

Article original / Original article

Dosage des opiacés, de la cocaïne, des dérivés amphétaminiques et de leurs métabolites dans le sang total par SPE-UPLC/MS/MS

Determination of opiates, cocaine, amphetamine derivatives, and their metabolites in whole blood by solid-phase extraction and UPLC/MS-MS

Camille Richeval^{1*}, Jean François Wiart¹, Luc Humbert¹, Anne Marie Orkil², Odile Legeleux², Michel Lhermitte^{1,3}

¹ Laboratoire Toxicologie et Génopathies, Centre de Biologie-Pathologie-Génétique, CHRU de Lille, 59000 Lille Cedex, France

² Waters SAS, BP 608, 78056 Saint-Quentin-en-Yvelines, France

³ UDSL, Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

Résumé – Objectif : Développer une méthode de préparation d'échantillons et de quantification simultanée des opiacés, des dérivés amphétaminiques, de la cocaïne et de leurs métabolites dans le sang total par SPE-UPLC/MS-MS. **Méthode :** 200 µL de sang total préalablement déprotéinisés sont extraits sur cartouches Oasis[®] MCX (SPE). Les échantillons sont analysés sur une colonne Acquity UPLC[™] BEH C₁₈, 1,7 µm (2,1 × 100 mm) éluée par un gradient d'acide formique 0,1 % et d'acétonitrile. Les composés sont détectés au moyen d'un spectromètre de masse en tandem en utilisant deux transitions (MRM). **Résultats :** La méthode développée est sensible et linéaire de 1 à 500 ng/mL pour l'ensemble des molécules avec une précision inter et intra-séries (CV < 20 %). Les limites de détection varient de 0,17 à 2,07 ng/mL selon les composés. **Conclusion :** Une méthode de préparation d'échantillons couplée à l'UPLC/MS-MS est développée pour identifier et quantifier simultanément trois familles de stupéfiants dans le sang total. Cette méthode rapide et sensible est une bonne alternative aux méthodes de chromatographie en phase gazeuse qui nécessitent une dérivation supplémentaire lors du prétraitement.

Mots clés : Dérivés amphétamines, opiacés, cocaïne, SPE, sang total, UPLC/MS-MS

Abstract – Objective: To develop a UPLC/MS-MS method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines. **Method:** After deproteinization, 200 µL of whole blood are extracted on Oasis[®] MCX cartridges. Samples are analyzed on an Acquity UPLC[™] column, BEH C₁₈, 1.7 µm (2.1 × 100 mm) eluted by a gradient of 0.1% formic acid and acetonitrile. Detection is achieved by tandem mass spectrometry operating in multiple reactions monitoring (MRM) mode. Two transitions are monitored for each compound. **Results:** The method is linear over the range 1–500 ng/mL with inter- and intra-assay precision (CV < 20%). The detection limit ranges from 0.17 to 2.07 ng/mL depending on the analyte. **Conclusion:** A SPE-UPLC/MS-MS method was developed to identify and quantify 3 classes of illicit drugs in whole blood.

Key words: Amphetamine derivatives, opiates, cocaine, SPE, whole blood, UPLC/MS-MS

Reçu le 2 septembre 2011, accepté le 4 novembre 2011

Publication en ligne le 12 décembre 2011

* Camille Richeval, camille.richeval@chru-lille.fr

1 Introduction

Les laboratoires de toxicologie sont amenés à réaliser, dans le cadre de leurs activités, la recherche et le dosage dans le sang total d'opiacés, de cocaïne et de dérivés amphétaminiques, ainsi que de leurs métabolites. Ces analyses peuvent être demandées dans un contexte hospitalier (intoxication aiguë, suivi des toxicomanes dans un centre méthadone), ou dans un cadre médico-légal. Souvent et notamment pour le suivi des patients inclus dans un centre méthadone, ou pour la recherche de ces substances dans le cadre de la conduite automobile, les dosages sanguins viennent confirmer ou infirmer le dépistage urinaire effectué par des méthodes immunologiques. La confirmation de ces dépistages est faite par des méthodes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

Dans le cadre de la conduite automobile, la loi n° 99-505 du 18 juin 1999, dite loi Gayssot, prévoyait de soumettre à un dépistage systématique des stupéfiants tout automobiliste impliqué dans un accident mortel. Le décret n° 2001-751 du 27 août 2001 mettait en place des tests de dépistage suivis, en cas de positivité, d'un prélèvement sanguin pour confirmer le résultat. Très rapidement la loi a été étendue aux délits routiers. En cas de positivité, mais aussi en cas de dépistage impossible (refus d'obtempérer, personne gravement blessée ou décédée) le législateur a prévu une confirmation ou une recherche dans le sang total de ces molécules par méthode chromatographique couplée à de la spectrométrie de masse. Des seuils de concentrations sanguines étaient fixés dans le décret. L'article L.235-1 a été ensuite modifié par la loi n° 2007-297 (JO n° 56 du 7 mars 2007). Il incrimine toute personne dont l'analyse sanguine établit qu'elle « *a fait usage de substances ou plantes classées comme stupéfiants* » sans aucune notion de seuils de concentrations. L'expert judiciaire doit donc restituer ses résultats en fonction de ses propres seuils analytiques. De même dans le contexte hospitalier, le dosage de ces substances donne des informations sur l'éventuelle toxicité de ces molécules pour le patient.

Bien avant la loi Gayssot, la Société française de toxicologie analytique (SFTA) recommandait des méthodes spécifiques pour l'identification et le dosage dans le sang total des dérivés amphétaminiques [1], des opiacés de la cocaïne et ses métabolites [2] et des cannabinoïdes [3]. Les méthodes décrites procèdent à une extraction liquide-liquide spécifique de 1 mL de sang total pour les deux premières et 2 mL pour les cannabinoïdes. Un volume minimum de 4 mL de sang total était donc nécessaire pour l'extraction des quatre classes de stupéfiants. Il s'en suivait une étape de dérivation (silylation, alkylation) adaptée à chaque classe, avant trois injections sur trois méthodes développées en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Ces méthodes consensus, toujours employées, sont très chronophages et demandent un volume de sang total important pas toujours disponible.

Depuis quelques années, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) s'est imposée dans les laboratoires et est devenue un outil incontournable. Le

couplage autorise l'analyse d'une plus grande gamme de molécules, notamment les plus polaires, sans devoir procéder à une étape de dérivation, qu'il est nécessaire d'adapter aux groupements fonctionnels des molécules à identifier. Il est maintenant réalisé avec des détecteurs de masse encore plus performants de type triple quadripôle, ou piège à ions, et permettent d'accéder à des seuils de détection très bas. Parmi les différents modes d'acquisition, le mode dit MRM (*Multi Reaction Monitoring*) permet l'identification de chaque molécule sur la base d'au moins deux transitions spécifiques. Elle est systématiquement complétée par une indexation sur le temps de rétention chromatographique de chaque molécule et l'utilisation d'homologues deutérés.

De nombreuses équipes ont publié d'autres alternatives pour la confirmation des dépistages urinaires ou pour le dosage sanguin de ces molécules. Certaines ont utilisé le couplage LC-MS-MS pour l'analyse spécifique des amphétamines dans différentes matrices biologiques [4], de la cocaïne et ses métabolites dans le sang total [5], des opiacés dans le sang total [6] des opiacés et la cocaïne et ses métabolites dans le plasma [7] ou encore les cannabinoïdes, les opiacés et les cocaïniques dans le sang total [8]. L'extraction en ligne a été publiée pour les amphétamines [9], les cocaïniques [10] ou simultanément pour les opiacés, les cocaïniques et les amphétaminiques [11].

Cette méthode a pour objectif d'allier une extraction unique de sang total avec une seule méthode chromatographique par UPLC/MS-MS et la quantification de trois familles de stupéfiants : les dérivés amphétaminiques (amphétamine, méthamphétamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, éphédrine), les opiacés (codéthyline, codéine, morphine, 6-monoacetyl-morphine, pholcodine) et les cocaïniques (cocaïne, benzoylecgonine, ecgonine méthylester, cocaéthylène).

2 Matériels et méthode

2.1 Matériels et réactifs

2.1.1 Réactifs

Le méthanol (Chromanorm HPLC grade), le dichlorométhane et l'acétonitrile de qualité LC/MS proviennent de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne), Carlo Erba (Val de Reuil, France) et Baker (Deventer, Pays-Bas), respectivement. L'eau désionisée, Versol[®], est obtenue chez Aguetant (Lyon, France). L'acide orthophosphorique 85 % (Reagent Grade, ACS, ISO) est acheté auprès de Scharlau (Barcelone, Espagne), l'ammoniaque 25 % auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le formate d'ammonium et l'acide 5-sulfosalicylique sont achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acide formique provient de chez Fluka Analytical (Allemagne). L'acide chlorhydrique 37 % est obtenu chez VWR (Briare, France).

Les substances suivantes : pholcodine, morphine, codéine, 6-mono acetyl-morphine et 6-mono acetyl-morphine D₃, cocaïne,

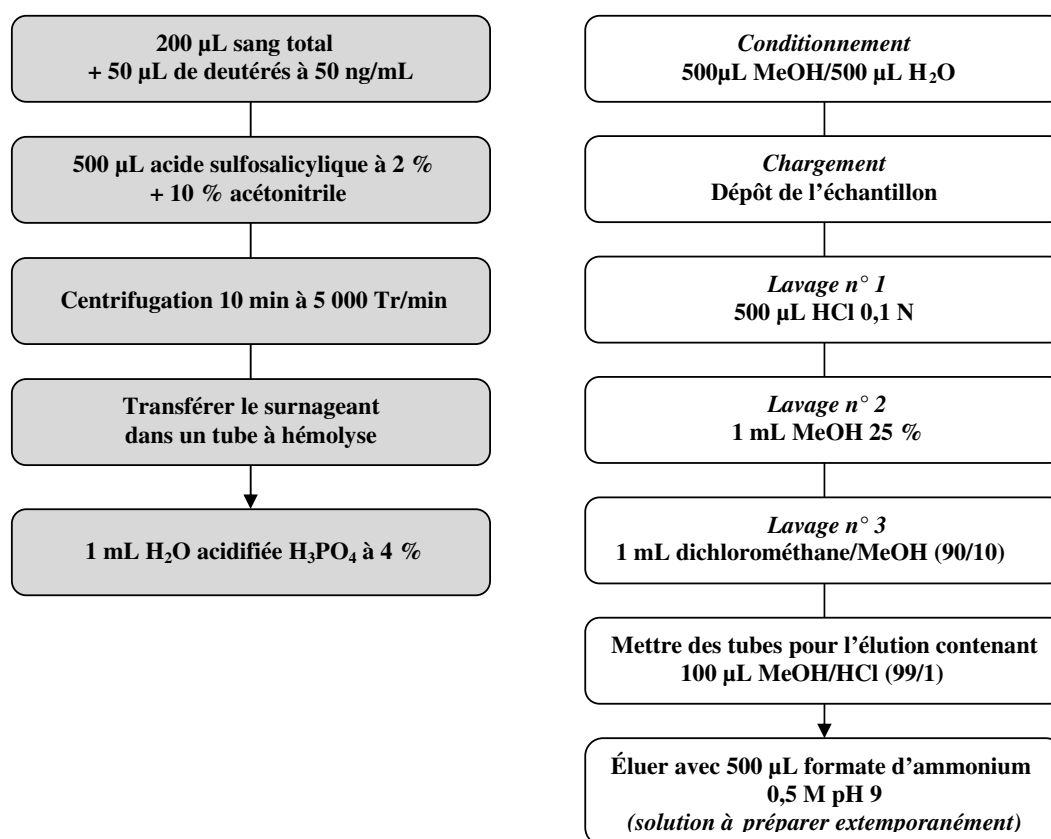


Fig. 1. Protocole d'extraction sur cartouche OASIS MCX[®].

ecgonine methyl-ester, cocaéthylène, éphédrine sont fournies par Lipomed (Mundolsheim, France). Les morphine D₃, codéine D₃, cocaïne D₃, ecgonine méthylester D₃, cocaéthylène D₃, benzoylecgonine D₃, éphédrine D₃ amphétamine et D₅, méthamphétamine et D₅, MDA et D₅, MDMA et D₅, MDEA et D₅, MBDB et D₅ sont achetés chez Cerilliant (Promochem, France).

Une poche de sang total « vierge », obtenue à l'EFS (Établissement Français du Sang, Lille, France), est conservée à -20 °C jusqu'à utilisation.

2.1.2 Matériels

Les cartouches Oasis[®]MCX, 1cc 30 mg et la station d'extraction 24 positions proviennent de Waters (Milford, États-Unis).

La séparation chromatographique est effectuée sur le système Acquity UPLC[™] (Waters) munie d'une colonne Acquity UPLC[™] BEH C₁₈, 1,7 µm (2,1 × 100 mm).

La détection est réalisée par un TQ Detector (Waters) Acquity[™], spectromètre de masse en tandem équipé d'une interface électrospray de type Z-spray.

2.2 Extraction

Une étape de déprotéinisation est préalablement effectuée avant l'extraction sur la cartouche. Deux cents µL de sang total, en présence de 50 µL de la solution d'étalons internes deutérés à 50 µg/mL, sont ajoutés à 500 µL d'une solution d'acide sulfosalicylique à 2 %/acétonitrile (90/10 V/V). Le mélange est homogénéisé pendant 1 minute puis centrifugé à 5 000 tr/min pendant 10 minutes. Au surnageant récupéré, est ajouté 1 mL d'une solution aqueuse d'acide orthophosphorique à 4 %.

Le mélange est ensuite déposé sur la cartouche Oasis[®] MCX pré conditionnée avec 500 µL de méthanol et 500 µL d'eau désionisée. La cartouche est ensuite lavée successivement avec 500 µL d'une solution d'HCl 0,1 N, 1 mL d'un mélange eau/méthanol (75/25 V/V) et 1 mL d'un mélange de dichlorométhane/méthanol (90/10 V/V). Après le dernier lavage, les cartouches sont séchées pendant 1 minute. L'élution des analyses est réalisée par 500 µL d'une solution de méthanol à 50 mM de formate d'ammonium pH 9.0 dans un tube contenant 100 µL du mélange méthanol/HCl (99/1). L'éluat est évaporé à sec sous azote à température ambiante. Le résidu est reconstitué dans 100 µL de phase mobile (acide formique 0,1 %/acétonitrile (97/3)) (figure 1).

Tableau I. Gradient UPLC™.

Temps (min)	Eau %	Acétonitrile %
0	97	3
1,0	97	3
4,0	92	8
6,0	80	20
7,0	40	60
7,5	97	3
10,0	97	3

2.3 Conditions analytiques

Quinze µL d'échantillon sont injectés sur la colonne éluée par un gradient acide formique 0,1 %/acétonitrile avec un débit de 0,6 mL/min, le temps d'analyse est de 10 min (tableau I).

L'ionisation est réalisée en mode electrospray positif (ES+). Les conditions optimales déterminées pour l'ensemble des molécules sont les suivantes : tension du capillaire : 1 kV ; température de la source : 150 °C ; débit de cône gaz : 50 L/h ; température et débit de gaz de désolvatation : 350 °C, 1 000 L/h.

Après optimisation des ions parents, des ions fils, des tensions de cône et des énergies de collision, l'acquisition se fait en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) suivant les transitions présentées dans le tableau II.

2.4 Validation de méthode

La linéarité a été évaluée en préparant six niveaux de concentrations pour l'ensemble des composés : 1 – 10 – 50 – 100 – 250 – 500 ng/mL. Les droites de calibration correspondent à une régression linéaire entre la surface de chaque composé sur l'étalon interne et la concentration des composés ajoutés dans le blanc sang total.

Les précisions intra- et interséries ainsi que la justesse de la méthode ont été testées en surchargeant le sang total à 2 concentrations (10 et 50 ng/mL).

Les rendements d'extraction sont établis à 50 ng/mL, en déterminant le rapport :

(surface du pic surchargé dans le sang total avant extraction / surface du pic ajouté après extraction) × 100.

La limite de détection, définie comme étant la réponse ou le signal obtenu, est égale à 3 fois le rapport signal/bruit de fond. Cette limite est évaluée en injectant des concentrations décroissantes de stupéfiant.

La suppression d'ions a été évaluée en extrayant 200 µL de sang total « vierge » selon le protocole décrit ci-dessus. Sur l'extrait sec sont ajoutés 200 µL de la solution méthanolique contenant l'ensemble des composés à 50 ng/mL puis 100 µL du mélange méthanol/HCl (99/1). Le tube est évaporé à sec sous azote à température ambiante. Le résidu est reconstitué dans 100 µL de phase mobile (acide formique 0,1 %/acétonitrile (97/3)).

3 Résultats

Dans les conditions chromatographiques décrites, il n'a pas été observé d'interférences entre les différents composés, les homologues deutérés et une éventuelle substance endogène présente dans le sang total.

La séparation chromatographique permet une répartition des 46 transitions MRM en 9 fenêtres d'acquisition en fonction du temps de rétention. Les paramètres de validation de la méthode sont présentés dans les tableaux II.

Pour l'ensemble des composés, la méthode est linéaire de 1 ng/mL à 500 ng/mL. Les rendements d'extraction sont compris entre 20 % et 70 % (tableau III).

En ce qui concerne la précision intra- et interséries et la justesse de la méthode, les coefficients de variation (%) et les biais ou justesse intermédiaire (%) aux deux concentrations (10 et 50 ng/mL), sont inférieurs à 20% (Tableau III).

Un exemple d'échantillon surchargé à 10 ng/mL pour l'ensemble des stupéfiants est présenté sur les figures 2–4.

4 Discussion

Les cartouches OASIS® MCX sont composées d'une phase mixte qui autorise différents types de lavages spécifiques en interagissant sélectivement sur l'un des deux modes de rétention de la phase stationnaire. Les trois lavages que nous réalisons permettent une meilleure élimination de xénobiotiques non recherchés et de nombreux composés endogènes qui participent au bruit de fond et entraînent des phénomènes de suppression/majoration d'ions. Ceci participe pour beaucoup à la très bonne sensibilité de la méthode, malgré quelques rendements d'extractions un peu faibles et une suppression d'ions importante pour les composés les moins retenus tels que l'ecgonine méthylester et la pholcodine. Avec le protocole développé, les limites de détection obtenues sont très satisfaisantes : elles sont comprises entre 0,17 et 2,07 ng/mL. La détection par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM contribue grandement à l'amélioration de notre limite de détection grâce à sa spécificité. La technologie UPLC™ permet grâce à une granulométrie beaucoup plus fine de la phase stationnaire (< 2 µm) des pics beaucoup plus fins que la chromatographie liquide classique. Les pics de largeur réduite ont de ce fait, pour une même surface, une hauteur beaucoup plus grande faisant ressortir le signal de façon plus intense du bruit de fond améliorant ainsi nos rapports signal/bruit. La colonne utilisée possède un diamètre interne de 2 mm mais le débit de la phase mobile peut être augmenté de 0,2 mL/min (débit recommandé pour ce diamètre de colonne) à 0,6 mL/min sans altérer le pouvoir résolutif de la colonne. Ceci engendre bien sûr des pressions beaucoup plus importantes, de l'ordre de 9 000 psi.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été très longtemps utilisée au laboratoire pour la confirmation ou la détection de la présence dans le sang total de dérivés amphétaminiques, des opiacés et

Tableau II. Temps de rétention et transitions MRM des différentes substances opiacées, amphétaminiques, et cocaïniques.

Composés	Temps de rétention	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de cône (V)	Énergie de collision (eV)
Pholcodine	0,68	399,2	114,0	35	30
			70,3	35	80
Morphine	1,02	286,1	286,1	35	15
			165,1	35	40
			D ₃ 289,1	289,1	35
Codéine	3,06	300,1	300,1	35	15
			165,3	35	44
			D ₃ 303,1	303,1	35
6-MAM	4,14	328,1	328,1	35	15
			164,9	35	35
			D ₃ 331,1	331,1	35
Codéthylène	5,03	314,1	314,1	35	15
			165,1	35	47
Ecgonine methylester	0,54	200,1	182,0	30	18
			82,2	30	27
			D ₃ 203,1	185,2	30
Benzoylécgonine	5,50	290,1	168,0	30	18
			105,0	30	33
			D ₃ 293,1	171,1	35
Cocaïne	6,48	304,2	182,0	25	18
			81,9	25	30
			D ₃ 307,2	185,2	30
Cocaéthylène	6,95	318,1	196,1	30	18
			82,1	30	35
			D ₃ 321,3	199,3	30
Ephédrine	2,38	148,0	91,0	35	28
			115,0	35	23
			D ₃ 151,2	115,0	40
Amphétamine	3,10	136,0	119,1	15	10
			91,2	15	23
			D ₅ 141,0	124,1	15
Methamphétamine	3,66	150,0	91,0	20	12
			119,0	20	12
			D ₅ 155,3	92,1	20
MDA	3,50	180,0	163,2	20	10
			105,2	20	22
			D ₅ 185,0	168,1	20
MDMA	3,97	194,0	163,0	20	14
			105,0	20	25
			D ₅ 199,1	165,0	25
MDEA	4,88	208,1	163,0	20	14
			135,0	20	25
			D ₅ 213,1	163,0	20
MBDB	5,50	208,1	135,1	20	19
			77,1	20	15
			D ₅ 213,1	136,1	20

des cocaïniques. Elle nécessitait pour les dérivés amphétaminiques d'extraire 1 mL de sang total dérivé ensuite par du HFBA. L'analyse par GC-MS se faisait en environ

20 minutes [1]. Pour les opiacés et les cocaïniques, 1 mL de sang était extrait et dérivé par du BSFTA+1 % TMCS. L'analyse par GC-MS se faisait en environ 25 minutes [2].

Tableau III. Paramètres de validation : précision intra et interséries, justesse, rendement d'extraction, limite de détection et effet matrice.

Composés	Précision (CV % n = 5)				Justesse (biais % n = 5)		Rendement d'extraction (n = 6)	LOD ng/mL	Effet matrice
	Intra		Inter		10 ng/mL	50 ng/mL			
	10 ng/mL	50 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL					
Pholcodine	10 %	8 %	9 %	4 %	9 %	12 %	72 %	2,07	76 %
Morphine	7 %	6 %	15 %	4 %	6 %	-2 %	20 %	0,52	25 %
Codéine	9 %	8 %	9 %	1 %	-5 %	3 %	63 %	0,47	-2 %
6-MAM	5 %	7 %	13 %	5 %	8 %	11 %	23 %	0,6	2 %
Codéthyline	9 %	4 %	11 %	8 %	5 %	6 %	58 %	1,07	-4 %
Ecgonine methylester	10 %	10 %	15 %	7 %	4 %	8 %	32 %	0,38	66 %
Benzoylecgonine	3 %	6 %	11 %	5 %	7 %	-1 %	56 %	0,46	-13 %
Cocaïne	3 %	2 %	11 %	4 %	-6 %	0 %	57 %	0,3	-4 %
Cocaéthylène	8 %	7 %	15 %	5 %	-2 %	-3 %	55 %	0,17	0 %
Ephédrine	3 %	3 %	9 %	4 %	-3 %	1 %	58 %	0,52	12 %
Amphétamine	8 %	6 %	11 %	4 %	5 %	8 %	32 %	0,6	-13 %
Méthamphétamine	7 %	4 %	5 %	7 %	10 %	7 %	25 %	0,46	-6 %
MDA	11 %	3 %	14 %	3 %	9 %	7 %	50 %	0,3	-4 %
MDMA	7 %	3 %	10 %	3 %	4 %	2 %	42 %	0,2	-5 %
MDEA	6 %	1 %	16 %	3 %	-9 %	3 %	43 %	0,27	-6 %
MBDB	2 %	1 %	11 %	5 %	-6 %	1 %	44 %	0,21	-7 %

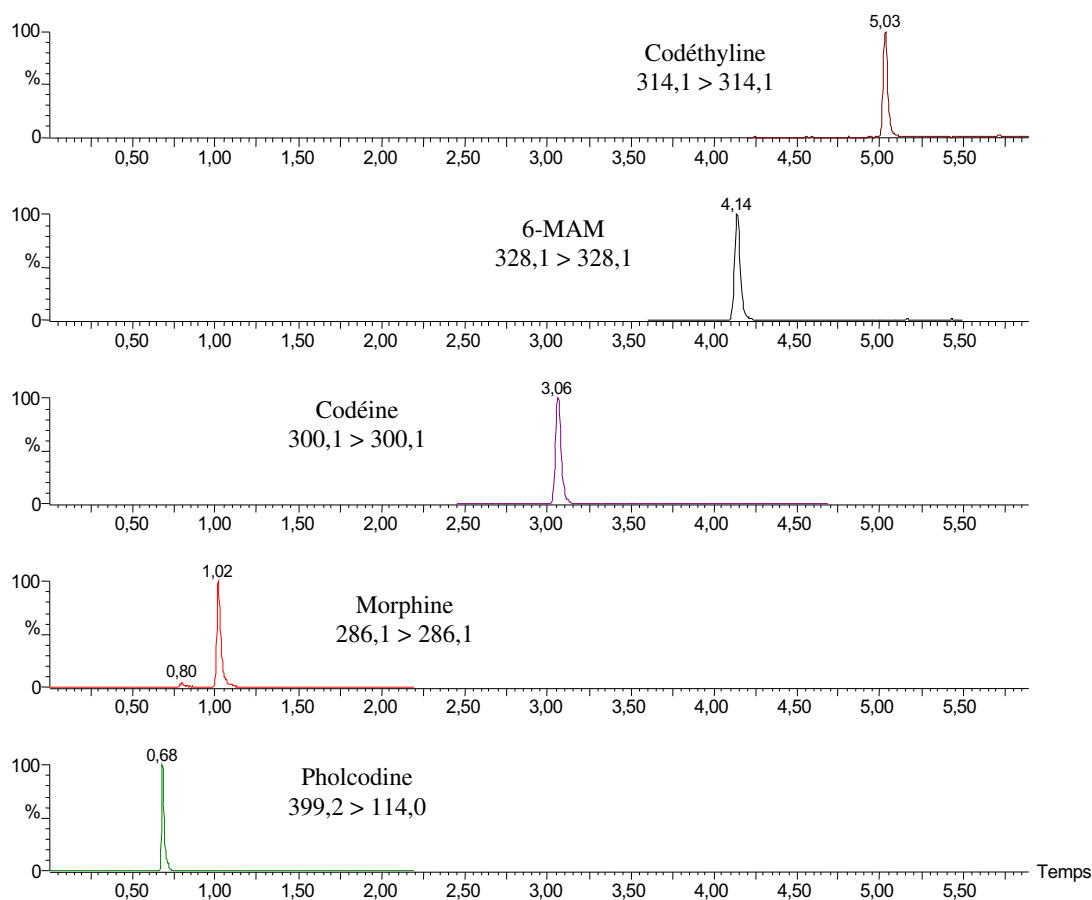


Fig. 2. Chromatogrammes d'un échantillon sanguin surchargé à 10 ng/mL en opiacés.

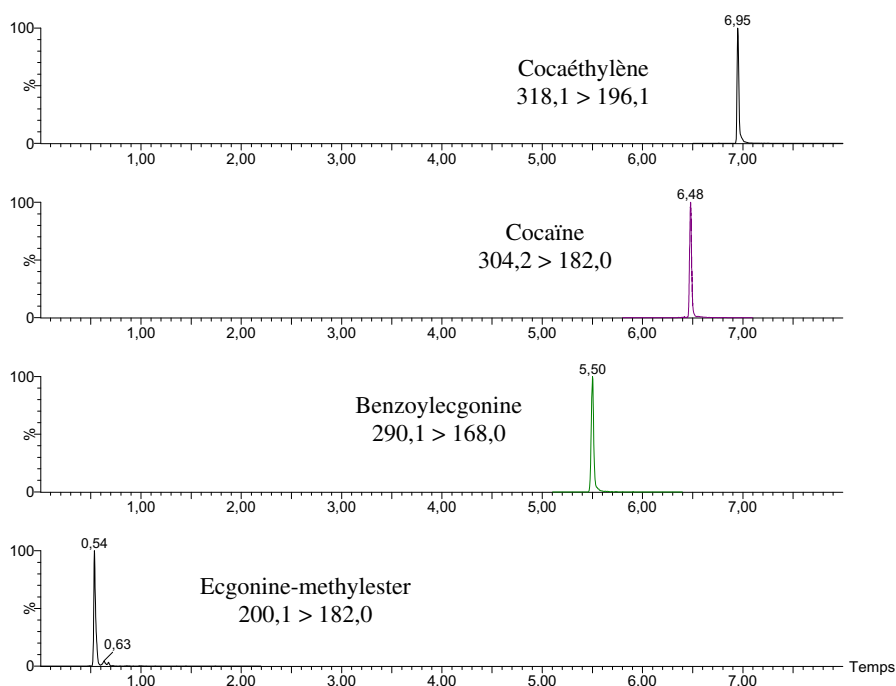


Fig. 3. Chromatogrammes d'un échantillon sanguin surchargé à 10 ng/mL en cocaïniques.

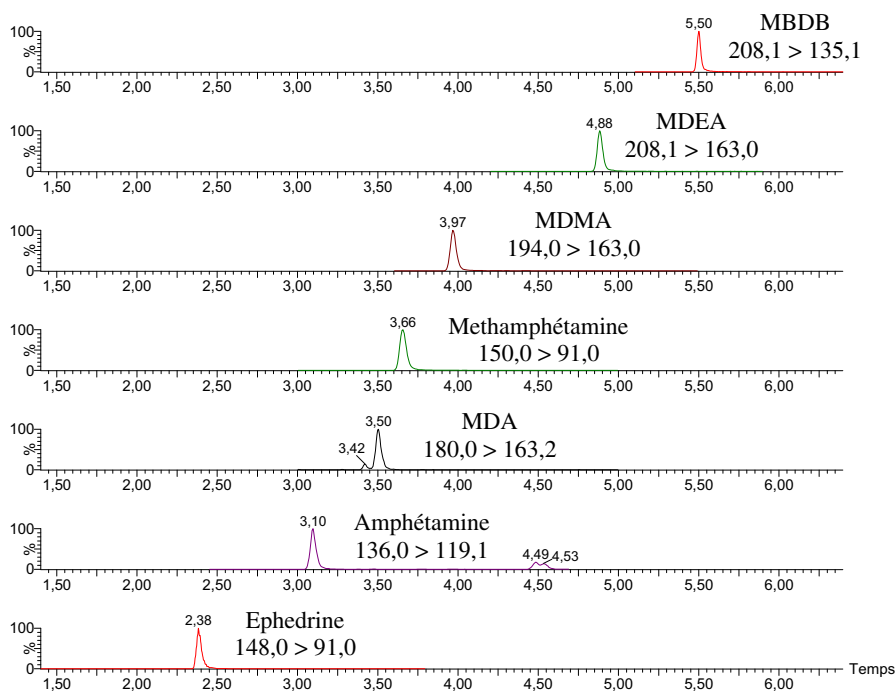


Fig. 4. Chromatogrammes d'un échantillon sanguin surchargé à 10 ng/mL en amphétaminiques.

La confirmation ou la détection de ces composés nécessitait, en tenant compte de la préparation de l'échantillon et des analyses chromatographiques, une durée d'analyse d'environ 4 heures. La méthode que nous avons développée ne nécessite

que 0,2 mL de sang total au lieu des 2 mL précédemment, préservant un volume important d'échantillon précieux. La préparation de l'échantillon se résume à une simple extraction sur une cartouche SPE MCX qui est réalisée, prétraitement

inclus, en 45 minutes. Le temps chromatographique, grâce à l'UPLC™, est réduit à seulement 10 minutes au lieu de 45 minutes auparavant par GC-MS. Ce temps d'analyse très court réduit d'environ 35 minutes chaque analyse. Ce temps est très appréciable si plusieurs déterminations sont à faire en série.

Depuis une dizaine d'années, le couplage LC-MS-MS s'est imposé comme une technique incontournable en toxicologie. De nombreuses publications décrivent le dosage d'une seule classe de stupéfiants [4–6,8–10], voire deux [7]. Lacroix et coll. décrivent une technique de dosage des opiacés, des cocaïniques et des dérivés amphétaminiques précédée d'une préparation en ligne mais n'utilisent qu'une seule transition MRM pour la caractérisation des molécules [11].

5 Conclusion

Cette méthode permet de doser simultanément les opiacés, les amphétaminiques et les cocaïniques dans le sang total. Les sensibilités et spécificités obtenues sont satisfaisantes pour ses applications hospitalières et médico-légales. Le couplage de la préparation d'échantillon par une extraction en phase solide et de la détection par UPLC-MS/MS permet de réduire considérablement la quantité de prélèvement initial, de solvants mais également le temps d'analyse. Cette méthode peut être applicable à d'autres matrices comme le sérum ou l'urine ou à d'autres molécules telles que buprénorphine, méthadone et de nouvelles molécules classées comme stupéfiant comme par exemple la méphédrone.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

1. Marquet P, Lachâtre G, Kintz P, Pépin G, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage des principales drogues amphétaminiques dans le sang total par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). *Toxicorama*. 1996; 2(7): 23–28.
2. Gaillard Y, Pépin G, Marquet P, Kintz P, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage de la benzoylecgonine, cocaïne, methylecgonine-ester, codéine, morphine. *Toxicorama*. 1996; 2(8): 17–22.
3. Kintz P, Cirimele V, Pépin G, Marquet P, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage des cannabinoïdes dans le sang total. *Toxicorama*. 1996; 2(8): 13–28.
4. Chèze M, Deveaux M, Martin C, Lhermitte M, Pépin G. Simultaneous analysis of six amphetamines and analogues in hair, blood and urine by LC-ESI-MS/MS Application to the determination of MDMA after low Ecstasy intake. *Forensic Sci Int*. 2007; 170: 100–104.
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 B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 852: 338–344.
6. Dienes-Nagy A, Rivier L, Giroud C, Augsburger M, Mangin P. Method for quantification of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine glucuronide and 6-monoacetylmorphine in human blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for routine analysis in forensic toxicology. *J Chromatogr A*. 1999; 854: 109–118.
7. Rook EJ, Hillebrand M, Rosing H. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 824(1-2): 213–221.
8. Cailleux A, Le Bouil A, Turcant A, Diquet B. Stupéfiants, circulation routière et LC-MS/MS. *Ann Toxicol Anal*. 2005; 17(1): 27–32.
9. Fernández Mdel M, Wille SM, Samyn N, Wood M, López-Rivadulla M, De Boeck G. High-throughput analysis of amphetamines in blood and urine with online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2009; 33(9): 578–587.
10. Jagerdeo E, Montgomery MA, LeBeau M, Sibum M. An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008; 874: 15–20.
11. Lacroix C, Sausseureau E, Bodin G, Goullé JP. Quantification des opiacés, cocaïniques et amphétaminiques par chromatographie liquide haute performance/spectrométrie de masse en tandem après préparation en ligne de l'échantillon. *Ann Toxicol Anal*. 2008; 20(1): 25–38.