



Techniques d'analyse des drogues usuelles d'abus dans les cheveux.

Christian Staub

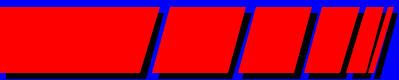


***Club Lyonnais de
Chromatographie Liquide
19 septembre 2002***



Dosage des drogues usuelles d'abus dans les cheveux

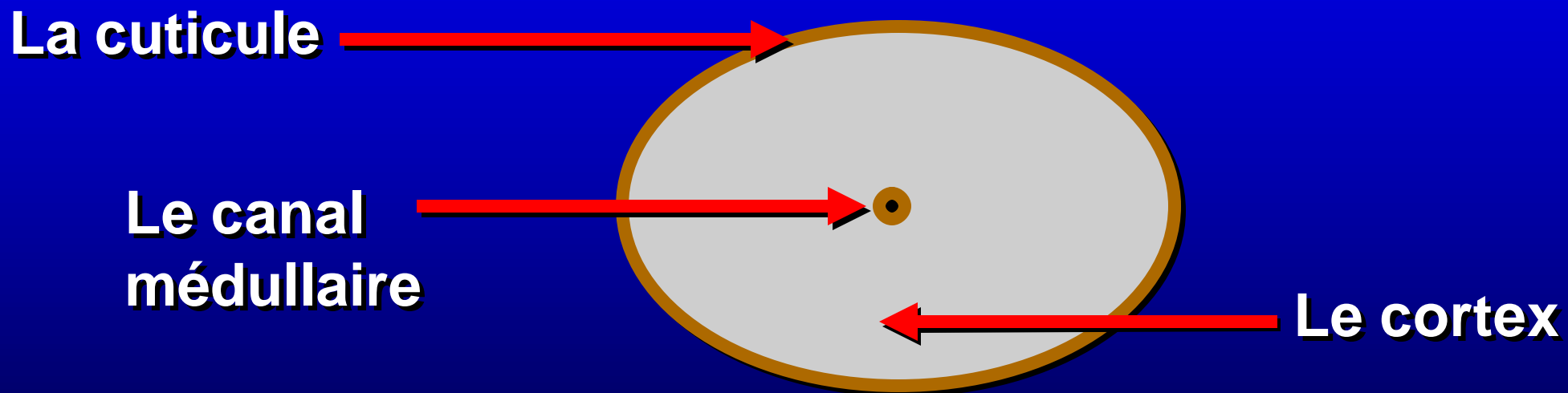
- 1. Structure des cheveux et incorporation des drogues**
- 2. Procédures de dosage**
- 3. Validation de la méthode utilisée à l'IUML Genève**
- 4. Valeurs de référence**
- 5. Quelques cas tirés de la pratique quotidienne**
- 6. Cannabis et techniques alternatives**
- 7. Conclusions**



I. Le cheveu : structure et incorporation des drogues.

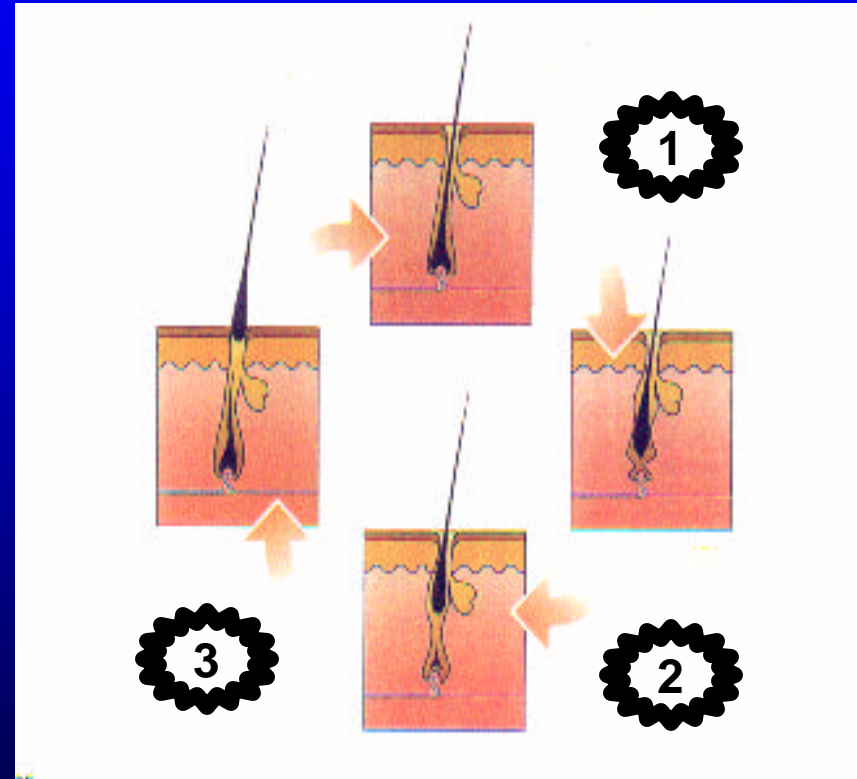


Coupe transversale d'un cheveu.

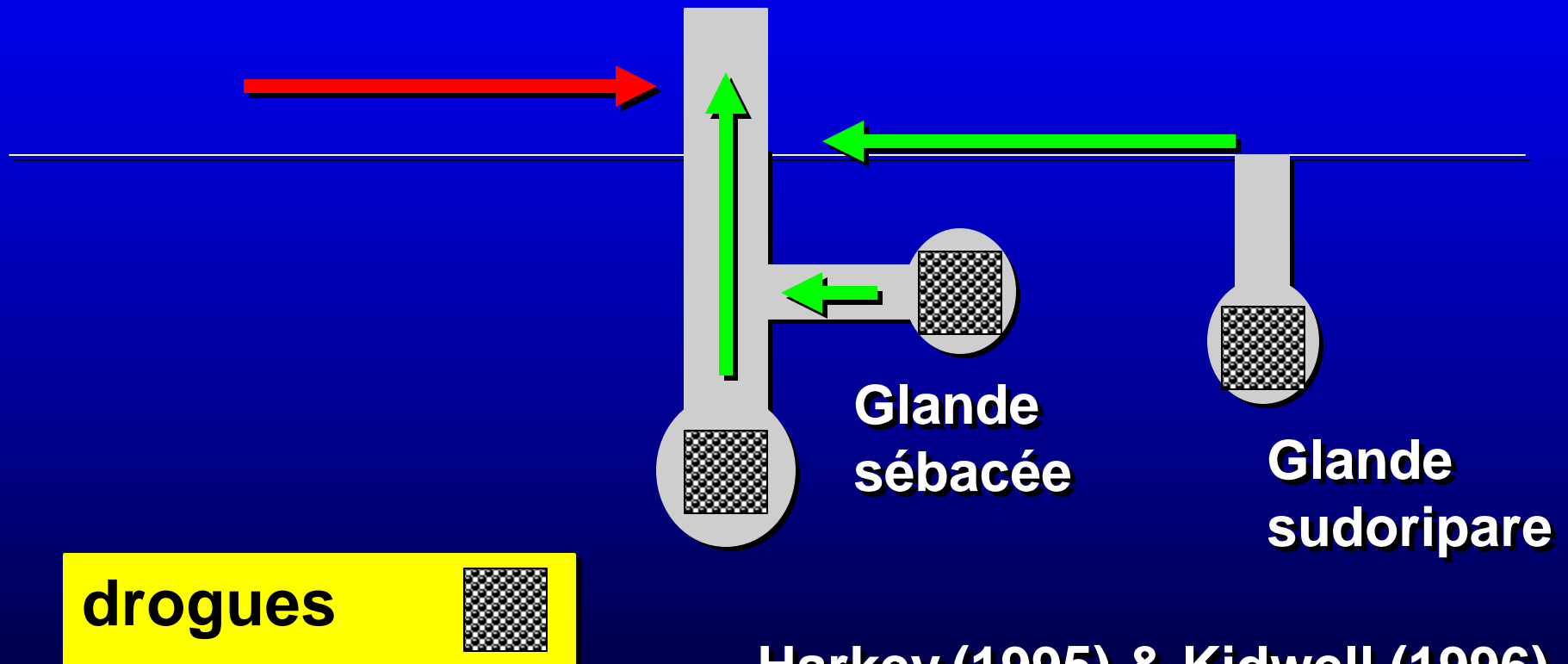


Cycle de développement en trois phases :

- 1) Anagène (85-90%)
durée : 2 à 6 années**
- 2) Catagène (1%)
durée : 2 semaines**
- 3) Télogène (9-14%)
durée : 2 à 4 mois**

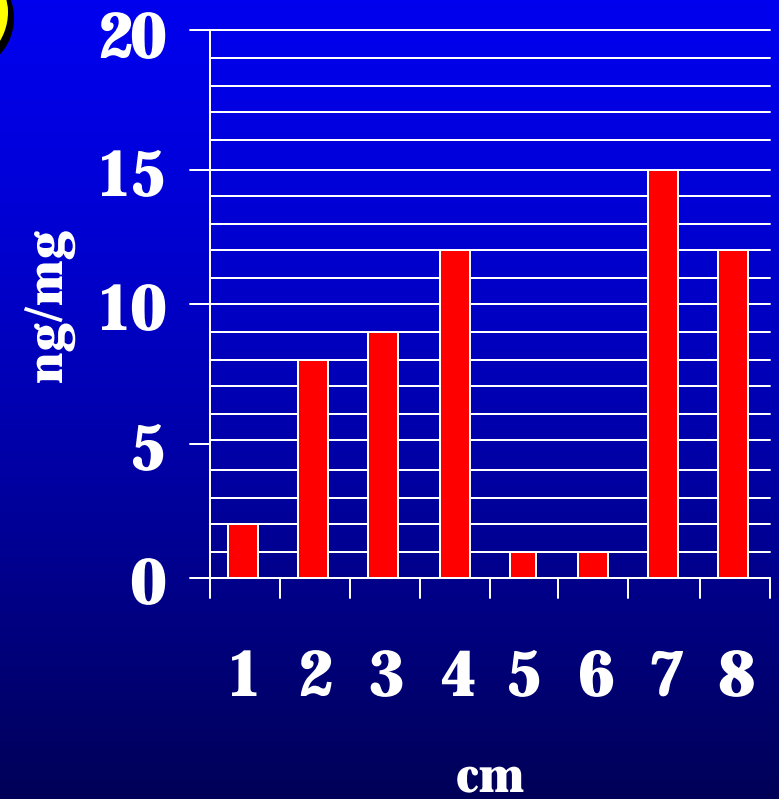
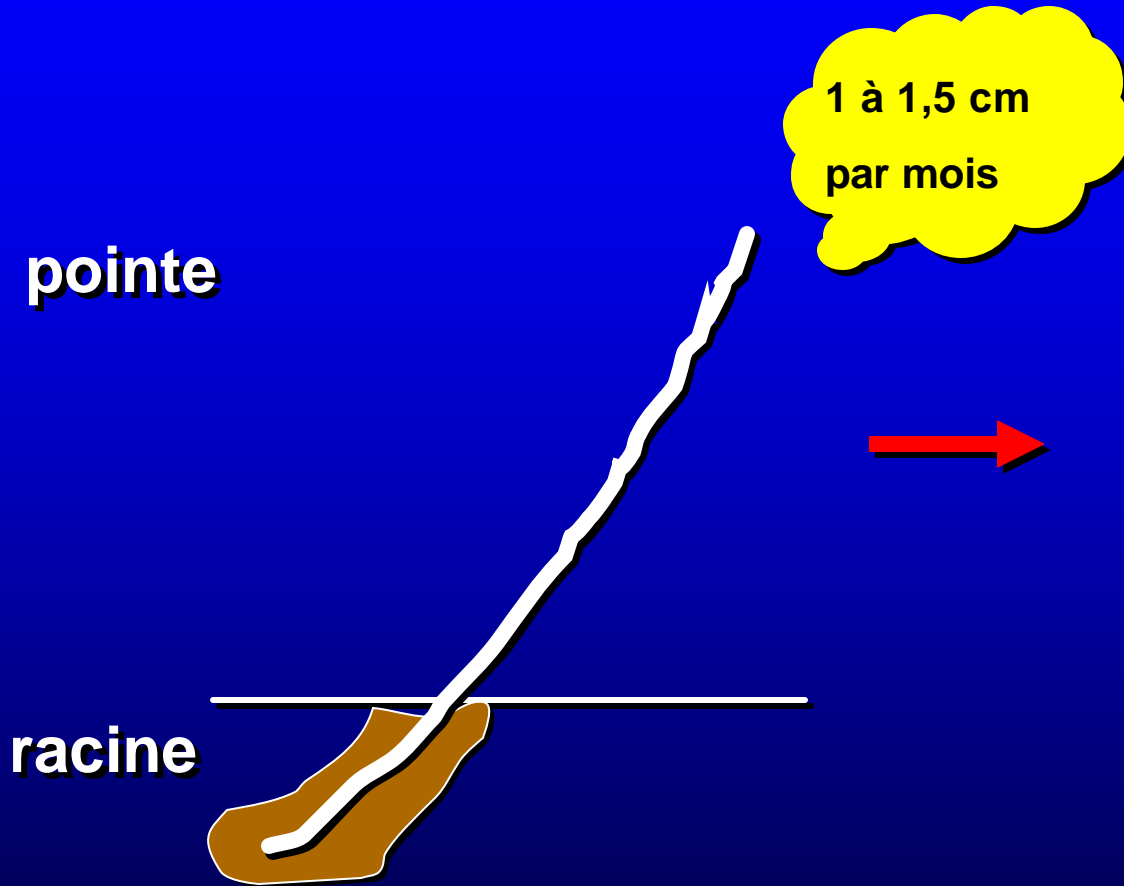


Modèle proposé pour l'incorporation des drogues dans les cheveux.



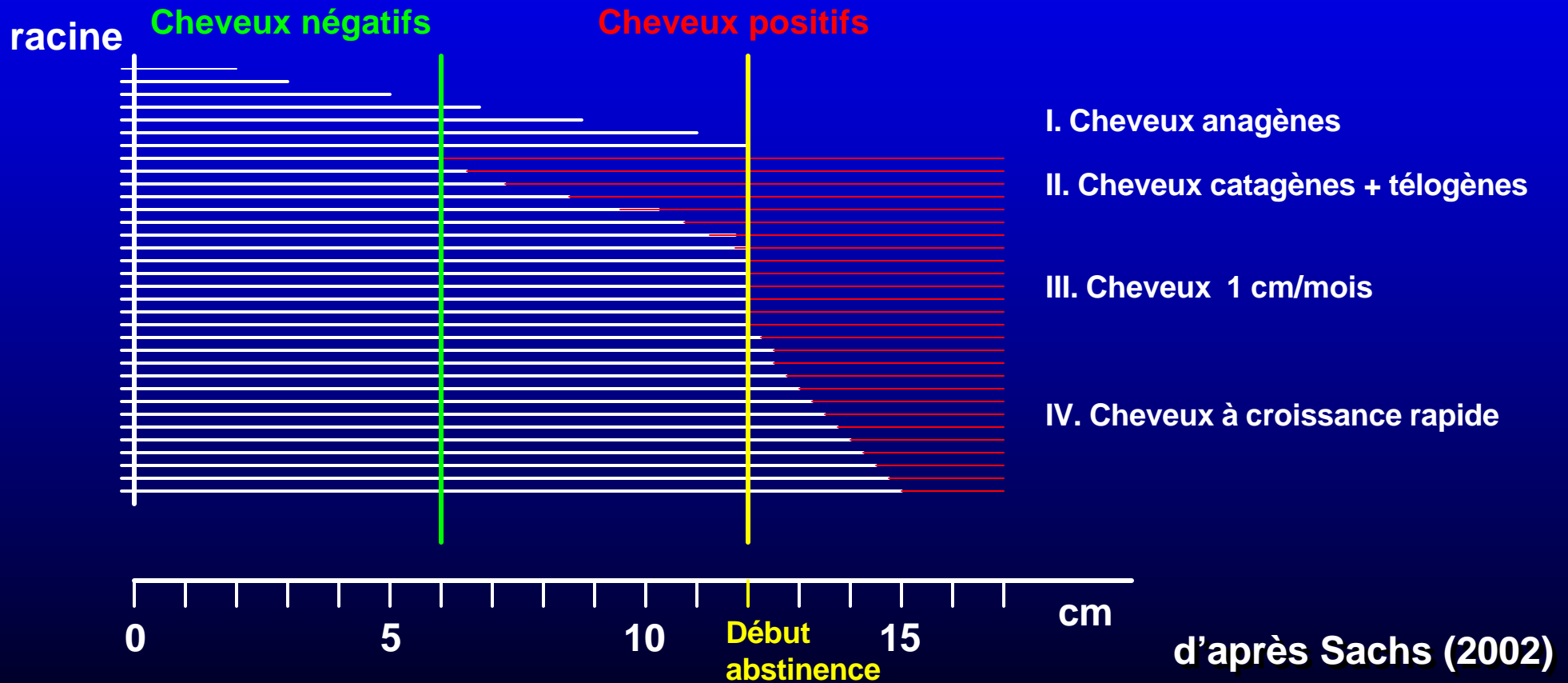
Harkey (1995) & Kidwell (1996)

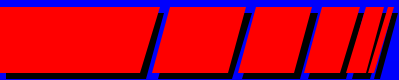
Principe de l'analyse des cheveux.



présent  passé

Transition théorique d'une drogue dans des cheveux collectés 12 mois après le début d'une période d'abstinence.





II. Procédures de dosage des drogues usuelles d'abus dans les cheveux.



Les étapes d'une analyse de cheveux :

a) lavage



b) extraction



c) clean-up



d) chromatographie

Procédure (I): Moeller et al. (1993)

Analytes: MAM, morphine, codéine, dihydrocodéine, méthadone, cocaïne, benzoylecgonine, amphétamine,

Lavage: eau et acétone

Homogénéisation: broyeur à boulet

Extraction: tampon acétate + B-glucuronidase/arylsulfatase

90 min à 40 °C

Clean-up: SPE (C18)

Chromatographie: PFPA/PFPOH, GC-MS, EI (SIM)

Procédure (II): Kintz and Mangin (1995)

Analytes: MAM, morphine, codéine, dihydrocodéine, méthadone, cocaïne, benzoylecgonine,

Lavage: 2x dichlorométhane

Homogénéisation: broyeur à boulet

Extraction: HCl 0.1 M, 5h à 50 °C

Clean-up: LLE

Chromatographie: BSTFA / 1% TMS, GC-MS, EI (SIM)

Procédure (III): Kauert and Röhrich (1996)

Analytes: MAM, morphine, codéine, dihydrocodéine, méthadone, cocaïne, amphétamine, MDA, MDMA, MDEA

Lavage: eau, acétone et éther de pétrole

Homogénéisation: cheveux coupés en petits fragments

Extraction: méthanol et bain à ultrasons, 5 h à 50 °C

Clean-up: non

Chromatographie: anhydride propionique, GC-MS, EI (SIM)

Procédure (IV) : IUML Genève (1997)

Analytes: MAM, morphine, codéine, méthadone, cocaïne, MDMA et MDEA

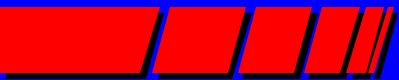
Lavage: dichlorométhane, eau, méthanol

Homogénéisation: broyeur à boulet

Extraction: HCl 0.01 M, 12 h à 60 °C

Clean-up: SPE (Isolut HCX, robot Aspec)

Chromatographie: anhydride propionique, GC-MS, EI (SIM)



III. Validation (caractérisation) de la méthode.



Linéarité (domaine : 5 - 1000 ng).

**Pour les sept composés et pour 50 mg
de cheveux :**

$$R^2 > 0.99$$



Répétabilité évaluée à partir de cheveux « fortifiés » .

n = 6	Teneur haute	CV %	Teneur basse	CV %
codéine	31.9	7.0	4.2	7.5
6-MAM	26.6	2.4	3.5	7.9
morphine	32.9	3.8	3.5	6.4
cocaïne	41.1	6.2	5.5	11.6
méthadone	31.9	6.8	3.5	9.7
MDMA	27.7	5.0	7.9	6.1
MDE	37.1	5.2	10.9	8.0



Rendement clean-up :

(1000 ng dans HCl 0.01 M, n = 6)

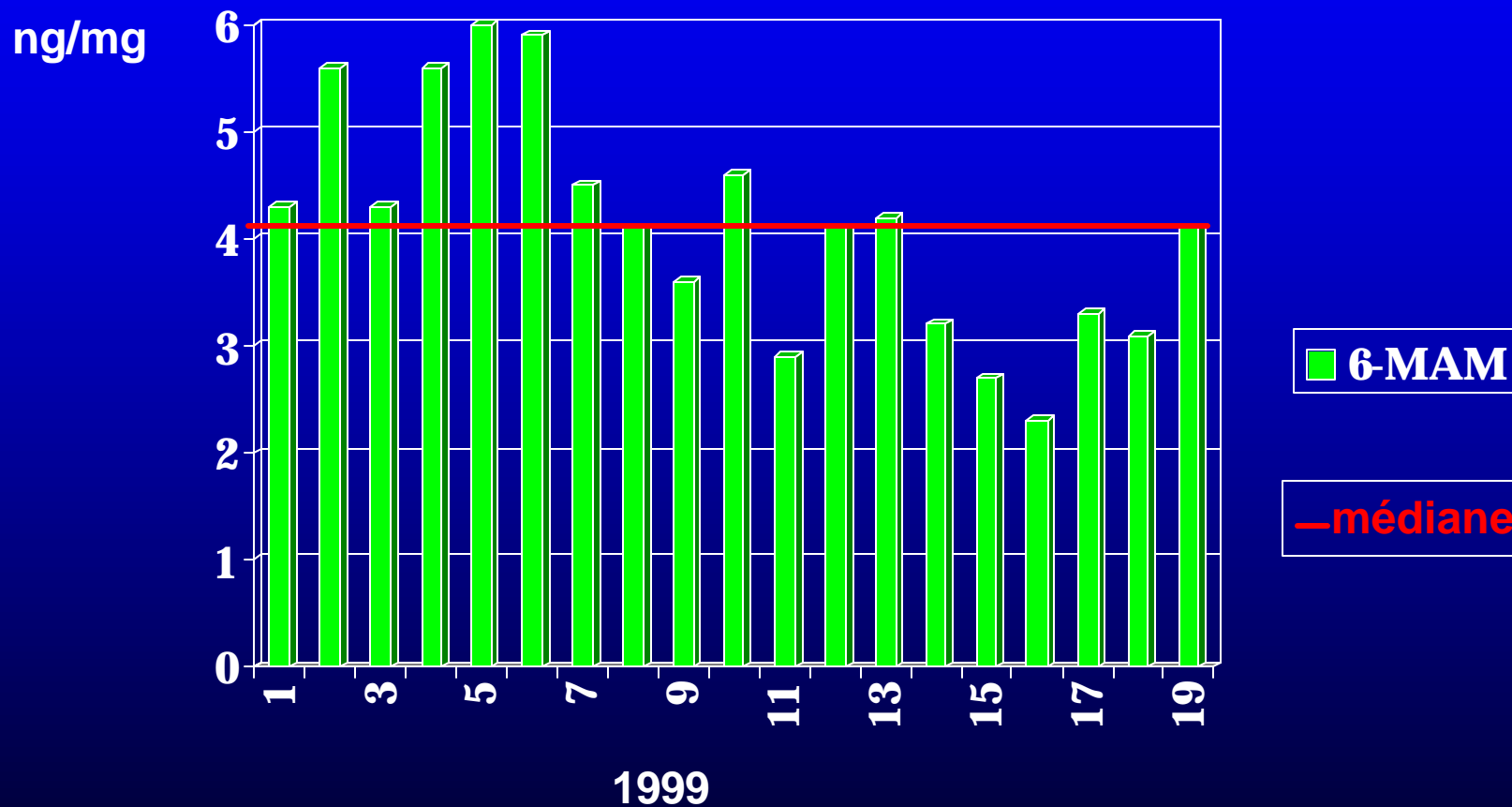
	%	CV(%)
codéine	95	6.0
6-MAM	80	3.1
morphine	103	5.4
cocaïne	79	7.3
méthadone	94	7.9
MDMA	81	5.6
MDE	71	6.6



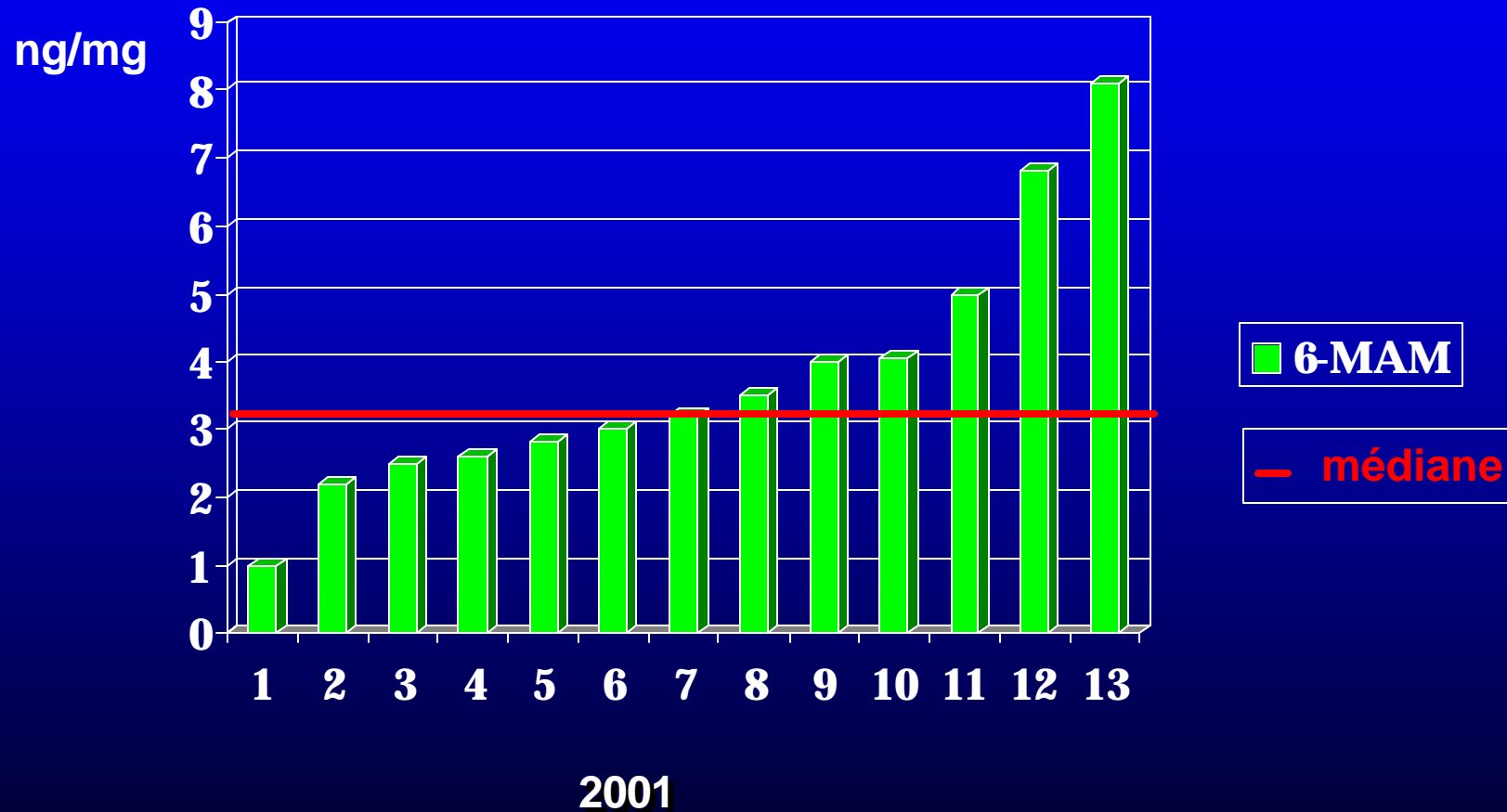
Limites de quantification (LOQ)

	Ion	LOQ (ng/mg)
codéine	355	0.1
6-MAM	383	0.1
morphine	397	0.1
cocaïne	303	0.2
méthadone	294	0.2
MDMA	114	0.1
MDE	162	0.1

Contrôles de qualité internes (CQI)



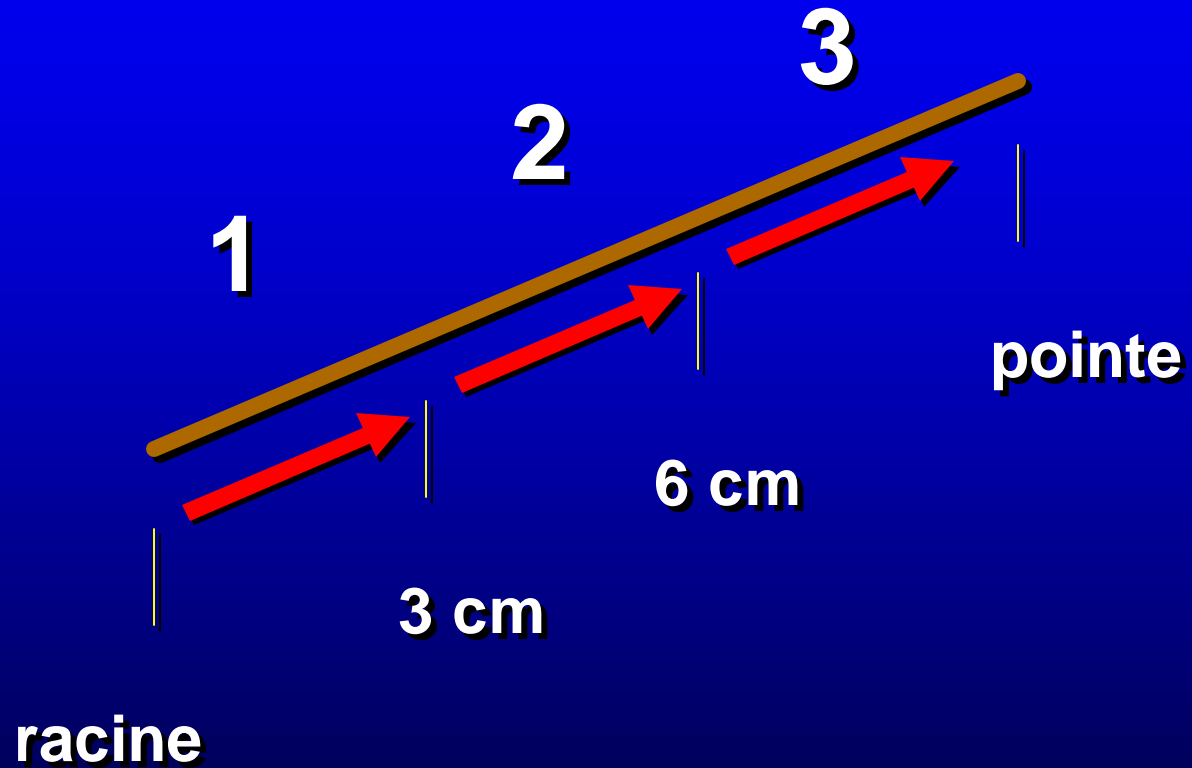
Contrôles de qualité externes (CQE)



IV. Valeurs de référence.



Echantillonnage





Paramètres statistiques (ng/mg)

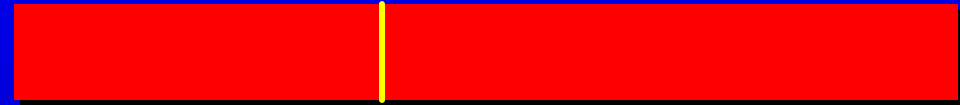
- 1. LOQ**
- 2. Moyenne**
- 3. Percentile 25**
- 4. Médiane**
- 5. Percentile 75**
- 6. Maximum**

Concentrations de 6-MAM (ng/mg) dans les cheveux de consommateurs d'héroïne.

	Drogues (n = 112)	Héroïne médicale (n = 113)	Héroïne illégale (n = 73)
1. LOQ	0.1	0.1	0.1
2. Moyenne	3.5	3.0	7.2
3. Percentile 25	0.4	1.4	1.3
4. Médiane	1.5	2.1	3.3
5. Percentile 75	3.2	3.8	6.3
6. Maximum	45	37	65

Paramètres statistiques pour la 6-MAM dans les cheveux de consommateurs d'héroïne.

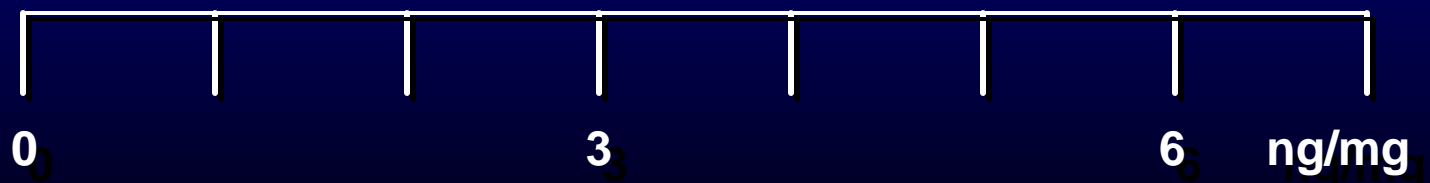
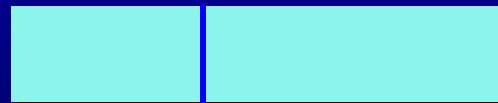
Consommateurs d'héroïne illégale



Consommateurs d'héroïne médicale



Consommateurs de drogues





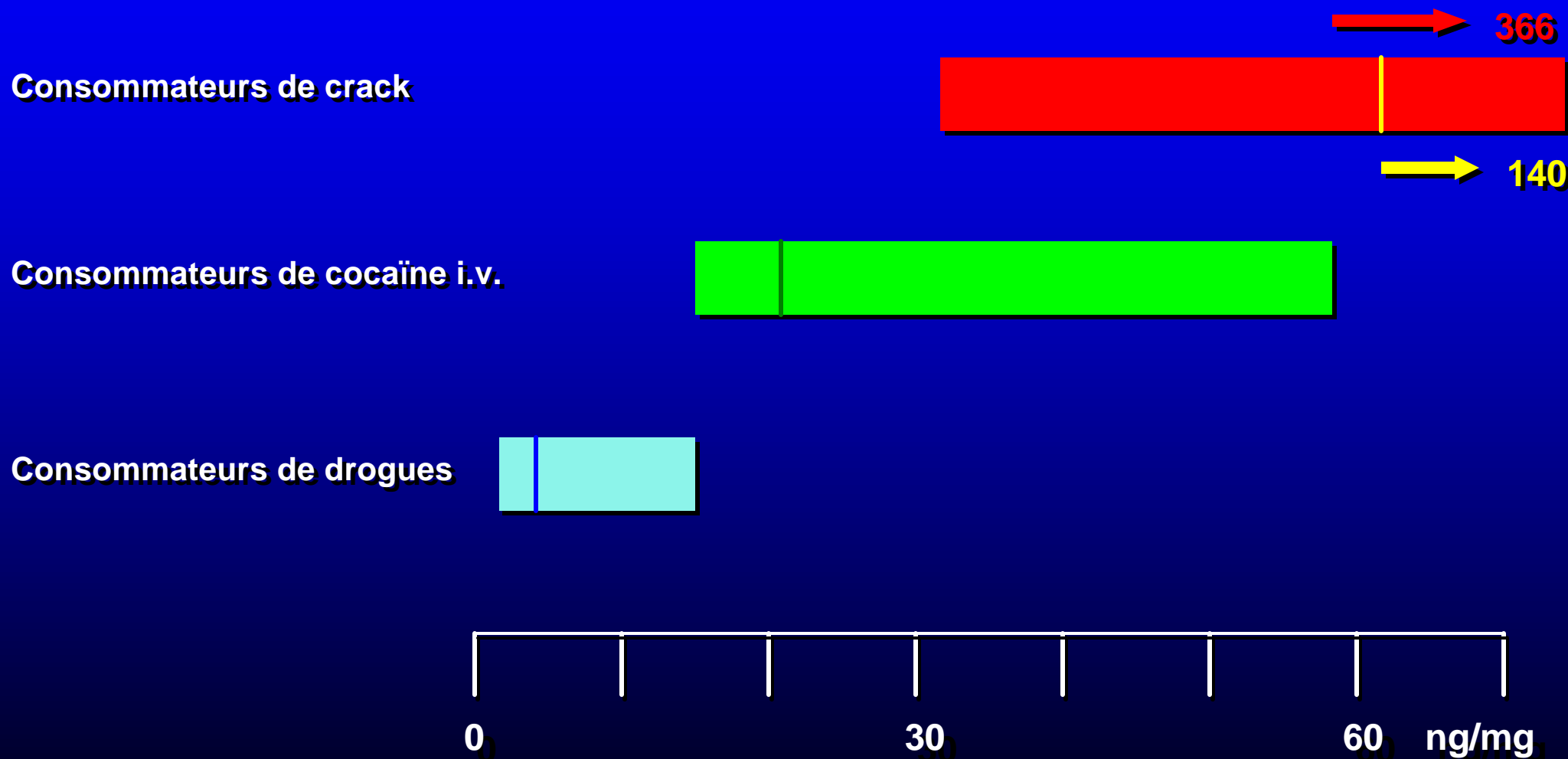
Rapport 6-MAM / morphine

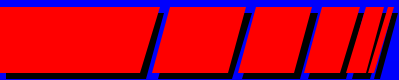
Groupe	moyenne	médiane	domaine
héroïne illégale (n = 73)	2.38	1.94	0.0 - 8.5
héroïne médicale (n = 113)	0.72	0.57	0.0 - 5.7
drogues usuelles (n = 112)	4.10	2.20	0.0 - 26.7

Concentrations de cocaïne (ng/mg) dans les cheveux de consommateurs.

	drogues (n = 251)	Cocaïne I.V. (n = 30)	Crack (n = 30)
1. LOQ	0.2	0.2	0.2
2. Moyenne	36	53	254
3. Percentile 25	1.1	15	34
4. Médiane	4.4	21	140
5. Percentile 75	15.3	58	366
6. Maximum	1100	447	927

Paramètres statistiques pour la cocaïne dans les cheveux de consommateurs.





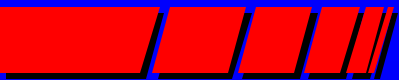
V. Revue de quelques cas tirés de la pratique quotidienne





Situations où une analyse de cheveux est effectuée.

- 1) dans les cas de décès en relation avec les drogues**
- 2) dans les cas où une évaluation de la toxicomanie est nécessaire (dealer)**
- 3) dans les cas où l'absence de toxicomanie doit être démontrée (permis de conduire)**
- 4) dans certaines affaires criminelles en tant qu'élément complémentaire au dossier**



VI. Cannabis et techniques alternatives.

Selected procedures for the detection of THC in hair :

Author :	Kauert, Röhrich (1996)	Cirimele, Kintz (1995)
Analyte :	THC	THC (CBN, CBD)
Extraction :	methanol	NaOH 1M
Clean-up :	none	LLE (hexan/ethylacetate)
Chromatography :	PAA / GC-MS(SIM)	none / GC-MS(SIM)
LOD (ng/mg) :	0.1	0.01- 0.1
Range (ng/mg) :	0.01 - 16.7	0.1 - 3.4

Selected procedures for the detection of THC-COOH in hair :

Author :	Sachs (1998 & 2000)	Uhl (1997)	Cairns & coll. (1995)
Analyte :	THC-COOH	THC-COOH	THC-COOH
Extraction :	NaOH 2M	KOH 10M	NaOH 10M H ₂ O, ethanol
Clean-up :	LLE + HPLC (hexan/ethylacetate)	SPE C18	LLE (hexan/ethylacetate)
Chromatogr. :	PFPA/HFIP GC-MS-NCI	PFPA/HFIP GC-MS/MS-NCI	HFBA/HFIP GC-MS/MS-NCI
LOD (pg/mg) :	0.5	~0.05	0.02
Range (pg/mg) :	0.7 - 10	0.16 - 10	0.05 - 1.6

SFE (Supercritical fluid extraction) as an alternative to LLE and SPE techniques

- | | |
|-------------|---|
| 1992 | Sachs and Uhl
SFE for opiates |
| 1994 | Edder, Staub & coll.
SFE for opiates |
| 1995 | Cirimele, Kintz & coll.
SFE for 6-MAM, morphine, codeine & THC |
| 1996 | Staub, Edder & Veuthey
SFE for 6-MAM, morphine, codeine, cocaine, methadone |
| 1998 | Morrisson, Chesler & coll.
SFE for cocaine |



SFE en 2001

Brewer, Galipo, Sellers and Morgan

« Analysis of cocaine, benzoylecgonine, codeine, and morphine in hair by supercritical fluid extraction with carbon dioxide modified with methanol »

Anal. Chem. 73, 2371 - 2376 (2001)

Analysis of NIST hair standard from Brewer & al. (2001)

Analyte	NIST results (SD)		SFE results (SD)	
	(ng/mg)		(ng/mg)	
cocaine	5.40	(0.44)	4.74	(0.36)
benzoylecgonine	5.40	(0.41)	4.32	(0.65)
codeine	2.85	(0.20)	2.97	(0.32)
morphine	3.71	(0.27)	4.08	(0.49)

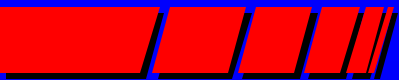
SFE conditions:

CO₂ + 10% methanol as modifier

time: 75 min

pressure: 300 atm

temperature: 145 °C



7. Conclusions



Avantages (I)

- Les cheveux sont **faciles à collecter**, sans atteintes à l'intégrité corporelle du donneur.
- Le cheveu est **une matrice stable**, facile à conserver.
- Pour les cheveux, la fenêtre de détection est **beaucoup plus longue**.
- Il est possible d'obtenir des renseignements sur **l'évolution de la toxicomanie**. Détection des périodes d'abstinence.



Avantages (II)

- Le rapport substance mère sur métabolite est **beaucoup plus élevé** dans les cheveux.
- Dans les cas post-mortem où le corps est déjà en voie de décomposition avancée, le cheveu **reste en général intact** et permet toujours un examen toxicologique.
- Enfin, le cheveu est **un échantillon permanent**, en effet il est possible de refaire un nouveau prélèvement et une nouvelle analyse à tout moment en cas de nécessité.



Inconvénients

- Les possibilités d'incorporation des drogues par **contamination extérieure** nécessitent certaines précautions et des procédures de lavage assez poussées avant les analyses proprement dites.
- Il n'existe pas encore de moyen de connaître le **rendement global d'extraction** ainsi que la **vraie teneur en drogue** dans les cheveux .