La sensibilité et la spécificité sont satisfaisantes pour une application hospitalière et médico-légale. Le dosage de substances stupéfiantes dans le cadre des accidents de la voie publique et des expertises médico-légales, est le plus souvent réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, technique qui nécessite un volume d'échantillon plus important, ainsi que des étapes longues, complexes et polluantes d'extraction et de dérivation. La méthode décrite peut être appliquée à la détection et à la quantification de ces mêmes molécules et de leurs métabolites dans les urines après leur dilution au  $1/100^{\circ}$  dans l'eau. Enfin, de nombreuses autres molécules psychotropes, stupéfiantes ou non, peuvent être identifiées et quantifiées dans le même cycle analytique : méthadone et ces métabolites (EMDP, EDDP), papavérine et noscapine, autres molécules opiacés (héroïne, norcodéine, codéthyline, norhydrocodone), cocaïniques (norcocaine, anhydroecgonine méthylester) et amphétaminiques (éthylamphétamine, BDB, PMA, PMMA, 3-4-DMA, 2-5-DMA, DOM, DOET, 3-4-5-TMA, MDDMA, HHMA, 4-MTA, HMMA) (figures 9 à 12). Quelques essais de



**Fig. 10.** Chromatogrammes des molécules identifiées par la méthode décrite mais non validées analytiquement : méthadone et ces métabolites (EMDP, EDDP), papavérine et noscapine, autres molécules opiacés, cocaïniques et amphétaminiques (à partir d'un sérum surchargé à une concentration de 50 ng/mL pour chaque molécule).



**Fig. 11.** Chromatogrammes des molécules identifiées par la méthode décrite mais non validées analytiquement : méthadone et ces métabolites (EMDP, EDDP), papavérine et noscapine, autres molécules opiacés, cocaïniques et amphétaminiques (à partir d'un sérum surchargé à une concentration de 50 ng/mL pour chaque molécule).



**Fig. 12.** Chromatogrammes des molécules identifiées par la méthode décrite mais non validées analytiquement : méthadone et ces métabolites (EMDP, EDDP), papavérine et noscapine, autres molécules opiacées, cocaïniques et amphétaminiques (à partir d'un sérum surchargé à une concentration de 50 ng/mL pour chaque molécule).

cette PLE couplée à une méthode LC-MS se sont également montrés très encourageants et mériteraient d'être développés. Pour les médicaments autres que les morphiniques, la colonne analytique Atlantis est remplacée par une colonne plus courte de 50 mm (Luna Phenyl Hexyl 50 × 2,0 mm ; 5 μ); le gradient analytique plus rapide réduit le cycle analytique à 5 minutes [16].

## Références

1. Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 1999; 23: 620-624.
2. Edinboro LE, Backer RC, Poklis A. Direct analysis of opiates in urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2005; 29: 704-710.
3. Feng J, Wang L, Dai I, Harmon T, Bernert JT. Simultaneous determination of multiple drugs of abuse and relevant metabolites in urine by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2007; 31: 359-368.
4. Gustavsson E, Andersson M, Stephanson N, Beck O. Validation of direct injection electrospray LC-MS/MS for confirmation of opiates in urine drug testing. *J Mass Spectrom.* 2007; 42: 881-889.
5. Johansen SS, Bhatia HM. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.* 2007; 852(1-2): 338-344.
6. Murphy CM, Huestis MA. LC-ESI-MS/MS analysis of morphine, codeine, morphine-3-β-glucuronide, morphine-6-β-glucuronide, and codéine-6-β-glucuronide in human urine. *J Mass Spectrom.* 2005; 40: 1412-1416.
7. Maralikova B, Weinmann W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J Chromatogr.* 2004; 811: 21-30.
8. Slawson MH, Crouch DJ, Andrenyak DM, Rollins DE, Lu JK. Determination of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in plasma after intravenous and intrathecal morphine administration using HPLC with electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 1999; 23: 468-473.
9. Lacroix C, Hoang TP, Wojciechowski F, Duwoos H, Nouveau J, Diquet B. Simultaneous quantification of zidovudine and its metabolites in serum and urine by high-performance liquid chromatography using column switching. *J Chromatogr.* 1990; 525(1): 240-245.
10. Lacroix C, Wojciechowski F, Danger P. Monitoring of benzodiazepines (clobazam, diazepam and their main active metabolites) in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1993; 617(2): 285-290.
11. Mallet CR, Mazzeo J, Neue U. Evaluation of several solid phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry on-line configurations for high-throughput analysis of acidic

- and basic drugs in rat plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2001; 15: 1075-1083.
12. Mallet CR, Ziling L, Mazzeo J, Neue U. Analysis by on-line extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a mixed mode sorbent. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002; 16: 805-813.
  13. Ackermann BL, Berna MJ, Murphy AT. Recent Advances in use of LC/MS/MS for quantitative high-throughput bioanalytical support of drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2: 53-66.
  14. Jemal M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr.* 2000; 14: 422-429.
  15. Jemal M, Huang M, Jiang X, Mao Y, Powell ML. Direct injection versus liquid-liquid extraction for plasma sample analysis by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1999; 13: 2125-2132.
  16. Lacroix C, Saussereau E, Bodin G, Goullé JP. Mise en place au sein d'un laboratoire de pharmaco-toxicologie de la préparation en ligne des échantillons couplée à la LC-MS-MS : considérations générales. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19(2): 172.