

Article original

Extraction en phase solide de 22 médicaments d'intérêt en toxicologie médico-légale

Méline Mancebo¹, Martine Perrin^{2*}

¹ Direction Départementale de la Sécurité Publique, Sûreté Départementale, Police Nationale, 45 rue de Carency, 93000 Bobigny, France

² Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale, Département Toxicologie, 1 boulevard Théophile Sueur, 93111 Rosny-sous-Bois Cedex, France

Résumé – De nombreuses colonnes d'extraction en phase solide dédiées à l'extraction des toxiques et leurs protocoles spécifiques sont proposées à l'analyste. Nous avons optimisé l'un de ces protocoles pour l'extraction à partir de sang total – en une seule étape – de principes actifs de médicaments acides, neutres et basiques. Chaque niveau du protocole a été conçu de manière à obtenir les meilleurs rendements d'extraction. L'analyse des extraits (identification et quantification) a été réalisée à l'aide d'un système de *High Performance Liquid Chromatography system with Diode Array Detector* (HPLC-DAD). La colonne SPE Evolute ABN[®] (Acid Base Neutral) fournie par Argonaut est celle qui extrait le mieux les différents composés analysés parmi toutes les cartouches testées. La colonne Oasis HLB[®] (Hydrophilic Lipophilic Balance) proposée par Waters permet également l'extraction de la totalité des molécules mais avec des rendements inférieurs. Quant aux autres colonnes étudiées (distribuées par Varian et Phenomenex), elles ont présenté des résultats insuffisants dans le cadre de ce projet. Les limites de détection et de quantification obtenues avec ce protocole optimisé ont été comparées aux concentrations thérapeutiques et toxiques habituellement retrouvées. La mise au point de cette nouvelle procédure a permis d'optimiser une méthode de dépistage large (criblage) de médicaments fréquemment rencontrés dans les matrices biologiques en toxicologie clinique et médico-légale.

Mots clés : Extraction en phase solide, colonnes SPE, médicaments, intoxication, criblage

Abstract – **Solid phase extraction of 22 drugs of interest in the forensic toxicology field.** Many solid phase extraction columns which are dedicated to the extraction of various drugs associated with their specific protocols are proposed to the analyst. We have optimised a one stage procedure for the extraction from whole blood of acidic, neutral and basic drugs. Each step of the protocol has been optimised so as to obtain the best extraction recovery. The analysis of the extracts (identification and quantification) has been realised with the help of High Performance Liquid Chromatography system coupled with a Diode Array Detector (HPLC-DAD). The SPE Evolute ABN[®] column (Acid Base Neutral) by Argonaut is the column which does extract the more and the best the different analysed components among all the columns which have been tested. Oasis HLB[®] column (Hydrophilic Lipophilic Balance) by Waters also allows the extraction of the whole list of active principles studied but with lower recoveries. The other columns studied (sold by Varian and Phenomenex) presented insufficient results for this project. In the last step of the work we checked if the results did fit to the forensic toxicology purpose; detection and quantification limits have been compared to therapeutic and toxic concentrations usually found in forensic toxicology. Implementing this new procedure allowed us to create a method of comprehensive screening of drugs frequently implicated in forensic toxicology.

Key words: Solid Phase Extraction, SPE columns, drugs, intoxication, screening

Reçu le 5 juillet 2007, accepté après modifications le 21 janvier 2008
Publication en ligne le 6 juin 2008

* Correspondance : Martine Perrin, Tél. 01 58 66 50 79, Fax 01 58 66 50 27, tox.ircgn@gendarmerie.defense.gouv.fr

1 Introduction

En toxicologie médico-légale, trois grandes catégories de missions peuvent être demandées à l'analyste. Dans la recherche des causes toxiques de la mort, il s'agit de déterminer si un xénobiotique est responsable de la mort ou a contribué de façon directe ou indirecte au décès ; dans le cas de soumission chimique, le toxicologue recherche une substance susceptible d'avoir modifié la vigilance de la victime ; enfin, dans les tous autres cas, qu'il s'agisse d'accidents ou d'intoxications volontaires, un dépistage large (criblage ou screening) est pratiqué, afin de mettre en évidence, le cas échéant, la présence d'un xénobiotique dans le prélèvement biologique.

L'objet de cette étude est d'extraire les toxiques à partir du sang total selon le principe de l'extraction en phase solide, plus facile et plus économe en solvants que celui de l'extraction liquide-liquide. Nous avons sélectionné 22 molécules prises parmi les médicaments fréquemment rencontrés en toxicologie médico-légale. Le choix de ces molécules a été établi en fonction de leur toxicité intrinsèque et de leur fréquence d'apparition en toxicologie, à partir des données recueillies auprès de centres anti-poison, de services de réanimation ou de toxicologie hospitaliers et également à partir des résultats d'analyses autopsiques réalisés dans différents laboratoires, dont le nôtre [1–6]. Étant donnée la variété des principes actifs choisis, en termes de propriétés physico-chimiques, il a été envisagé dans un premier temps d'employer non pas un mais plusieurs supports pour extraire la totalité des composés. L'analyse des extraits obtenus est effectuée en (HPLC-DAD). Différents supports et protocoles sont évalués dans le présent article.

2 Matériel et méthodes

Onze cartouches des fournisseurs Argonaut (Texas, États-Unis), Phenomenex (Californie, États-Unis), Varian (Californie, États-Unis) et Waters (Massachusetts, États-Unis) ont été testées lors d'une étude préliminaire. Deux cartouches, dites à support « universels », destinées à l'extraction de tout type de molécules -acides, bases, neutres- ont été sélectionnées pour poursuivre l'étude : la cartouche SPE Evolute ABN[®] 1 mL 25 mg 55 μ m (Argonaut – IST, Uppsala, Suède), et la cartouche Oasis HLB[®] 1 mL 30 mg 30 μ m (Waters, Milford, MA, USA).

De nombreux protocoles sont publiés pour chacune de ces cartouches, ils ont servi de base à nos travaux [7–16].

Le support d'extraction manuel (manifold 12 positions) est de marque Merck.

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique ; les produits Prolabo[®] : méthanol Ultragradiant pour HPLC Chromanorm, le méthanol Normapur et le di-sodium hydrogénéphosphate et l'acétonitrile Merck[®], sont distribués par VWR (Fontenay-sous-Bois, France) ; l'acide formique Analyapur par Fisher-Scientific (Illkirch, France). L'eau a été purifiée à l'aide d'un système Milli-Q PLUS[®] (Massachusetts, États-Unis) de conductivité 1,8 M Ω .cm⁻².

Les solutions de travail ont été préparées à partir de substances de référence pures transmises par les fournisseurs ou revendeurs suivants : LGC Promochem (Molsheim, France),

Sanofi-Aventis (Paris, France), Glaxo Smith Kline (Brentford, Royaume-Uni), Pfizer (Paris, France), Sigma-Aldrich (Lausanne, Suisse), Astra Zeneca (Rueil-Malmaison, France), Bouchara Recordati (Milan, Italie), Lilly Pharma (Indiana, États-Unis), Roche (Neuilly, France) et Wyeth Lederlé (New Jersey, États-Unis) comme indiqué dans le tableau I.

C'est en fonction des résultats préliminaires basés sur les rendements d'extraction observés que le protocole a été optimisé. Chaque étape de l'extraction a été améliorée individuellement [7, 12, 13, 15]. Les phases de lavage et d'élution ont également été étudiées afin de minimiser les pertes de molécules d'intérêt et pour maximiser la récupération des molécules adsorbées sur la phase de la colonne.

Les solutions de travail ont été préparées en dissolvant les molécules d'intérêt dans une solution isotonique de chlorure de sodium lors de l'évaluation préliminaire, puis dans du sang de transfusion sanguine pour lequel l'absence de xénobiotiques a préalablement été vérifiée.

Chaque extrait est mis en solution finale dans un mélange eau : méthanol (50 : 50) avant son injection en HPLC-DAD sur un appareillage Thermofinnigan Spectrasystem[®] (Midland, Canada), muni d'une colonne X-Terra[®], MS C₁₈ (dimensions : 150 mm de longueur, 3 mm de diamètre interne et 3,5 μ m de granulométrie). La composition de la phase mobile et le gradient appliqué figurent dans le tableau II. Le logiciel associé à l'appareil est Chromquest 4.1[®], de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, États-Unis). Pour chaque paramètre, des séries de trois essais ont été exécutées. Tous les tests ont été réalisés sur des mélanges contenant 6 à 8 molécules choisies de manière à obtenir un tracé chromatographique (figure 1) sans phénomène de co-élution [13, 14, 16]. Ainsi il a été avéré l'absence d'interférence d'un résultat sur l'autre pour les calculs de rendements d'extraction. Leurs moyenne et écart-type ont été comparés afin de déterminer la valeur optimale à chaque étape du protocole. Le rendement d'extraction a été calculé selon le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement des échantillons surchargés avec des quantités connues, et d'autre part après injection directe de ces mêmes quantités de molécules, non extraites. Ces molécules ont été mises directement en solution (eau : méthanol, 50 : 50) et couvrent les concentrations habituellement rencontrées en toxicologie médico-légale. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées puis vérifiées conformément aux formules :

$$LD = 3 \times \text{bruit de fond}, \quad LQ = 10 \times \text{bruit de fond}.$$

Un étalon interne (prazépam) a été ajouté en fin de protocole afin d'assurer la validité de l'injection et de vérifier la répétabilité de l'injection. Celui-ci n'a pas été utilisé pour les calculs de quantification.

Le bruit de fond est déterminé dans une zone sans pics chromatographiques d'intérêt sur une durée équivalente à environ 20 fois la largeur à mi-hauteur du pic évalué.

La dernière phase de nos travaux a consisté en la comparaison des limites de détection et quantification obtenues avec des valeurs de la littérature recueillies en milieu hospitalier ou en laboratoire de toxicologie médico-légale [4, 6, 13, 17–19] ; il est nécessaire de savoir si les limites obtenues pour ces molécules sont cohérentes avec les concentrations auxquelles elles

Tableau I. Molécules étudiées.

Principe actif	Spécialité pharmaceutique de référence	Fournisseur	Tr (min)
acide acétylsalicylique	Aspégic [®]	Sanofi-Aventis	11,1
alprazolam	Xanax [®]	Pfizer	18,19
amitriptyline	Laroxyl [®]	Sigma-Aldrich	18,05
atracurium	Tacrium [®]	Glaxo Smith Kline	11,7
bromazépam	Lexomil [®]	Roche	14,9
buprénorphine	Subutex [®]	LGC Promochem	15,94
clorazépate dipotassique	Tranxène [®]	Sanofi-Aventis	19,43
cyamémazine	Tercian [®]	Sanofi-Aventis	17,47
diazépam	Valium [®]	Roche	21,53
flunitrazépam	Rohypnol [®]	Roche	19,06
fluoxétine	Prozac [®]	Lilly Pharma	18,83
lorazépam	Temesta [®]	Wyeth Lederlé	17,92
méthadone chlorhydrate	Méthadone [®]	LGC Promochem	18,78
nordiazépam	Nordaz [®]	Bouchara Recordati	19,38
oxazépam	Seresta [®]	LGC Promochem	17,35
paracétamol	Doliprane [®]	Sanofi-Aventis	14,32
paroxétine	Deroxat [®]	Glaxo Smith Kline	17,07
propranolol	Avlocardyl [®]	Astra Zeneca	14,23
quinidine	Quinimax [®]	Sanofi-Aventis	11,27
Triazolam	Halcion [®]	LGC Promochem	18,50
zolpidem	Stilnox [®]	Sanofi-Aventis	12,31
zopiclone	Imovane [®]	Sanofi-Aventis	10,40

Tableau II. Gradient d'élution pour la méthode chromatographique optimisée. Le tampon phosphate est à une concentration de 5 mM, son pH est de 3,2.

t (min)	Tampon KH ₂ PO ₄ (5 mM ; pH 3,2) (en %)	ACN (%)	débit (mL/min)
0	95	5	0,6
1	95	5	0,6
25	40	60	0,6
28	20	80	0,6
30	20	80	0,7
33	95	5	0,7
38	95	5	0,6

sont retrouvées lors des intoxications ou dans les dossiers de soumission chimique [2].

3 Résultats

L'obtention des premiers résultats a orienté notre choix vers deux références de cartouches, les cartouches SPE Evolute ABN[®] ainsi que les cartouches Oasis HLB[®], dont le protocole commun a été optimisé (cf. tableau III). Chaque étape a été testée en terme de composition et de volume de solvants [7, 12, 13, 15]. Ont également été optimisées préalablement à l'extraction, la préparation du sang (dilution, choix du pH et de la composition de la solution tampon, centrifugation), et postérieurement à l'extraction, la préparation de l'échantillon à injecter (évaporation de l'extrait, flaconnage, mise en

solution). Pour les cartouches SPE Evolute ABN[®] ainsi que les cartouches Oasis HLB[®], les résultats préliminaires ont été satisfaisants pour un large éventail de médicaments. Bien que les rendements d'extraction soient beaucoup plus faibles dans le sang total que dans le plasma ou la solution isotonique de chlorure de sodium, en raison de leur différence de viscosité, nous avons constaté que ces rendements restaient proportionnels pour chaque molécule. Pour des raisons de commodité, le travail d'optimisation des différentes étapes de l'extraction (notamment le lavage et l'élution) a donc été effectué sur solution isotonique de chlorure de sodium.

3.1 Préparation d'échantillon

Les analyses toxicologiques étant habituellement réalisées sur 1 mL de sang (exception faite lorsque les conditions ne permettent pas le prélèvement d'un tel volume par le médecin légiste lors de certaines autopsies par exemple), nous avons choisi d'optimiser la phase de préparation d'échantillon à partir de ce volume. Ce millilitre de sang doit être dilué avec 4 mL d'eau après homogénéisation et centrifugation (5000 rpm, 10 min). Le surnageant obtenu est prélevé et transvasé dans un tube contenant 2 mL de tampon phosphate 100 mM, puis homogénéisé au vortex.

3.2 Extraction

Le protocole d'extraction optimisé pour la cartouche SPE Evolute ABN[®] est le suivant : la colonne est conditionnée à

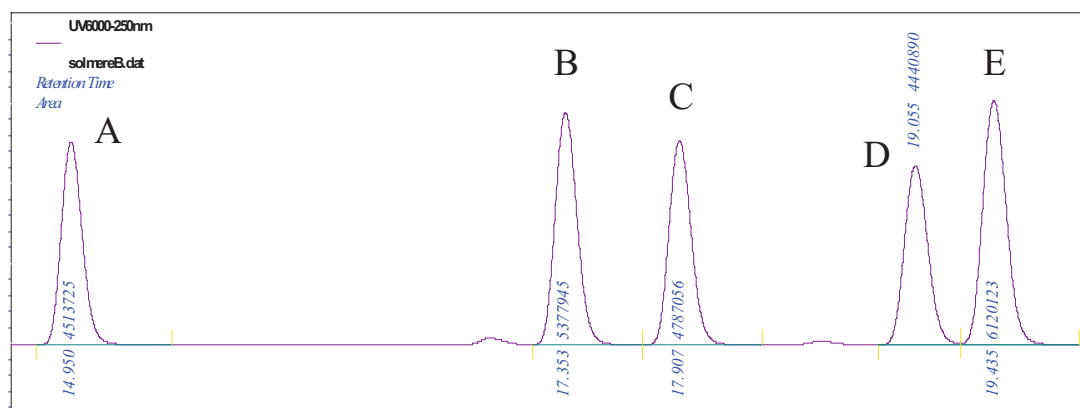


Fig. 1. Exemple de chromatogramme obtenu sur l'appareillage HPLC-DAD Thermofinnigan®, à 250 nm, pour une solution à 200 ng/mL dans le sang. A : bromazépam ; B : paroxétine ; C : lorazépam ; D : triazolam ; E : nordiazépam.

l'aide d'1 mL de méthanol, puis elle est équilibrée par 1 mL d'un mélange d'eau : acide formique (1000 : 1 ; v/v). L'échantillon, préparé comme décrit ci-dessus, est déposé en plusieurs fois sur la colonne. Après passage complet de l'échantillon, la colonne est lavée par un ml d'un mélange d'eau : méthanol (95 : 5 ; v/v). Enfin, l'échantillon est élué à deux reprises par 500 µL de méthanol dans un tube à hémolyse.

3.3 Flaconnage

L'éluat final est filtré à l'aide d'un filtre 0,45 µm dans un flacon à fond conique de 200 µL contenant 50 µL d'eau. L'évaporation sous flux d'air est poursuivie jusqu'à ce qu'il reste environ 50 µL de phase aqueuse. Il convient à ce stade d'ajouter un étalon interne (20 µL de prazépam à 10 µg/mL) qui assurera la validité de l'injection.

3.4 Analyse

Après ajout de 30 µL de méthanol de qualité HPLC et transfert dans un flacon pour HPLC, 20 µL de l'extrait sont analysés selon la méthode décrite au tableau II, en HPLC-UV.

Les rendements d'extraction, limites de détection et de quantification sont répertoriés dans le tableau IV.

Afin de vérifier la validité de la méthode et d'approcher le mieux possible les conditions rencontrées en toxicologie clinique et médico-légale, nous avons procédé à l'analyse d'échantillons réels et de sérums de contrôle (dont Medidrug® « BZD S » et « BTM S »). Tous les résultats ont conforté l'adéquation du protocole élaboré avec les échantillons toxicologiques de sang prélevé sur le vivant (le sang cadavérique n'ayant pas été testé).

4 Discussion

Les difficultés techniques rencontrées ont avant tout concerné la préparation de l'échantillon et l'extraction [7, 12, 13, 15]. En effet, la viscosité des échantillons

biologiques tels que le sang total provoque un colmatage au niveau de la phase adsorbante des cartouches. La dilution, qui est un compromis entre la diminution de la viscosité et l'augmentation du temps d'écoulement, ainsi que la nécessité habituelle de ne pas sécher l'adsorbant, montrent les limites des systèmes d'extraction multi-positions manuels. Les vannes de contrôle, de réglage délicat sur le dispositif mis à notre disposition, ont eu un impact négatif sur la reproductibilité des manipulations. Les problèmes de débits ou d'écoulement ne devraient plus se présenter après la mise en place d'un appareil automatique (ASPEC XL, GILSON® ou système apparenté).

Un des avantages des cartouches SPE Evolute ABN® (Argonaut) et des cartouches Oasis HLB® (Waters) est qu'elles ne subissent pas de dommage lors de l'assèchement de leur phase adsorbante.

Le sang employé pour effectuer la totalité des essais est un sang de transfusion sanguine dont les propriétés ne correspondent pas à celles d'un sang de cadavre, notamment en terme de viscosité. La question de vraisemblable variabilité d'écoulement reste en suspens étant donnée l'impossibilité de recourir à du sang de cadavre pour effectuer les essais.

Il convient de mentionner que ce protocole d'extraction (sur les mêmes cartouches d'étude) a été appliqué avec succès à trois autres médicaments également régulièrement retrouvés en toxicologie médico-légale. Ces molécules – le méprobamate, l'acide valproïque et la digoxine – ne présentant pas de propriétés d'absorption dans l'ultraviolet compte tenu de leur structure non aromatique, n'ont pas pu être analysées sur le Thermofinnigan Spectrasystem® ; cependant un appareillage chromatographique liquide couplé à un analyseur de spectrométrie de masse (un modèle Agilent 1100® a permis de confirmer une extraction appréciable de ces molécules).

Les techniques d'extraction en phase solide de première génération étaient le plus souvent limitées à une molécule (ou à une famille de molécules de structure chimique homogène), elles ne pouvaient donc pas être mises en oeuvre dans le cadre d'un criblage large [15]. La répétabilité inter-lots des colonnes SPE étant médiocre, les rendements obtenus étaient peu reproductibles. En raison de la nature des matrices traitées en toxicologie médico-légale, la capacité d'extraction des matrices à

Tableau III. Récapitulatif du protocole optimisé d'extraction en phase solide de 22 médicaments d'intérêt en toxicologie médico-légale, à partir d'un échantillon d'1 mL.

PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON	
HOMOGENÉISATION	au vortex, à l'aide de 4 mL d'eau
CENTRIFUGATION	à 5 000 rpm pendant 10 min
TRANSFERT	du surnageant dans 2 mL de tampon phosphate 100 mM, pH = 7
HOMOGENÉISATION	au vortex
EXTRACTION	
CONDITIONNEMENT	1 mL de méthanol
ÉQUILIBRATION	1 mL de mélange eau : acide formique (1000 : 1 ; v/v)
CHARGEMENT	dépôt de l'échantillon en plusieurs fois
LAVAGE	1 mL d'eau : méthanol (95 : 5 ; v/v)
ÉLUTION	2 × 500 µL de méthanol
FLACONNAGE	
FILTRATION	à l'aide d'une seringue (Terumo®) d'un filtre (GHP Acrodisc® 13 mm), 0,45 m
ÉVAPORATION	sous flux d'air jusqu'à 50 µL
TRANSFERT	de l'extrait dans un flacon HPLC
DILUTION	dans 30 µL de méthanol qualité HPLC et 20 µL d'étalon interne (prazépam)
ANALYSE	
INJECTION	20 µL en HPLC-DAD

silice étant limitée, cela entraînait un risque potentiel de saturation, et donc de sous-estimation de la concentration mesurée [3, 4, 6, 17].

L'apparition de nouvelles colonnes à support polymérique (tel que le styrène-divinylbenzène) et non plus à support silice (C₁₈) a remédié à tous ces inconvénients [15].

La colonne SPE Evolute ABN® est celle de choix pour l'extraction des divers toxiques médicamenteux étudiés dans le sang total. Il est vrai que le double mode d'action de cette colonne, tout comme celui de la colonne Oasis HLB® [15] permet d'extraire à la fois les molécules polaires et apolaires, et à physico-chimie très différente, et ce en une seule étape.

La vérification de l'adéquation du protocole optimisé aux dossiers de toxicologie médico-légale a permis de constater que trois molécules parmi la liste fixée au départ ne peuvent pas être détectées à certaines des concentrations recueillies dans la bibliographie : la buprénorphine, le flunitrazépam et le triazolam. Tous les autres principes actifs pourront être détectés pour des concentrations toxiques, certains pourront également être quantifiés. L'aspirine, le paracétamol, le diazépam, l'oxazépam et le nordiazépam pourront même être détectés et quantifiés à des concentrations thérapeutiques. Cette méthode ne peut cependant pas encore être mise en œuvre en cas de soumission chimique, les concentrations en jeu étant très inférieures aux limites de détection déterminées au cours de nos travaux [2].

Les LD et LQ (à améliorer par rapport aux valeurs rapportées dans la littérature) ont été calculées à partir de la méthode d'analyse HPLC-DAD uniquement mise au point de manière à ne pas obtenir de co-élution sur le tracé chromatographique afin de faciliter les calculs de quantification. Bien évidemment, en utilisant une méthode mieux développée et un appareillage

plus sensible (MS ou MS/MS), les LD et LQ se rapprocheraient des valeurs habituellement observées.

5 Conclusion

Tous les médicaments ont été extraits avec des rendements d'extraction compris entre 13 % pour l'aspirine et 75 % pour l'atracurium. L'aspirine étant retrouvée à des concentrations très élevées lors des intoxications, il n'a pas été jugé nécessaire d'améliorer son rendement d'extraction [17–19]. En définitive, l'extraction a pu être optimisée sur une seule cartouche alors qu'il avait été envisagé d'effectuer le travail sur plusieurs types de cartouches, compte tenu des disparités des propriétés physico-chimiques des molécules sélectionnées pour l'étude. Après vérification de la pertinence des limites de détection et de quantification au regard des concentrations en principes actifs habituellement mesurées lors des intoxications, nous constatons que trois médicaments parmi la liste fixée initialement ne peuvent pas être détectés aux concentrations thérapeutiques les plus faibles recueillies dans la bibliographie : le flunitrazépam, le triazolam et plus particulièrement la buprénorphine [17–19]. Ce problème peut éventuellement être pallié ultérieurement par l'utilisation d'un système de détection plus sensible tel que la chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse [14]. L'aspirine, le paracétamol, le diazépam, l'oxazépam et le nordiazépam sont détectés et quantifiés même aux concentrations thérapeutiques. Quant aux autres médicaments, ils sont détectés pour toute concentration toxique.

Cette étude aura mis en évidence les avantages d'une extraction en phase solide par rapport à une extraction liquide-

Tableau IV. Valeurs obtenues et compatibilité avec les valeurs rencontrées dans la littérature. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) dans le sang sont exprimées en $\mu\text{g/mL}$. Les rendements d'extraction (RE) sont donnés en %.

Molécule	RE (en %)	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration observée à dose thérapeutique ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration observée à dose toxique ; concentration mortelle (CM) ($\mu\text{g/mL}$)
Molécules non détectables pour certaines concentrations thérapeutiques					
Buprénorphine	27	0,216	0,72	0,0005 - 0,001	0,001 - 0,029
Flunitrazéпам	64	0,088	0,29	0,0025 - 0,015	0,02 - 0,05 ; CM > 0,1
Triazolam	70	<i>0,073</i>	<i>0,24</i>	0,004 - 0,017	0,007 - 0,08
Molécules détectables pour toute concentration toxique					
Alprazolam	70	0,076	0,25	0,005 - 0,01	0,12 ; CM > 0,4
Amitriptyline	54	0,13	0,43	0,01 - 0,25	0,6 ; CM > 2
Atracurium	75	0,1	0,33	0,7 - 1,2	10
Bromazéпам	58	0,098	0,33	0,1 - 0,2	0,13 - 0,64
Clorazéпate dipotassique	59	0,1	0,33	0,02 - 0,4	>5
Cyaméazine	41	0,144	0,48		1,8
Fluoxétine	27	0,1	0,33	0,04 - 0,07	1,3 - 6,8
Lorazéпам	70	0,078	0,26	0,05 - 0,24	1,2
Méthadone chlorhydrate	61	0,11	0,37	0,05 - 1	>1 ; CM > 2
Paroxétine	57	0,1	0,33	<0,1	1
Propranolol	47	0,095	0,32	0,05 - 0,15	1,5 - 2 ; CM > 4
Quinidine	20	0,26	0,87	0,2 - 0,6	>14 ; CM > 30
Zolpidem	72	0,079	0,26	0,06 - 0,12	0,9 - 3,29
Zopiclone	28	0,29	0,97	0,07 - 0,13	0,7 - 3,5
Molécules détectables et quantifiables pour toute concentration toxique et thérapeutique					
Acide acétylsalicylique	13	0,32	1,07	60	250
Diazéпам	46	0,09	0,3	0,1 - 2,5	3 - 5 ; CM > 5
Nordiazéпам	55	0,083	0,27	0,5 - 2	10
Oxazéпам	55	0,08	0,27	0,5 - 2	2,5
Paracétamol	29	0,33	1,11	10 - 50	30 - 300 ; CM > 160

En italique : valeurs minimales.

En gras : valeurs maximales.

liquide. L'un des grands intérêts établi lors d'une extraction en phase solide est l'utilisation de volumes de solvants plus faibles et la possibilité d'automatiser le protocole, une fois celui-ci optimisé, sur des appareillages spécifiques.

Au vu des résultats de nos travaux, il est raisonnable de penser que ce protocole pourra être appliqué à de nombreuses autres molécules, quelles que soient leurs propriétés physico-chimiques, et de compléter ainsi la liste des substances détectables lors d'un dépistage de routine en laboratoire. À terme, et à l'aide d'un système d'analyse plus sensible que la barrette de diodes (LC-MS par exemple) [14], tous les éléments de l'étude devraient être détectables et quantifiables ; les limites de détection beaucoup plus basses compatibles avec les

dossiers de soumission chimique ne pouvant être obtenues que par la spectrométrie de masse en tandem [2].

Références

- Demange C, Privet S, Georgeon S, Tréchet P, Mansuy C. Hospitalisations liées aux effets indésirables et autres intoxications médicamenteuses volontaires. *J Pharm Clin.* 1999; 18(3): 324-340.
- Duverneuill C, Alvarez JC, Mazancourt P. Soumission chimique, un bilan sur trois années. *Ann Toxicol Anal.* 2004; 16(3): 182-183.

- Saviuc P, Bedry R, Flesh F. Épidémiologie des intoxications médicamenteuses volontaires. *Méd Thérap*. 1991; 5: 45-48.
- Kintz P. Toxicologie et pharmacologie médico-légales. 1999. Elsevier, Paris. pp 57-69
- Yegles M, Mersch F, Wennig R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in hair by GC/MS. *Forensic Sci Int*. 1997; 84: 211-218.
- Gérard JL, Lehoux P, Lepag O. Intoxications graves par les cardiotropes. Conférence d'actualisation. Edition scientifique et médicale Elsevier SAS, et SFAR. 2002: 555-571.
- Estrela R, Salvadori MC, Suarez-Kurtz G. A rapid and sensitive method for simultaneous determination of lamivudine and zidovudine in human serum by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004; 18(10): 1147-1155.
- Chi-Kong L, Ting L, Kam-Ming A, Albert Yan-Wo C. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clin Chem*. 1997; 43: 312-325.
- Ensing K, Franke JP, Temmink A, Chen X-H, de Zeeuw RA. Application of Empore C-8 Extraction Disks for screening urine in systematic toxicological analysis. *J Forensic Sci*. 1992; 37(2): 460-466.
- Ginolhac S, Moulisma M, Lardet G, Vallon JJ. Développement d'une méthode de dépistage toxicologique large par HPLC/DAD : comparaison de trois méthodes d'extraction du sérum, extraction liquide-liquide et extractions solide-liquide (Bond Elut Certify[®] et OASIS[®] MCX). *Ann Toxicol Anal*. 2001; 13(2): 94-103.
- Juan H, Zhiling Z, Huande L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 820(1): 33-39.
- Martinez MA, Sanchez de la Torre C, Almarza E. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Anal Toxicol*. 2004 28(3): 174-180.
- Ramakrishna NV, Vishwottam KN, Wishu S, Koteswara M, Kumar SS. High-performance liquid chromatography method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 816(1-2): 209-214.
- Rittner M., Pragst F, Bork WR, Neumann J. Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2001; 115-124.
- Sadeg N, Dumontet M. Intérêt de l'extraction en phase solide en toxicologie : exemple d'extraction de 15 substances toxiques et médicamenteuses par 7 colonnes SPE différentes par un protocole unique. *Ann Toxicol Anal*. 2001; 13(1): 35-40
- Yin OQ, Lam SS, Chow MS. Simultaneous determination of paracetamol and dextropropoxyphene in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to clinical bioequivalence studies. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005; 19(6): 767-774.
- Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Foster City: Biomedical Publications, 7th edn., 2004.
- Bismuth C. Toxicologie clinique. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 2000.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. London: Pharmaceutical Press, 3rd edn., 2004.