

**BIOMARQUEURS PERMETTANT D'ESTIMER LE DELAI
ENTRE LA CONSOMMATION D'HEROINE
ET LE PRELEVEMENT SANGUIN**



Nathalie Dubois

Ingénieur industriel en sciences agronomiques

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2014-2015

Résumé

La consommation d'opioïdes (et en particulier celle de l'héroïne) en Europe reste à l'heure actuelle très significative puisque la prévalence moyenne de l'usage problématique d'opioïdes se situerait entre 1 et 8 cas pour 1000 habitants âgés de 15 à 64 ans. Elle est à l'origine d'un taux de mortalité important (1 à 2%) et d'une criminalité accrue chez les usagers.

De ce fait, les laboratoires de toxicologie clinique sont régulièrement consultés pour apprécier l'état d'intoxication d'un héroïnomanie lorsqu'il est pris en charge en milieu hospitalier.

Dans un cadre judiciaire, les magistrats chargés d'instruire un dossier impliquant un usager d'héroïne font souvent appel à l'expertise d'un toxicologue pour qu'il l'aide à répondre aux questions suivantes : « Quel opiacé le sujet a-t-il consommé ? », « Les quantités retrouvées dans les prélèvements biologiques du sujet sont-elles suffisantes pour entraîner le décès ? » et enfin, question cruciale pour l'enquête « Quel est le moment de la dernière consommation d'héroïne par rapport au moment du prélèvement et par rapport aux faits ? ».

L'objectif de ce travail était d'apporter les réponses les plus pertinentes possibles à ces questions.

Dans un premier temps, l'analyse de poudres d'héroïne vendues dans la rue nous a permis de déterminer qu'elles contenaient en moyenne 17% d'héroïne. Toutes contenaient également de la noscapine, de la papavérine, de la 6-acétylcodéine, de la codéine, de la 6-acétylmorphine et de la morphine. Les produits de coupe étaient dans 98% des cas de la caféine et du paracétamol. Cette étude nous a permis de connaître les substances actives à rechercher dans les prélèvements biologiques des consommateurs.

Ensuite, nous avons développé une technique analytique capable d'identifier et de doser les opiacés et leurs métabolites dans des prélèvements sanguins. Celle-ci a été appliquée à 80 patients traités au Centre Hospitalier Universitaire de Liège pour lesquels le dépistage des

opiacés dans le sang était positif. La détermination de la nature de l'opiacé consommé a été effective dans 86% des cas. Les héroïnomanes étant très souvent polyconsommateurs, nous avons également mis au point deux méthodes permettant de mettre en évidence, d'une part, la cocaïne et les amphétamines et d'autre part, le cannabis dans le sang. Ces trois méthodes ont été validées selon les critères de la FDA (Food and Drug Administration) et selon le principe de l'erreur totale.

Enfin, nous avons élaboré un modèle mathématique permettant d'estimer le délai entre la consommation d'héroïne et le prélèvement de sang chez les toxicomanes. Ce modèle a été construit sur base de la cinétique des 4 principaux métabolites de l'héroïne - 6-acétylmorphine (6AM), morphine, morphine-6-glucuronide (M6G), morphine-3-glucuronide (M3G) - chez des sujets appartenant au groupe expérimental du projet TADAM (Traitement Assisté par Diacétylmorphine) et chez des patients subissant un sevrage rapide aux opiacés sous anesthésie (RODA). Cette étude nous a permis de conclure que la 6AM est présente dans le sang pendant 2 heures, alors que la morphine, la M6G et la M3G restent détectables respectivement pendant 1, 2 et 4 jours. Grâce à l'application d'un GLMM (General Linear Mixed Model) aux données, nous avons pu établir 3 équations permettant d'estimer plus précisément le délai entre le moment de la consommation et celui du prélèvement.

Abstract

Opioid consumption (and especially heroin) in Europe remains significant since the average prevalence of problematic opioid use vary between 1 and 8 cases per 1000 population aged 15-64. The illicit use of opioids is responsible for an important mortality and for a high criminality level in our society.

The clinical toxicology laboratory's view is consistently taken so far the intoxication level of a heroin addict at his/her hospital admission is needed.

For legal purpose, magistrates in charge of cases involving heroin addicts often require the toxicologist's help to answer several questions: "What was the nature of the opiate consumed?", "Is opioid concentration found in the biological samples high enough to cause death?", and, finally, a crucial point for the investigation, "When was heroin consumed compared to the sampling time and to the facts?".

The objective of this work is to bring the most relevant possible answers to these questions.

The analysis of street heroin powders allowed us to determine that they contain, in average, 17% of heroin. We found noscapine, papaverine, 6-acetylcodeine, codeine, 6-acetylmorphine and morphine in all samples. Ninety-eight percent of the powders were diluted with caffeine and acetaminophen. This study helped us to choose the active substances to search in biological samples of heroin consumers.

Then, we developed an analytical technique to identify and quantify opioids and their metabolites in blood. It was applied to 80 patients treated in the University Hospital in Liege and positively screened for opiates in blood. The identification of the consumed opiate was effective in 86% of cases.

As heroin addicts are often polydrug users, we also developed two other analytical methods to highlight on one hand cocaine and amphetamines and on the other hand cannabis in blood.

The three methods were validated according to FDA (Food and Drug Administration) criteria and to the total error approach.

Finally, we elaborated a mathematical model to estimate the delay between heroin consumption and blood sampling in heroin addicts. This model was built based on the kinetics of the 4 main heroin metabolites – 6-acetylmorphine (6AM), morphine, morphine-6-glucuronide (M6G) and morphine-3-glucuronide (M3G) – in subjects from the experimental group of the TADAM (Traitement Assisté par DiAcétylMorphine) project and on patients undergoing a rapid opiate detoxification under anesthesia (RODA). This study allowed us to conclude that 6AM was detected in blood for 2 hours, while morphine, M6G and M3G were respectively detected for 1, 2 and 4 days. We applied a general linear mixed model (GLMM) to the data and we established 3 equations to estimate more precisely the delay between heroin consumption and blood sampling.

La réalisation d'une thèse de doctorat est un parcours semé d'embûches, jalonné par des périodes d'espoir et de découragement. Ce travail n'aurait pu aboutir sans la collaboration et le soutien de nombreuses personnes que je remercie chaleureusement.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Corinne Charlier pour m'avoir aidée à trouver ma place au sein du Service de Toxicologie. Sa passion contagieuse pour la Toxicologie a contribué à l'épanouissement de la scientifique que je suis devenue. Ces quelques lignes ne suffiront pas à lui exprimer ma reconnaissance pour son soutien dans mes entreprises tant professionnelles que personnelles.

Ma gratitude va également au Professeur Guy Plomteux qui m'a offert mon premier emploi il y a 15 ans malgré des connaissances plus que limitées dans le domaine de la Biologie clinique ! Nos discussions, sa remarquable intelligence et ses conseils avisés ont grandement amélioré la rigueur scientifique de mes écrits et de mes présentations.

Rien n'aurait été possible sans l'aide du Professeur Adelin Albert pour l'interprétation statistique de mes données. Son enthousiasme indéfectible pour mes recherches a largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'équipe de recherche du Projet TADAM, tout particulièrement au Professeur Marc Anseau et à Isabelle Demaret pour m'avoir intégrée dans l'équipe. Je remercie également les membres du personnel du centre TADAM qui ont su communiquer leur enthousiasme pour le projet et qui ont su lever toutes les appréhensions et les aprioris que j'avais sur le traitement des personnes dépendantes de l'héroïne.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance la plus sincère au Docteur Claude Hallet et aux infirmières de l'Hôpital de jour pour m'avoir fait découvrir l'ambiance des salles d'opération du CHU de Liège et pour avoir su m'expliquer avec bonne humeur et pédagogie le principe des protocoles RODA. Je remercie également Carole Lardinois et son équipe pour m'avoir si gentiment reçue dans le Service de Psychiatrie lors de mes visites aux patients subissant un sevrage.

Je remercie les Membres du Comité de thèse pour les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ce travail ainsi que les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Remerciements

Pour sa compétence et pour son aide technique, je remercie l'ensemble du personnel du Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale, de l'Environnement et en Entreprise du CHU de Liège. J'adresse tout particulièrement ma gratitude à Catherine, Marine, Raphaël et Virginie qui ont rendu possible la réalisation de ce travail en prenant en charge bon nombre de mes tâches. Leur amitié et leur soutien ont été une arme redoutable face au découragement !

Pour sa gentillesse et son efficacité, j'adresse une pensée toute particulière à Bernadette Cornet qui n'hésite jamais à sacrifier son temps pour me venir en aide.

J'éprouve une immense tendresse envers ma maman pour l'éducation qu'elle m'a donnée et pour m'avoir toujours offert la possibilité de réaliser mes souhaits même les plus farfelus !

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Remerciements</i>	<i>v</i>
Préambule et plan du travail	1
Chapitre I – Introduction	9
I.1- Du pavot à l'héroïne	11
<i>I.1.1- Caractères botaniques de <i>Papaver somniferum</i> L.</i>	<i>11</i>
<i>I.1.2- Production de l'opium</i>	<i>12</i>
<i>I.1.3- Fabrication de l'héroïne</i>	<i>13</i>
<i>I.1.4- Exportation de l'héroïne</i>	<i>15</i>
I.2- Que retrouve-t-on dans l'héroïne de rue ?	16
I.3- Effets biologiques de l'héroïne	20
Chapitre II – Développements analytiques	23
II.1- Identification et dosage des opiacés dans le sang	25
<i>II.1.1- Préparations des échantillons biologiques</i>	<i>26</i>
<i>II.1.2- Méthode chromatographique d'identification et de dosage des opiacés dans le sang ...</i>	<i>26</i>
<i>II.1.3- Validation analytique</i>	<i>28</i>
<i>II.1.4- Application de la méthode d'identification et de dosage des opiacés à 80 patients traités au CHU de Liège et pour lesquels la recherche des opiacés était positive</i>	<i>31</i>
II.2- Identification et dosage des opiacés associés aux principales drogues illicites (cocaïne, amphétamines, cannabis) dans le sang	45
<i>II.2.1- Identification et dosage de la cocaïne, des opiacés et des amphétamines dans le sang .</i>	<i>45</i>
<i>II.2.2- Identification et dosage du cannabis dans le sang</i>	<i>59</i>
II.3- Présentation sommaire des principales caractéristiques analytiques des trois méthodes développées dans le cadre de ce travail	69

Chapitre III – Pharmacocinétique de l’héroïne	
Estimation du délai entre la consommation d’héroïne et le prélèvement biologique	71
III.1- Pharmacocinétique de l’héroïne	73
<i>III.1.1- Aspects théoriques</i>	<i>73</i>
<i>III.1.2- Evolution de la concentration sanguine des principaux métabolites de l’héroïne en fonction du temps chez 11 sujets du groupe expérimental « diacétylmorphine » du projet TADAM</i>	<i>77</i>
<i>III.1.3- Evolution de la concentration sanguine des principaux métabolites de l’héroïne en fonction du temps chez 11 patients ayant subi un sevrage rapide aux opiacés sous anesthésie générale</i>	<i>91</i>
III.2- Estimation du délai entre la consommation d’héroïne et le prélèvement biologique	94
<i>III.2.1- Approche qualitative</i>	<i>94</i>
<i>III.2.2- Approche quantitative</i>	<i>95</i>
Conclusions et perspectives	107
Références bibliographiques	117
Annexes	131

PREAMBULE ET PLAN DU TRAVAIL



L'héroïne est une substance illégale qui entraîne rapidement de la dépendance et dont l'usage a des répercussions très négatives sur la vie du consommateur : sa santé se détériore et le mode de vie qu'implique la recherche quotidienne de drogue l'empêche de poursuivre une scolarité normale ou de travailler. La dépendance à l'héroïne coûte des milliards d'euros chaque année à la société. L'héroïne est obtenue par acétylation de la morphine, constituant naturel de l'opium, elle peut être fumée ou injectée après solubilisation à l'aide d'un acide faible (1).

Que ce soit après résorption pulmonaire ou parentérale, l'héroïne est très rapidement transformée dans l'organisme et ses métabolites actifs (6-acétylmorphine, morphine, morphine-6-glucuronide) se lient à des récepteurs spécifiques dans le cerveau appelés récepteurs aux opioïdes. Le terme « opioïdes » est appliqué aux alcaloïdes contenus dans l'opium, latex issu d'une variété de pavot, le *Papaver somniferum*. Ce terme fait aussi bien référence aux opioïdes semi-synthétiques comme l'héroïne qu'aux opioïdes synthétiques comme le fentanyl et la méthadone. Quand les récepteurs aux opioïdes sont activés, ils stimulent la libération de dopamine, responsable d'une sensation de bien-être : c'est l'activation du « circuit de la récompense ». Tout de suite après la consommation d'héroïne, les usagers rapportent une sensation d'euphorie dont l'intensité dépend de la quantité de drogue prise et du mode de consommation, l'injection entraînant un sentiment de bien-être plus intense que l'inhalation. Ce sentiment agréable est accompagné de sécheresse buccale, d'une sensation de lourdeur dans les extrémités, de nausées, de vomissements et de démangeaisons sévères. Le consommateur peut être somnolent et confus pendant plusieurs heures, ses fonctions cardiaque et respiratoire sont ralenties, parfois suffisamment pour entraîner un coma voire le décès (2).

Un usage chronique d'héroïne crée un déséquilibre à long terme des systèmes nerveux et hormonal qui peut affecter les capacités de décision et le comportement du sujet ainsi que sa

réponse à des situations stressantes. La consommation d'héroïne entraîne aussi de la tolérance et une dépendance physique intense. Les symptômes de manque apparaissent déjà quelques heures après la dernière prise de drogue. Ils se traduisent par de l'agitation, de la douleur dans les muscles et dans les os, de l'insomnie, des diarrhées, des vomissements et des tremblements. L'intensité du syndrome de manque est maximale 24 à 48 heures après la dernière consommation et les signes subsistent pendant une semaine (2,3).

En 2012, l'Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime (ONUDC) a estimé que l'usage problématique d'opioïdes, incluant la consommation d'héroïne mais aussi celle d'analgésiques morphiniques sur ordonnance, concernait 28.6 à 38 millions de personnes dans le monde. Le nombre de consommateurs d'héroïne et d'opium reste stable depuis quelques années et représente environ la moitié des consommateurs d'opioïdes (4).

En Europe, la prévalence moyenne de l'usage problématique d'opioïdes est estimée à 0.41%, soit environ 1.4 million de personnes âgées de 15 à 64 ans. En fonction du pays, elle représente entre 1 et 8 cas pour 1000 habitants (5). Sur base du nombre de prescriptions de produits de substitution à l'héroïne (méthadone et buprénorphine), Demaret et coll. ont estimé, qu'en 2007, en province de Liège, entre 3500 et 4500 personnes étaient dépendantes de l'héroïne. La situation de la commune de Liège est particulièrement préoccupante puisque 13 à 17 personnes pour 1000 habitants âgés de 15 à 64 ans seraient héroïnomanes (6).

La consommation d'opiacés est à l'origine d'un taux de mortalité de 1 à 2% par an. Une étude récente de l'European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) a estimé que 10 000 à 20 000 consommateurs d'opiacés décèdent chaque année en Europe. En termes de morbidité, on estime, en Belgique, qu'environ 200 décès chaque année sont dus à l'usage de drogues (5).

Les deux causes majeures de décès chez les usagers d'opiacés sont l'overdose suicidaire ou accidentelle. Le nombre de dépressifs est très important chez les héroïnomanes et le risque de tentative de suicide est 14 fois plus élevé que dans la population générale (7-9). L'overdose accidentelle peut survenir lors d'une première prise, d'une reprise après un arrêt (cure, séjour en prison) ou de la prise d'une héroïne moins coupée que celle qui est consommée habituellement (changement de dealer).

Par ailleurs, la voie parentérale, qui concerne environ 20% des usagers d'opiacés admis en traitement en Belgique, reste un vecteur important de transmission de maladies infectieuses, le plus souvent, le VIH et l'hépatite C. Les maladies sexuellement transmissibles, la tuberculose, le tétanos et le botulisme sont également plus souvent diagnostiqués chez les consommateurs d'opiacés (5, 9, 11).

La criminalité est également significativement plus élevée chez les consommateurs d'opiacés, ils sont plus souvent impliqués dans des crimes violents, dont des homicides, que la population générale. Les activités criminelles (vol, vente de drogues) et la prostitution servant à financer l'achat d'héroïne soumettent le consommateur à un risque élevé de faire face à la violence que ce soit en tant qu'auteur ou en tant que victime. A l'inverse, l'effet sédatif des opiacés entraîne un nombre élevé d'accidents et accroît le risque de victimisation (12-15).

Pour apprécier l'état de santé d'un héroïnomane, pour expliquer un décès ou pour comprendre une action criminelle, les laboratoires de toxicologie clinique ou judiciaire sont régulièrement consultés.

Plusieurs études ont montré que parmi les stupéfiants mis en évidence dans les prélèvements de sujets autopsiés, un opiacé est la deuxième substance la plus fréquemment identifiée après le cannabis (16-19).

Quand un magistrat doit instruire un dossier impliquant la consommation d'opioïdes que ce soit de la part d'une victime ou d'un suspect, il fait souvent appel à l'expertise du toxicologue pour l'aider à résoudre plusieurs questions : « Quel opiacé le sujet a-t-il consommé et peut-on apporter la preuve que l'opiacé éventuellement consommé est illicite (héroïne) ? Les quantités retrouvées dans l'organisme du sujet sont-elles suffisantes pour entraîner le décès ? Le sujet a-t-il consommé des substances psychoactives autres que l'héroïne qui auraient pu en amplifier les effets ? » et, enfin, question cruciale pour l'enquête « Quelle était l'influence de l'héroïne présente dans l'organisme du sujet sur son comportement au moment des faits ? ».

L'objectif de ce travail est d'apporter les réponses les plus pertinentes possibles à ces questions.

Dans le premier chapitre de notre travail, après avoir rappelé les différentes étapes de la synthèse de l'héroïne à partir du latex retiré du pavot, nous avons analysé des poudres d'héroïne vendues dans la rue, d'une part, pour connaître leur teneur réelle en héroïne et, d'autre part, pour en identifier les différents composants afin de savoir à quelles substances actives un sujet est exposé lorsqu'il consomme de l'héroïne de rue.

Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit les techniques analytiques développées pour permettre l'identification et le dosage des opiacés dans les prélèvements biologiques. Parce que les usagers d'héroïne sont souvent polyconsommateurs, nous avons également mis au point des méthodes analytiques capables de caractériser d'autres substances psychoactives illicites : cocaïne, amphétamines, cannabis.

Les méthodes d'analyse sont également susceptibles de mettre en évidence et de doser les produits de substitution de l'héroïne (méthadone, buprénorphine) et divers opiacés médicamenteux (codéine, dihydrocodéine, éthylmorphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone et pholcodine).

Les différentes techniques ainsi développées reposent sur de la chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MSMS). Elles ont été validées selon les recommandations de la FDA (Food and Drug Administration) et selon le principe de la mesure de l'erreur totale.

Enfin, dans le troisième et dernier chapitre, nous avons tenté d'apporter une réponse à la question difficile de l'estimation du délai entre la consommation d'héroïne et le prélèvement biologique, ce qui permet de se prononcer sur l'état psychique du consommateur au moment des faits. Pour y parvenir, nous avons pris en compte les résultats du dosage des principaux métabolites de l'héroïne dans le sang de sujets consommateurs chroniques. Certains sujets ont été recrutés dans le groupe expérimental « diacétylmorphine » du projet TADAM (Traitement Assisté par DiAcétylMorphine) mis en place par des chercheurs de l'Université de Liège en janvier 2011. D'autres patients proviennent d'une population d'héroïnomanes en cours de sevrage rapide sous anesthésie générale (RODA). Un modèle mathématique basé sur les concentrations sanguines de 6-acétylmorphine, de morphine libre et de morphine conjuguée (morphine-6-glucuronide et morphine-3-glucuronide) obtenues chez ces deux groupes de patients a été construit.

CHAPITRE I
INTRODUCTION



I.1– Du pavot à l’héroïne

L’héroïne est synthétisée à partir de la morphine extraite de l’opium qui est le latex de *Papaver somniferum*.

I.1.1- Caractères botaniques de *Papaver somniferum* L. (20-22)

Le *Papaver somniferum* fait partie de la famille des Papaveraceae composée d’une quarantaine de variétés différentes. Les conditions optimales de culture sont rencontrées dans les régions sèches à climat tempéré, à une altitude de 800 mètres environ.

Le *Papaver somniferum* (Figure 1) est une plante herbacée annuelle dont la grande tige dressée, mesurant entre 1 et 1.5 mètre, porte des feuilles alternes à limbe glabre de couleur « vert glauque ».

La fleur, solitaire, compte deux sépales soudés en une sorte de capuchon et qui tombent lorsque la corolle s’épanouit. Celle-ci est constituée de 4 pétales blancs, roses ou violacés selon le cultivar, elle entoure de très nombreuses étamines et un ovaire renfermant une multitude de graines minuscules. La pollinisation est assurée par des insectes polliniphages.

Le fruit constitue la capsule du pavot.

La plante contient des vacuoles spécialisées, développées en laticifères, qui constituent un appareil sécréteur de latex riche en alcaloïdes et qui parcourt tout l’appareil végétatif et le péricarpe du fruit.

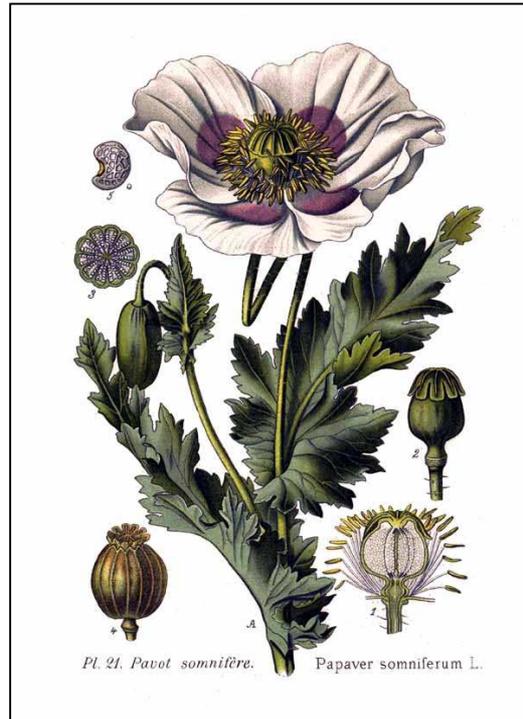


Figure 1 : *Papaver somniferum* L. (23)

1.1.2- Production de l'opium (21, 24, 25)

En Asie du sud-ouest, les graines sont semées à la fin de l'automne. Le plant arrive à maturité à la fin de l'hiver et fleurit après environ 90 jours (3 à 8 fleurs par plant). La floraison dure quelques semaines, ensuite, les pétales tombent et laissent apparaître un petit fruit gris vert, qui continue à croître pour devenir une capsule oblongue de la taille d'un œuf de poule. Après environ deux semaines, le bulbe est mûr. Les capsules sont alors incisées avec précaution à environ 1 mm de profondeur. Les incisions doivent être suffisantes pour sectionner les laticifères mais ne doivent pas atteindre l'endocarpe afin d'éviter que le latex ne s'écoule à l'intérieur de la capsule. Chaque fruit est incisé trois à quatre fois par jour. Le latex qui s'écoule reste en surface du péricarpe où il passe du blanc au brun en s'oxydant. Le lendemain matin, l'opium est raclé sur les bulbes et déposé sur un morceau de tissu. Cette opération est répétée plusieurs jours jusqu'à ce que les fruits ne fournissent plus de suc.

L'opium est composé d'eau (moins de 10%), de sucres (environ 15%), de mucilages (environ 20%), de pectines (environ 20%), d'acides organiques (principalement l'acide méconique), de tanins, et d'une quarantaine d'alcaloïdes (15-35%).

Parmi ces alcaloïdes, on distingue les dérivés de la benzyl-isoquinoléine (ou morphinanes), les plus abondants, et des dérivés de l'isoquinoléine.

Les principaux dérivés de la benzyl-isoquinoléine sont la morphine, la codéine, la thébaïne et la noscapine respectivement présentes à des concentrations de 10 à 12%, 2 à 5%, 0.5 à 2% et 2 à 10% dans le latex. La papavérine est le représentant majoritaire des dérivés de l'isoquinoléine, l'opium en contient 0.5 à 2.5%.

En 2013, le pavot somnifère était cultivé sur une superficie d'environ 300 000 hectares et la production d'opium dans le monde estimée à 7 000 tonnes, environ. La culture illicite du pavot a lieu essentiellement dans le Croissant d'Or (Pakistan, Iran et surtout Afghanistan qui est le premier producteur d'opium au niveau mondial), le Triangle d'Or (Myanmar, Thaïlande, Laos), et depuis peu, au Mexique et en Colombie.

1.1.3- Fabrication de l'héroïne (4, 24)

Il existe plusieurs façons de transformer l'opium en héroïne. La région dans laquelle la synthèse est opérée, les procédés transmis de génération en génération et les réactifs mis à la disposition du producteur expliquent les différents types de mode opératoire utilisés.

Dans tous les cas, la synthèse de l'héroïne comprend 4 étapes : la purification de l'opium, l'extraction et la purification de la morphine, la conversion de la morphine en héroïne et la conversion de l'héroïne base en sel hydrochloré.

1. Purification de l'opium brut

Cette étape est le plus souvent réalisée par le cultivateur. Elle consiste à enlever les matières hydrosolubles ou inertes qui donnent à l'opium un goût désagréable, l'empêchent de brûler et donc d'être fumé.

L'opium est bouilli dans de l'eau jusqu'à dissolution complète, les alcaloïdes sont dissous dans la phase aqueuse, les matières végétales flottent à la surface de l'eau ou ont précipité dans le fond du récipient. La préparation est grossièrement filtrée sur un tissu. Le liquide est récupéré et chauffé jusqu'à évaporation de l'eau. La pâte foncée obtenue est séchée au soleil. L'opium ainsi purifié, qui porte le nom de chandoo, contient 5 à 9% de morphine. Les utilisateurs peuvent le consommer par voie orale (opiophagie) ou le fumer au moyen d'une pipe.

2. Extraction et purification de la morphine

Cette étape est également souvent réalisée de manière rudimentaire par le cultivateur.

Le chandoo est à nouveau bouilli dans l'eau jusqu'à dissolution complète, la solution est ensuite alcalinisée à l'aide d'hydroxyde de calcium ou de n'importe quel engrais basique. Dans ces conditions, la morphine base, insoluble dans l'eau, est transformée en morphinate de calcium parfaitement hydrosoluble. La plupart des autres alcaloïdes ne réagissent pas avec la base et précipitent dans le fond de la cuve lorsque le liquide refroidit. Après filtration, la solution est légèrement chauffée ; on y ajoute du chlorure d'ammonium jusqu'à obtenir un pH compris entre 8 et 9. La solution est ensuite refroidie, et, au bout de quelques heures, la morphine base précipite. Le précipité est récupéré et séché au soleil. On obtient ainsi la morphine base brute qui a pris la forme d'une poudre brun-beige. A ce stade, une étape de purification à l'aide d'un solvant organique (acétone) peut être ajoutée et elle conditionnera la quantité d'alcaloïdes autres que la morphine (codéine, noscapine, papavérine) présents dans la

poudre obtenue. Celle-ci est ensuite expédiée vers les laboratoires de transformation de la morphine en héroïne. Depuis le début des années 90, les fabricants d'héroïne d'Asie du Sud-ouest ne réalisent plus l'étape de purification à l'acétone afin de diminuer le risque d'être repérés et démantelés par les autorités judiciaires. L'héroïne vendue dans les rues des pays européens contient donc encore des quantités relativement importantes de codéine, de noscapine et de papavérine.

3. Conversion de la morphine en héroïne

Cette conversion se fait par acétylation de la morphine à l'aide d'anhydride acétique à 85°C, ce qui transforme la morphine en diacétylmorphine. Au bout de 5 heures, la solution refroidie est mélangée à du charbon actif pour absorber les impuretés colorées. Du carbonate de sodium dissous dans de l'eau bouillante est ajouté à la solution de diacétylmorphine jusqu'à ce que l'effervescence cesse et que l'héroïne base précipite et soit séchée.

4. Conversion de l'héroïne base en sel hydrochloré

L'héroïne base est traitée par un mélange en proportions égales d'éthanol et d'éther en présence d'acide chlorhydrique concentré. Après chauffage, filtration et évaporation, on obtient du chlorhydrate d'héroïne, une poudre blanche à la granulométrie fine.

1.1.4- Exportation de l'héroïne (1)

Traditionnellement, l'acheminement de l'héroïne de l'Afghanistan vers l'Europe se faisait par la route des Balkans, c'est-à-dire par la République Islamique d'Iran et la Turquie. Depuis quelques temps cependant, l'approvisionnement de l'Europe en héroïne se ferait plutôt par le Proche Orient, le Moyen Orient et l'Afrique.

I.2– Que retrouve-t-on dans l’héroïne de rue ? (24-30)

Il est normal de retrouver dans l’héroïne de rue les différents alcaloïdes du pavot en quantité variable et dépendant du mode d’extraction et de purification. De plus, la poudre résultant du processus de fabrication est également diluée par diverses substances chimiques avant d’être livrée au commerce de la drogue. Au total, l’héroïne de rue peut contenir 3 catégories de substances :

- 1- des substances naturellement présentes dans le pavot, coextraites durant la synthèse (morphine, codéine, papavérine, noscapine, thébaine) ;
- 2- des substances chimiques acétylées générées par la méthode de production (6-acétylmorphine, 3-acétylmorphine, acétylcodéine, acétylthébaol), des éléments organiques provenant de la méthode de production, des traces résiduelles des solvants utilisés lors de la fabrication et des procédures de purification de l’héroïne (éther, éthanol, acétone,...) ;
- 3- des agents adultérants et/ou des diluants ajoutés sur le site de production ou à n’importe quel stade de la filière de distribution (caféine, paracétamol).

La détermination de la composition des poudres d’héroïne est utile pour connaître la quantité d’héroïne retrouvée dans le produit qui est proposé aux consommateurs. Des accidents peuvent survenir si le toxicomane, coutumier d’une poudre faiblement dosée en héroïne, consomme subitement la même quantité d’une poudre beaucoup moins diluée. La connaissance des produits de coupe pharmacologiquement actifs, (paracétamol, caféine, phénacétine, benzodiazépines,...) est également importante puisque ceux-ci sont susceptibles d’entraîner des manifestations indésirables parfois graves. L’identification et la quantification des alcaloïdes de l’opium présents dans la poudre d’héroïne permettent d’établir le mode de production de l’héroïne et donc la région du monde dans laquelle l’opium a été transformé en

morphine brute. Enfin, le profilage de l'héroïne peut aider les policiers à identifier les poudres ayant une origine identique et ainsi remonter les filières de vente de l'héroïne.

Une cinquantaine de poudres saisies par les Forces de l'Ordre entre 2004 et 2011 en région liégeoise ont été analysées par le Service de Toxicologie du CHU de Liège pour en déterminer la composition.

Elles ont été analysées selon le mode opératoire décrit dans la Figure 2.

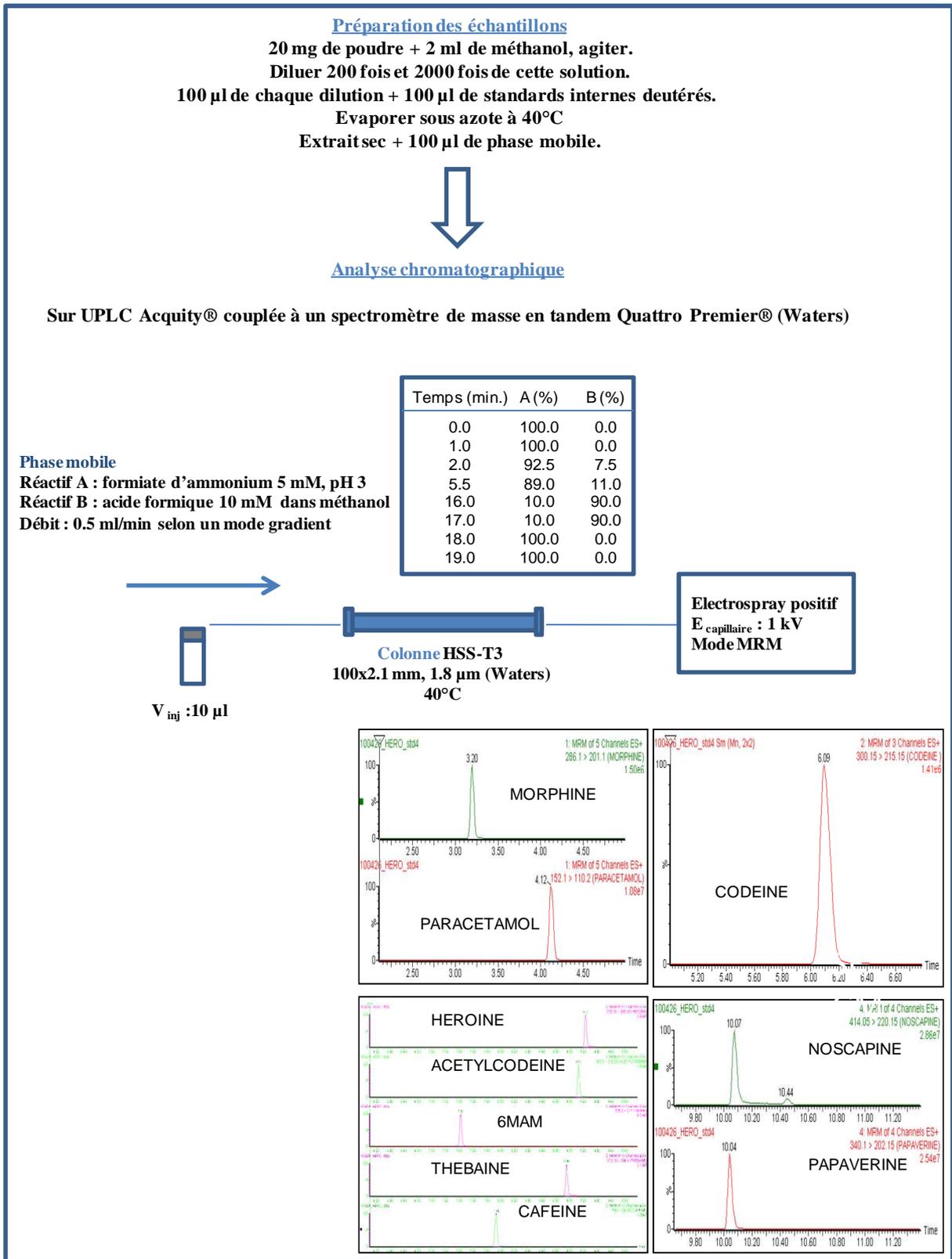


Figure 2 : Méthode pour la détermination des différents composants des poudres d'héroïne

Le pourcentage moyen d'héroïne des poudres ainsi analysées est de 17% (de 0.7 à 38%).

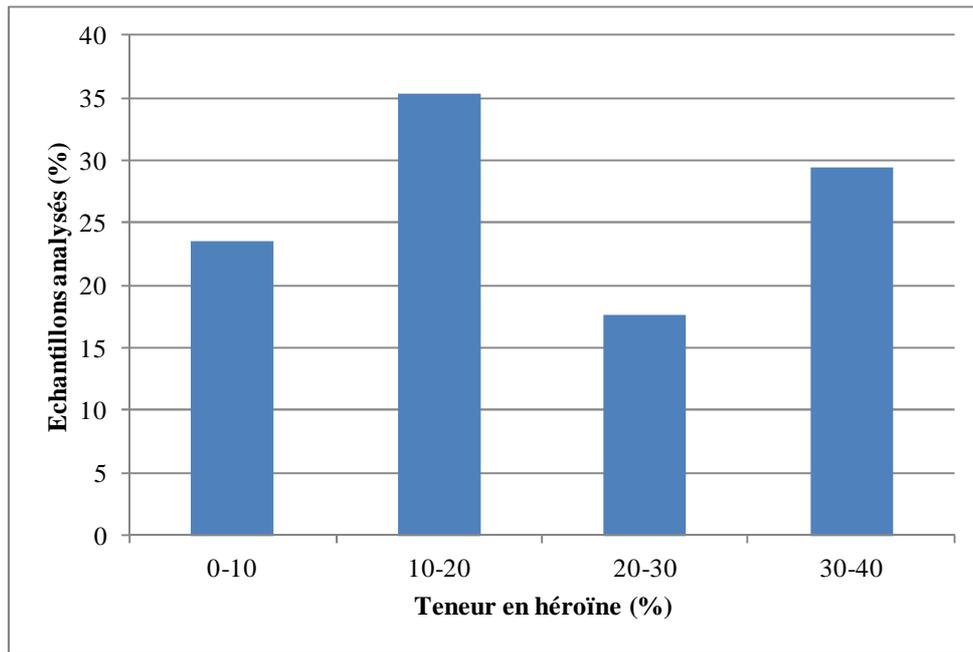


Figure 3 : Répartition des teneurs en héroïne dans les 50 échantillons analysés

Les principaux alcaloïdes de l'opium (noscapine, morphine, papavérine, codéine), la 6-acétylmorphine et la 6-acétylcodéine, produits issus de la synthèse de l'héroïne, ont été identifiés dans tous les échantillons, ce qui signifie que ceux-ci ont probablement été fabriqués à partir de morphine brute, selon la technique utilisée en Asie du sud-ouest. Les pourcentages moyens étaient de 9% pour la noscapine (de 4 à 14%), 3% pour la morphine (de 0 à 6%), 0.9% pour la papavérine (de 0.5 à 2%) et 0.4% pour la codéine (de 0 à 0.9%). La 6-acétylcodéine et la 6-acétylmorphine étaient toutes les deux présentes, respectivement à des taux moyens de 2% (de 0.3 à 4%) et de 7% (de 1 à 16%).

Enfin, dans 98% des cas, les produits de coupe retrouvés étaient du paracétamol représentant en moyenne 27% de la poudre (de 21 à 56%) et de la caféine en quantité évaluée en moyenne à 18% de la poudre (de 9 à 33%). Seul un échantillon contenait en plus de ces deux adultérants de la phénacétine, un antalgique/antipyrétique, retiré du marché en Belgique en raison de sa néphrotoxicité et de son hépatotoxicité.

I.3– Effets biologiques de l'héroïne (31-35)

L'héroïne agit par l'intermédiaire de récepteurs aux opioïdes. Il existe des opioïdes endogènes (enképhalines, endorphines et dynorphines) et exogènes. Un opioïde pourra être agoniste entier ou partiel, ou antagoniste des récepteurs des opioïdes.

Les récepteurs des opioïdes sont des récepteurs métabotropiques à 7 hélices transmembranaires couplés à la protéine G. Trois familles de récepteurs des opioïdes ont été différenciées : les récepteurs μ , κ ou δ ayant respectivement pour ligands naturels préférentiels les endorphines, les dynorphines et les enképhalines. Ces récepteurs sont divisés en sous-types (μ_1 , μ_2 , κ_1 , κ_2 , δ_1 , δ_2 , δ_3).

L'activation des récepteurs μ entraîne une analgésie centrale et spinale, une dépression respiratoire, un myosis, de la constipation et de l'euphorie. L'activation des récepteurs κ a pour conséquence une analgésie spinale, celle des récepteurs δ une analgésie, une dépression respiratoire modérée, un myosis et de la dysphorie.

Durant la synthèse, le transfert de deux groupes acétyl sur la molécule de morphine a pour conséquence de rendre l'héroïne plus lipophile que la morphine, lui permettant de traverser plus rapidement la barrière hémato-encéphalique.

L'héroïne a moins d'affinité pour le récepteur μ stéréospécifique que ses métabolites actifs (6AM, morphine, M6G), c'est pourquoi elle est considérée comme une pro-drogue qui agit par ses métabolites.

Les principaux effets de la consommation d'héroïne sont :

- sur le système endocrinien : diminution de la sécrétion de certaines hormones (LH, FSH, ACTH,...), augmentation de la production de prolactine ;
- sur la respiration : bradypnée ;

- sur le système digestif : nausées, vomissements, diminution de la vidange gastrique, réduction des sécrétions de l'intestin grêle, ralentissement du transit avec constipation ;
- sur la fonction rénale : réduction de la diurèse ;
- myosis ;
- hypothermie.

CHAPITRE II
DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES



Initialement, nous avons développé une méthode analytique pour identifier et pour doser les opiacés dans le sang. Par la suite, nous avons complété cette technique pour permettre d'identifier et de doser, en plus des opiacés, les autres produits stupéfiants consommés fréquemment par les toxicomanes.

II.1 – Identification et dosage des opiacés dans le sang

Cette technique permet d'identifier et de doser les substances que l'on peut retrouver dans les échantillons biologiques d'un consommateur d'héroïne de rue : les métabolites de l'héroïne [6-acétylmorphine (6AM), morphine, normorphine, morphine-6-glucuronide (M6G) et morphine-3-glucuronide (M3G)], les alcaloïdes du pavot et leurs métabolites [codéine, norcodéine, codéine-6-glucuronide (C6G), papavérine, noscapine et méconine], ainsi que la 6-acétylcodéine produite au cours de la fabrication de l'héroïne (36-44). Il faudra bien entendu tenir compte, dans l'interprétation des résultats, du fait que la codéine et la morphine ainsi que leur métabolite sont également détectables chez les sujets à qui de la codéine ou de la morphine ont été prescrites (45-48).

La méthode permet également de mettre en évidence d'autres analgésiques morphiniques comme la dihydrocodéine, l'éthylmorphine, l'hydrocodone, l'hydromorpone, l'oxycodone et la pholcodine ainsi que les produits de substitution à l'héroïne, la méthadone et son principal métabolite, la 2-éthylidine-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine (EDDP), la buprénorphine et son métabolite, la norbuprénorphine. Les antagonistes des opiacés, la naloxone, la naltrexone et son métabolite actif le 6- β -naltrexol, administrés en cas de surdosage ou pour permettre un sevrage rapide, sont également reconnus par cette technique d'analyse.

Le développement et la validation analytique de cette méthode ont fait l'objet de la Publication 1.

II.1.1 - Préparation des échantillons biologiques (49)

La méthode que nous avons développée pour extraire tous ces opiacés du plasma est l'extraction en phase solide (SPE) sur cartouches Oasis[®] MCX (Mixed-mode Cation eXchange) 30 mg, 1 cc commercialisées par la société Waters. Ces cartouches utilisent des mécanismes de phase inverse et d'échanges cationiques.

Après ajout de 50 µl d'une solution contenant les standards internes deutérés, 500 µl de plasma sont acidifiés par 500 µl d'HCl 0.15 N. Les cartouches SPE sont tout d'abord conditionnées par 2 fois 1 ml de méthanol, par 2 fois 1 ml d'eau et par 2 fois 1 ml d'acide citrique 10 mM (pH 3). Le plasma acidifié est chargé sur la cartouche, puis, la cartouche est lavée par 500 µl d'acide formique 2%. Les analytes sont ensuite élués par une solution de NH₄OH dans du méthanol (5/95 :v/v). Enfin, l'éluat est évaporé à sec sous un faible flux d'azote à 30°C. L'extrait sec est reconstitué dans 100 µl d'un mélange de formiate d'ammonium 5 mM (pH 3) et d'acide formique à 0.1% dans du méthanol (90/10 : v/v). Dix µl sont injectés sur la colonne chromatographique.

II.1.2 – Méthode chromatographique d'identification et de dosage des opiacés dans le sang

La **chromatographie** est une technique analytique permettant la séparation (migration différentielle) des composants d'un échantillon sous l'influence du déplacement d'un fluide appelé phase mobile sur un milieu doué de propriétés physico-chimiques appelé phase stationnaire (50).

La méthode décrite est basée sur de la chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à la détection par spectrométrie de masse en tandem développée sur un appareil UPLC Acquity[®] / Quattro Premier[®] commercialisé par la société Waters.

La **chromatographie liquide ultra-haute pression (UHPLC)** utilise une phase mobile liquide - un mélange d'un tampon aqueux et d'un solvant organique - délivrée selon un mode isocratique ou gradient. La phase stationnaire consiste en une colonne contenant des particules très petites (1.7 – 1.8 μm) compactées les unes sur les autres. Le passage de la phase mobile à travers la colonne nécessite l'application d'une très grande pression (51).

La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Acquity[®] HSS (High Strength Silica) – T3 (100 x 2.1 mm, 1.8 μm , Waters). Cette colonne est compatible avec l'utilisation d'une phase mobile 100% aqueuse et permet de séparer des composés polaires et apolaires plus efficacement qu'une colonne C18 classique.

La phase mobile, constituée de tampon formiate d'ammonium 5 mM (pH3) et d'acide formique à 0.1% dans du méthanol, est délivrée selon un mode gradient à un débit constant de 0.5 ml/min. La méthode permet de séparer 25 composés et 14 analogues deutérés en 19 minutes.

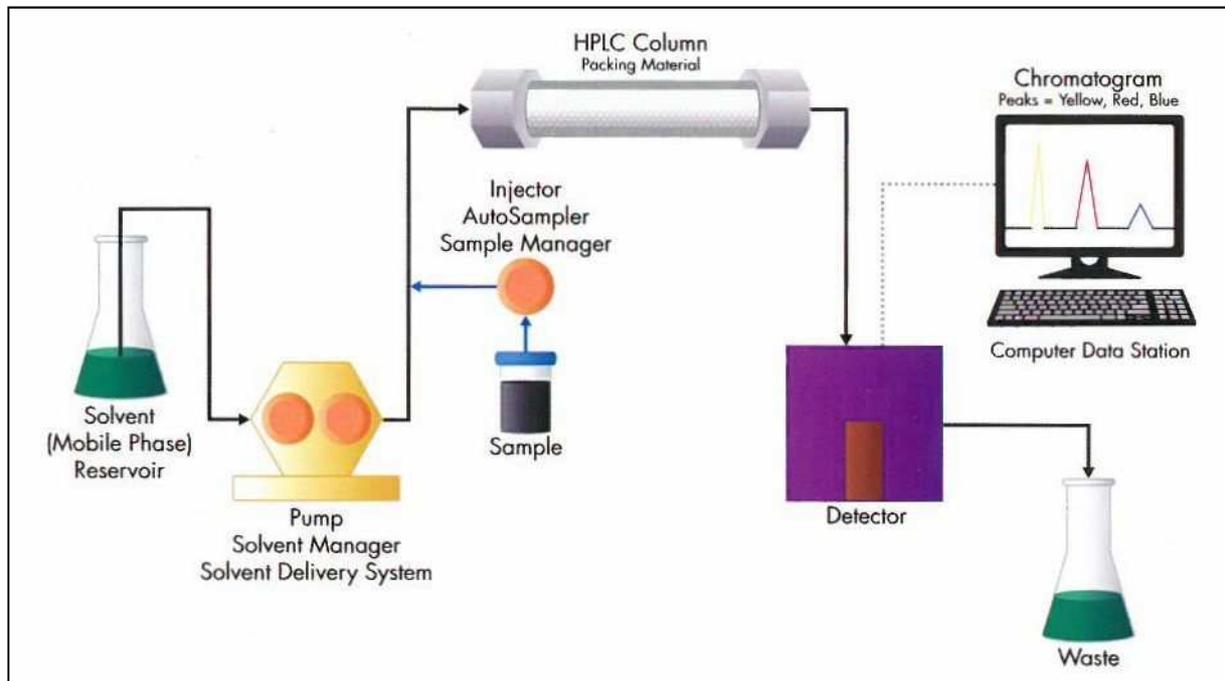


Figure 4 – Représentation d'un système HPLC (51)

Le **spectromètre de masse** est un détecteur très spécifique et très sensible qui permet de séparer et d'identifier les composés sur base de leur rapport masse sur charge.

Le système d'ionisation utilisé sur le spectromètre de masse Quattro Premier[®] est l'ionisation par électrospray (ESI) en mode positif. Les composés dissous dans un solvant polaire (phase mobile de l'UHPLC) sont entraînés dans un capillaire en acier inoxydable sur lequel est appliquée une tension comprise entre 2000 et 4000 V. A la sortie du capillaire, le liquide est vaporisé, désolvaté et ionisé sous l'action combinée de la chaleur et d'une attraction électrostatique.

L'analyseur du spectromètre de masse est un triple quadropôle. Cet analyseur permet de travailler en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) : un ion précurseur est filtré dans le premier quadropôle, il est ensuite fragmenté dans le deuxième quadropôle aussi appelé cellule de collision, enfin, les ions produits sont sélectionnés dans le troisième quadropôle. Quand la fragmentation le permet, deux transitions MRM sont suivies par composé (52).

II.1.3 - Validation analytique

La validation analytique a été réalisée selon les critères de la FDA (Food and Drug Administration) (53) et selon le principe de la mesure de l'erreur totale (54-57). Seuls les paramètres de validation exigés par la FDA ont été présentés dans la Publication 1. Nous avons utilisé le logiciel e-noval[®] (Arlenda) pour calculer les différents paramètres de la validation. Les principales caractéristiques de la méthode sont brièvement résumées au paragraphe II.3.

Paramètres étudiés lors de la validation analytique

La **fonction de réponse** est la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration de l'analyte. Elle a été établie grâce à 7 standards de calibration préparés par dilution d'une solution méthanolique contenant les différents composés dans du plasma négatif en opiacés et

réalisés en double pendant 3 jours (n = 6). Quatre types de régression ont été testés : la régression linéaire, la régression linéaire pondérée en 1/x, la régression quadratique et la régression quadratique pondérée en 1/x. La fonction de réponse la mieux adaptée pour chaque analyte est présentée dans l'annexe 1.

La **justesse** qui exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur acceptée comme telle donne une indication sur les erreurs systématiques. Les biais relatifs calculés pour chaque analyte aux différents niveaux de concentrations sont présentés dans l'annexe 2.

La **fidélité** qui exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Les coefficients de variations obtenus pour chaque analyte et pour chaque niveau de concentrations sont présentés dans l'annexe 3.1 pour la répétabilité et dans l'annexe 3.2 pour la précision intermédiaire.

L'**incertitude de mesure** caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuée au mesurande. L'incertitude de mesure étendue est présentée dans l'annexe 4.

L'**exactitude** exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également « valeur conventionnellement vraie ». L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est-à-dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude. Il est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration. La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites

d'acceptation fixées *a priori*. Les profils d'exactitude de chaque composé sont présentés dans l'annexe 5.

La **linéarité** d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon. La linéarité fait l'objet de l'annexe 6.

La justesse, la fidélité, l'incertitude de mesure et l'exactitude ont été établies grâce à 7 standards de validation préparés par dilution d'une solution méthanolique contenant les différents composés dans du plasma négatif en opiacés et réalisés en triple pendant 3 jours (n = 9).

La **stabilité** a été étudiée à 2 niveaux de concentrations pour 3 conditions de conservation : température ambiante, température de réfrigération et température de congélation. Le taux de recouvrement pour 2 niveaux de concentrations en fonction du temps de conservation sont présentés dans l'annexe 7 (7.1 pour la température ambiante, 7.2 pour la température de réfrigération, 7.3 pour la température de congélation).

Les **effets matrices**, établis selon le protocole de Matuszewski et al. (58), sont évalués sur 25 échantillons différents de plasma récolté sur fluorure de sodium. Chaque échantillon subit l'extraction puis est reconstitué dans 100 µl de phase mobile contenant les différents composés et leurs analogues deutérés. Les aires de pics ainsi obtenus sont comparées à celles fournies par une solution de même concentration, sans matrice plasmatique et sans extraction. Les effets matrices calculés pour chaque composé sont présentés dans l'annexe 8.

II.1.4 – Application de la méthode d’identification et de dosage des opiacés à 80 patients traités au CHU de Liège et pour lesquels la recherche des opiacés dans le sang était positive

La méthode d’identification et de dosage dans le sang ainsi développée et validée a été appliquée à 80 patients admis au CHU pour lesquels la recherche d’opiacés était positive.

Comme on peut le lire dans la Publication 1, les dérivés opiacés identifiés ont permis dans 86% des cas d’affirmer la nature du dérivé morphinique consommé. Pour les 14% des cas restants, on a pu confirmer la consommation d’un produit appartenant à la classe des opiacés, cependant sans pouvoir l’identifier.

PUBLICATION 1

Validation analytique d'une méthode chromatographique destinée à rechercher et à identifier les opiacés naturels ou (semi) synthétiques

N. Dubois, S. Counerotte, E. Goffin, B. Pirotte, C. Charlier

Annales de Biologie Clinique, **2014**, 72(2), 197-206

Article original

Ann Biol Clin 2014 ; 72 (2) : 197-206

Validation analytique d'une méthode chromatographique destinée à rechercher et à identifier les opiacés naturels ou (semi) synthétiques*Analytical validation of a chromatographic method dedicated to search and identify natural and semi-synthetic opiates*Nathalie Dubois¹
Stéphane Counerotte²
Eric Goffin²
Bernard Pirotte^{2,3}
Corinne Charlier^{1,3}¹ Service de toxicologie clinique, médico-légale, de l'environnement et en entreprise, CHU, Liège, Belgique <nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be>² Service de chimie pharmaceutique, Département de pharmacie, Université de Liège, Belgique³ CIRM, Université de Liège, Belgique

Résumé. L'identification de la substance absorbée par un consommateur d'opiacés peut être problématique dans la mesure où il n'existe pas de biomarqueur spécifique pour toutes les molécules. Nous avons développé une technique de chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à un spectromètre de masse en tandem qui permet l'identification et le dosage de 25 opiacés dans le plasma. La préparation de l'échantillon consiste en une extraction en phase solide sur colonnes Oasis[®] MCX (Waters). La méthode a été validée selon les critères préconisés par la FDA, complètement pour 21 substances et avec quelques réserves pour les 4 produits restants. Cette méthode a été appliquée à 80 patients traités au CHU de Liège pour lesquels la recherche d'opiacés était positive. L'identification du produit consommé a été effective dans 86 % des cas.

Mots clés : validation analytique, opiacés, identification, plasma, LC-MS

Abstract. The identification of a product absorbed by an opiate consumer is sometimes problematic since there is no specific biomarker for all molecules. We developed an ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry technique which allows the identification and the quantification of 25 opiates in plasma. The sample preparation consists in a solid-phase extraction on Oasis[®] MCX cartridges (Waters). The method has been validated according to FDA criteria completely for 21 substances and with some reservations for the remaining 4 analytes. This method has been applied to 80 patients treated at the University Hospital of Liege for whom the screening of opiates was positive. The identification of the product consumed was effective in 86% of cases.

Key words: analytical validation, opiates, identification, plasma, LC-MSArticle reçu le 04 novembre 2013,
accepté le 07 janvier 2014

La consommation d'opiacés concerne environ 16,5 millions d'individus au niveau mondial et pour la moitié d'entre eux, c'est l'héroïne qui est utilisée. Dans la plupart des pays européens, la consommation d'héroïne diminue significativement depuis 2007. Par contre, l'usage d'opiacés médicamenteux (fentanyl, buprénorphine...) augmente dans certains pays. La consommation d'opiacés naturels,

semi-synthétiques ou synthétiques, réduit significativement l'espérance de vie de leurs utilisateurs (surdose volontaire ou accidentelle, actes de violence, maladies associées à l'injection comme le VIH, les hépatites virales B et C...) [1, 2].

Les opiacés naturels (morphine, codéine, thébaïne, noscapine, papavérine...) correspondent aux substances dérivées de l'opium, extraites du suc de la capsule de pavot (*Papaverum somniferum*). Les opiacés semi-synthétiques (dihydrocodéine, éthylmorphine, héroïne, hydrocodone,

Tirés à part : N. DuboisPour citer cet article : Dubois N, Counerotte S, Goffin E, Pirotte B, Charlier C. Validation analytique d'une méthode chromatographique destinée à rechercher et à identifier les opiacés naturels ou (semi) synthétiques. *Ann Biol Clin* 2014 ; 72(2) : 197-206 doi:10.1684/abc.2014.0944

197

© John Libbey Eurotext, 2014

Article original

hydromorphone, oxycodone, pholcodine...) sont fabriqués à partir d'opiacés naturels. Les opiacés synthétiques (fentanyl, tilidine, tramadol, méthadone, buprénorphine...) réunissent tous les agonistes morphiniques qui se lient aux récepteurs opioïdes. Ils présentent une structure chimique peu comparable à celles des opiacés naturels ou semi-synthétiques mais leur action pharmacologique est identique [3].

Pour dépister les consommateurs d'opiacés, licites ou non, et identifier le produit consommé, on dispose de biomarqueurs. Mais l'interprétation des résultats obtenus est difficile voire délicate. Plusieurs exemples en apportent la preuve :

- un même biomarqueur peut être le témoin de la consommation de plusieurs substances différentes. La morphine et ses métabolites glucuro-conjugués sont des biomarqueurs qui sont présents chez les individus consommateurs d'héroïne, de codéine et de morphine ;
- la codéine, substance chimique présente dans le pavot, est acétylée en acétylcodéine pendant le processus de fabrication de l'héroïne. L'acétylcodéine est, par conséquent, un biomarqueur de la consommation d'héroïne [4] ;
- un résultat positif indiquant la consommation de papavérine et de noscapine, alcaloïdes de l'opium, peut être le signe d'une utilisation pharmacologique licite de ces substances ou, au contraire, d'une utilisation d'héroïne ;
- la méconine, principal métabolite de la noscapine, qui est également retrouvée dans le sang d'individus ayant consommé des médicaments à base de noscapine, constitue un excellent biomarqueur de la consommation récente d'héroïne [5, 6], même si la 6-acétylmorphine (6AM), premier métabolite de l'héroïne, reste la seule preuve irréfutable d'une prise d'héroïne [6] ;
- la présence de morphine et de codéine dans le sang peut être le signe d'une consommation d'héroïne (si le rapport sanguin morphine/codéine est supérieur à 1) ou de codéine (si le rapport sanguin morphine/codéine est inférieur à 1). Évidemment, une prise simultanée d'héroïne et de codéine peut conduire à une interprétation erronée de ces biomarqueurs [6-9] ;
- les analogues de la morphine comme la codéine, la dihydrocodéine, l'hydrocodone, l'hydromorphone, l'oxycodone et la pholcodine constituent une classe pharmacologique importante d'analgésiques et d'antitussifs qui sont largement utilisés en thérapeutique et représentent aussi une source d'abus importante [10, 11].

Matériels et méthode

Pour identifier et quantifier les biomarqueurs témoins de la consommation d'opiacés, nous avons mis au point une

technique de chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC/MSMS).

Réactifs et matériels de référence

Le méthanol, l'eau et l'acide formique (de qualité LC/MS) ont été fournis par Biosolve (Valkenswaard, Pays-Bas), l'acide citrique et le formiate d'ammonium (de qualité « pour analyse ») ont été obtenus chez Sigma (Steinheim, Allemagne), l'acide chlorhydrique (HCl) et l'ammoniaque (NH₄OH) ont été achetés chez VWR Int (Louvain, Belgique). Les cartouches d'extraction en phase solide, Oasis[®] MCX 30 mg, 1 mL (Mixed-Mode Cation-eXchange), ont été achetées chez Waters (Zellik, Belgique).

Pour chaque composé, nous nous sommes procurés chez LGC Promochem (Molsheim, France) les standards et analogues deutérés : 6-acétylcodéine, 6-acétylmorphine (6-acétylmorphine-d₃), buprénorphine (buprénorphine-d₄), codéine (codéine-d₃), codéine-6-glucuronide, dihydrocodéine (dihydrocodéine-d₆), EDDP (EDDP-d₃), éthylmorphine, hydrocodone (hydrocodone-d₃), hydromorphone (hydromorphone-d₃), méthadone (méthadone-d₃), morphine (morphine-d₃), morphine-6-glucuronide (morphine-6-glucuronide-d₃), morphine-3-glucuronide (morphine-3-glucuronide-d₃), naloxone (naloxone-d₅), 6β-naltrexol, naltrexone (naltrexone-d₃), norbuprénorphine, norcodéine, normorphine, noscapine, oxycodone (oxycodone-d₃), papavérine et pholcodine.

La méconine a été synthétisée dans le Laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université de Liège selon une méthode précédemment décrite [12, 13].

Préparation des solutions-mères et des solutions-standards

La solution-mère contenant les étalons internes est préparée au moyen de solutions commerciales diluées dans du méthanol pour obtenir une concentration finale :

- de 1 mg/L en 6AM-d₃, codéine-d₃, dihydrocodéine-d₆, EDDP-d₃, hydrocodone-d₃, hydromorphone-d₃, méthadone-d₃, morphine-d₃, M6G-d₃, M3G-d₃ et oxycodone-d₃ ;
- de 0,5 mg/L en naloxone-d₅ et naltrexone-d₃ ;
- de 0,1 mg/L en buprénorphine-d₄.

La courbe de calibration a été préparée en diluant la solution-mère contenant tous les produits natifs dans du plasma ne contenant pas d'opiacés (Centre de transfusion sanguine, Liège) de façon à obtenir 7 standards de calibration dont les concentrations sont indiquées dans le *tableau 1*.

Un blanc plasma a été placé dans chaque série d'analyses.

Tableau 1. Concentrations utilisées pour la validation analytique (µg/L).

	Courbes de calibration	Justesse et précision	LOQ	Stabilité	Effets matrices
Groupe 1 Codéine, Dihydrocodéine, EDDP, Hydrocodone, Méthadone, M6G, M3G, Méconine	10 – 25 – 50 – 100 – 200 – 400 – 800	75 – 300 – 600	5 – 10 – 20	15 – 600	100
Groupe 2 C6G	2,5 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 – 200	19,75 – 75 – 150	1,25 – 2,5 – 5	20 – 150	25
Groupe 3 6AM, Ethylmorphine, Hydromorphone, Morphine, Norcodéine, Normorphine, Oxycodone, Pholcodine	2 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 – 160	15 – 60 – 120	1 – 2 – 4	15 – 120	20
Groupe 4 6-acétylcodéine, Buprénorphine, Naloxone, 6β-naltrexol, Naltrexone, Norbuprénorphine, Papavérine, Noscapine	1 – 2,5 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80	7,5 – 30 – 60	0,5 – 1 – 2	15 – 60	10

EDDP : 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine ; M6G : morphine-6-glucuronide ; M3G : morphine-3-glucuronide ; 6AM : 6-acétylmorphine, C6G : codéine-6-glucuronide.

Méthode d'analyse

Préparation des échantillons

Après ajout de 50 µL de solution-mère contenant les étalons internes, 500 µL de plasma sont acidifiés par 500 µL d'HCl 0,15 N. Les cartouches d'extraction en phase solide Oasis[®] MCX sont conditionnées par 2 fois 1 mL de méthanol, par 1 mL d'eau et par 2 fois 1 mL d'acide citrique 10 mM (pH 3). Le plasma acidifié est chargé sur la colonne à un débit d'environ 1 mL/min. Puis, la cartouche est lavée avec 500 µL d'acide formique 2 %. Les analytes sont ensuite élués par 1 mL d'une solution de NH₄OH dans du méthanol (5/95 : v/v). Enfin, l'éluat est évaporé à sec sous un faible flux d'azote à 30 °C. L'extrait sec est reconstitué dans 100 µL d'un mélange de formiate d'ammonium 5 mM (pH 3) et d'acide formique à 0,1 % dans du méthanol (90/10 : v/v). Dix µL sont injectés sur la colonne chromatographique [14, 15].

Analyse par UHPLC/MSMS

L'analyse est réalisée sur une UPLC Acquity[®] couplée à un spectromètre de masse en tandem Quattro Premier[®] (Waters). La séparation chromatographique des analytes est effectuée au moyen d'une colonne Acquity[®] HSS (High Strength Silica) -T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 µm, Waters) équipée d'un filtre en ligne et placée dans un four réglé à une température de 40 °C. La phase mobile, constituée de tampon formiate d'ammonium 5 mM (pH 3) et d'acide formique à 0,1 % dans du méthanol, est délivrée selon un mode gradient à un débit constant de 0,5 mL/min (tableau 2).

Tableau 2. Gradient de la phase mobile.

Temps (min)	A (%)	B (%)
0,00	100,0	0,0
1,00	100,0	0,0
2,00	92,5	7,5
5,50	89,0	11,0
16,00	10,0	90,0
17,00	10,0	90,0
18,00	100,0	0,0
19,00	100,0	0,0

A = tampon formiate d'ammonium 5 mM pH 3 ; B = acide formique 0,1 % dans méthanol.

Après la séparation chromatographique, les composés sont analysés dans le spectromètre de masse en tandem en utilisant une source de type électrospray positif programmée à un voltage de 1 kV, à une température de source de 120 °C et à une température de désolvatation de 350 °C. Les débits du gaz de collision et du gaz de désolvatation sont respectivement fixés à 50 L/h et à 800 L/h. La méthode MS/MS est divisée en 5 segments en fonction du temps de rétention des analytes. Quand la fragmentation le permet, deux transitions (*multiple reaction monitoring* : MRM) sont suivies par molécule, l'une servant à la quantification et l'autre à la qualification. Le rapport d'intensité entre les 2 ions produits et l'ion précurseur est également contrôlé. Les temps de rétention, les transitions, les tensions de cône, les énergies de collision et les standards internes optimisés pour chaque substance recherchée sont indiqués dans le tableau 3.

Article original

Tableau 3. Temps de rétention (Tr), tension de cône (Cône) ; énergies de collision (En.1, En.2), transition de quantification (MRM1) et de qualification (MRM2) et standard interne (SI) optimisés pour chaque analyte.

Analyte	SI	Tr (min)	Cône (V)	En.1 (V)	MRM1	En.2 (V)	MRM2
6-Acétilycodéine	Codéine-d ₃	8,97	40	28	342,3 > 225,25	11	342,3 > 342,3
6AM-d ₃	-	7,20	39	24	331,2 > 211,1	-	-
6AM	6AM-d ₃	7,21	39	24	328,2 > 211,1	40	328,2 > 165,1
6-β-naltrexol	Naltrexone-d ₅	7,39	35	23	344,2 > 326,2	27	344,2 > 308,2
Buprénorphine-d ₄	-	11,45	60	42	472,2 > 400,2	-	-
Buprénorphine	Buprénorphine-d ₄	11,47	60	42	468,15 > 396,15	36	468,15 > 414,15
Codéine-d ₃	-	5,62	35	25	303,15 > 215,15	-	-
Codéine	Codéine-d ₃	5,64	39	25	300,15 > 215,15	13	300,15 > 300,15
C6G	Codéine-d ₃	5,29	35	32	476,45 > 476,4	6	476,45 > 300,7
Dihydrocodéine-d ₆	-	5,54	30	36	308,15 > 202,15	-	-
Dihydrocodéine	Dihydrocodéine-d ₆	5,56	30	32	302,15 > 199,15	9	302,15 > 302,15
EDDP-d ₃	-	10,95	35	24	281,15 > 249,2	-	-
EDDP	EDDP-d ₃	10,97	35	24	278,15 > 249,2	32	278,15 > 234,1
Ethylmorphine	Morphine-d ₃	7,76	35	12	314,25 > 314,3	-	-
Hydrocodone-d ₃	-	5,63	35	25	303,15 > 215,15	-	-
Hydrocodone	Hydrocodone-d ₃	5,65	39	25	300,15 > 215,15	13	300,15 > 300,15
Hydromorphone-d ₃	-	3,64	35	28	289,1 > 185,1	-	-
Hydromorphone	Hydromorphone-d ₃	3,66	35	31	286,1 > 185	12	286,1 > 286,1
Méconine	Codéine-d ₃	9,02	29	20	195,2 > 180,3	16	195,2 > 162,2
M3G-d ₃	-	2,52	39	33	465,1 > 289,2	-	-
M3G	M3G-d ₃	2,53	39	33	462,25 > 286,25	12	462,25 > 462,25
M6G-d ₃	-	2,91	39	33	465,1 > 289,2	-	-
M6G	M6G-d ₃	2,92	39	33	462,25 > 286,25	12	462,25 > 462,25
Méthadone-d ₃	-	12,15	25	15	313,2 > 268,2	-	-
Méthadone	Méthadone-d ₃	12,17	25	15	310,2 > 265,2	5	310,2 > 310,2
Morphine-d ₃	-	3,00	35	28	289,05 > 201,2	-	-
Morphine	Morphine-d ₃	3,01	35	29	286,1 > 201,1	12	286,1 > 286,1
Naloxone-d ₅	-	5,79	30	20	333,1 > 315,2	-	-
Naloxone	Naloxone-d ₅	5,82	30	20	328,2 > 310,2	25	328,2 > 268,3
Naltrexone-d ₃	-	6,94	37	21	345,1 > 327,2	-	-
Naltrexone	Naltrexone-d ₃	6,96	37	22	342,1 > 324,2	28	342,3 > 282,2
Norbuprénorphine	Buprénorphine-d ₄	10,57	60	35	414,4 > 101,1	65	414,4 > 83,1
Norcodéine	Codéine-d ₃	5,54	30	20	286,1 > 268,15	10	286,2 > 286,25
Normorphine	Morphine-d ₃	2,73	35	8	272,2 > 272,2	-	-
Noscapine	Codéine-d ₃	9,95	30	21	414,25 > 353,2	25	414,25 > 220,2
Oxycodone-d ₃	-	6,37	28	19	319,1 > 301,25	-	-
Oxycodone	Oxycodone-d ₃	6,39	28	19	316,25 > 298,3	30	316,25 > 241,25
Papavérine	Codéine-d ₃	9,94	40	26	340,2 > 202,2	37	340,2 > 171,1
Pholcodine	Morphine-d ₃	2,75	35	31	399,2 > 114,1	10	399,2 > 399,2

Validation analytique

La validation analytique a été réalisée selon les directives de la FDA (*Food and drug administration*) [16].

La justesse, la répétabilité et la précision intermédiaire sont évaluées à 3 niveaux de concentration, bas, moyen, haut, choisis en fonction des concentrations en analytes habituellement retrouvées chez les consommateurs d'opiacés (tableau 1). Les standards de validation sont préparés par enrichissement de plasma ne contenant pas d'opiacé avec

des solutions-mères indépendantes de celles utilisées pour la préparation des standards de calibration. Ils sont réalisés en triple pendant 3 jours (n = 9).

La justesse est évaluée par le calcul du biais. La répétabilité et la précision intermédiaire sont appréciées par la mesure du coefficient de variation (CV). Le biais et les CV sont jugés acceptables s'ils sont inférieurs à 15 %.

La limite de quantification (LOQ) est la plus petite concentration pour laquelle le biais et le CV sont inférieurs à 20 %.

Elle est calculée à l'aide d'échantillons de plasma ne contenant pas d'opiacé et enrichis à 3 niveaux de concentrations (tableau 1) analysés en triple pendant 3 jours (n = 9).

La stabilité est étudiée à 2 niveaux de concentrations (tableau 1). Trois conditions de conservation sont retenues : la température ambiante pendant 6 heures, la température de réfrigération (2-8 °C) pendant 3 jours et la température de congélation (-20 °C) pendant 8 semaines. Cinq aliquots des deux niveaux de concentration ont été stockés aux conditions décrites dans le tableau 4. Tous les échantillons sont analysés au temps initial (T₀). Un taux de recouvrement, rapport entre la concentration moyenne des résultats obtenus à une condition de temps et la concentration moyenne des résultats obtenus à T₀ multiplié par 100, est calculé. Les analytes sont jugés stables si le taux de recouvrement ne dépasse pas les limites d'acceptation fixées à 30 % équivalant à la somme des erreurs systématique (biais) et aléatoire (CV) tolérées lors de la validation analytique (FDA [16]). Les résultats obtenus pour des échantillons enrichis sont confirmés par l'étude de dix échantillons provenant de patients traités au CHU de Liège qui ont été analysés dans les mêmes conditions.

Les effets matrices, établis selon le protocole de Matuszewski *et al.* [17], sont évalués sur 25 échantillons différents enrichis à une concentration différente pour les 4 groupes d'analytes (tableau 1). Chaque échantillon subit l'extraction puis est reconstitué dans 100 µL de phase mobile contenant les différents composés et leurs analogues deutérés. Les aires de pics ainsi obtenues sont comparées à celles fournies par une solution de même concentration, sans matrice plasmatique et sans extraction.

Résultats et discussion

Validation analytique

La méthode chromatographique décrite permet de séparer 25 opiacés et leurs 14 analogues deutérés en 19 minutes. Le chromatogramme d'un standard de calibration à 100 µg/L pour le 1^{er} groupe de molécules, à 25 µg/L pour le deuxième groupe, à 20 µg/L pour le troisième groupe et à 10 µg/L pour le quatrième groupe est présenté sur la figure 1. Des temps

de rétention différents permettent de séparer les analytes possédant les mêmes transitions MRM.

Au moyen des standards de calibration, le modèle de régression convenant le mieux pour quantifier les différentes molécules est établi :

- modèle linéaire pondéré en 1/x pour la 6-acétylcodéine, la 6AM, la buprénorphine, l'éthylmorphine, l'hydrocodone, l'hydromorphone, la méconine, la méthadone, la M3G, la morphine, la naloxone, le β-naltrexol, la naltrexone et la pholcodine ;
- modèle de régression quadratique pour la C6G, l'EDDP et la norbuprénorphine ;
- modèle de régression quadratique pondéré en 1/x pour la codéine, la dihydrocodéine, la M6G, la norcodéine, la normorphine, la noscapine, l'oxycodone et la papavérine.

Le tableau 5 résume l'ensemble des données relatives à la sensibilité, la justesse et la précision :

- la sensibilité est satisfaisante, avec des limites de détection comprises entre 0,25 et 5,0 µg/L et des limites de quantification situées entre 1,0 et 20,0 µg/L ;
- la justesse et la précision de la méthode sont variables :
 - tout d'abord, 18 des 25 substances étudiées (6AM, buprénorphine, codéine, dihydrocodéine, EDDP, hydrocodone, hydromorphone, M3G, M6G, méthadone, morphine, naloxone, β-naltrexol, naltrexone, norcodéine, noscapine, oxycodone et papavérine) répondent parfaitement aux critères d'acceptabilité proposés par la FDA (biais et CV pour la répétabilité et pour la précision intermédiaire inférieurs ou égaux à 15 %) ;
 - ensuite, 4 autres molécules (6-acétylcodéine, C6G, normorphine et pholcodine) s'écartent légèrement des critères d'acceptabilité FDA puisque les CV et les biais sont compris entre 15 et 20 % ;
 - enfin, l'éthylmorphine, la méconine et la norbuprénorphine se caractérisent par biais et CV supérieurs à 20 %.

L'étude de stabilité a montré que tous les analytes sont stables :

- au moins pendant 6 heures à température ambiante ;
- au moins pendant 3 jours à température de réfrigération ;
- au moins pendant 8 semaines à température de congélation.

Les effets matrices, présentés dans le tableau 5, peuvent se résumer de la façon suivante :

Tableau 4. Étude de stabilité des échantillons biologiques.

Température ambiante	Plasmas enrichis	T ₀	T ₀ + 2 h	T ₀ + 4 h	T ₀ + 6 h				
Température de réfrigération	Plasmas enrichis	T ₀	T ₀ + 1 j	T ₀ + 2 j	T ₀ + 3 j				
Température de congélation	Plasmas enrichis	T ₀	T ₀ + 1 sem	T ₀ + 2 sem	T ₀ + 3 sem	T ₀ + 5 sem	T ₀ + 7 sem	T ₀ + 9 sem	T ₀ + 11 sem

T₀ : temps initial, h : heures, j : jours, sem : semaines.

Article original

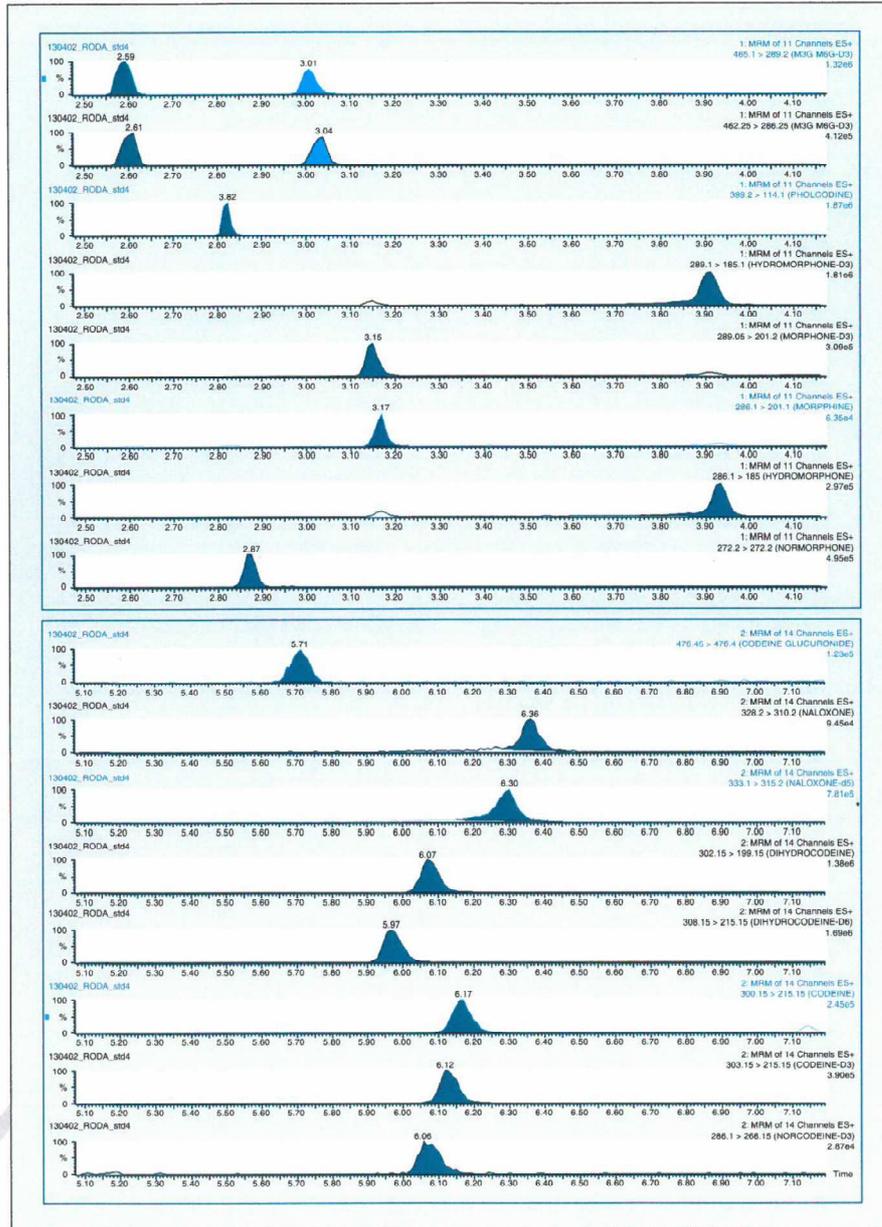


Figure 1. Chromatogramme des analytes divisés en 5 segments de temps.

Méthode pour l'identification des opiacés chez l'homme

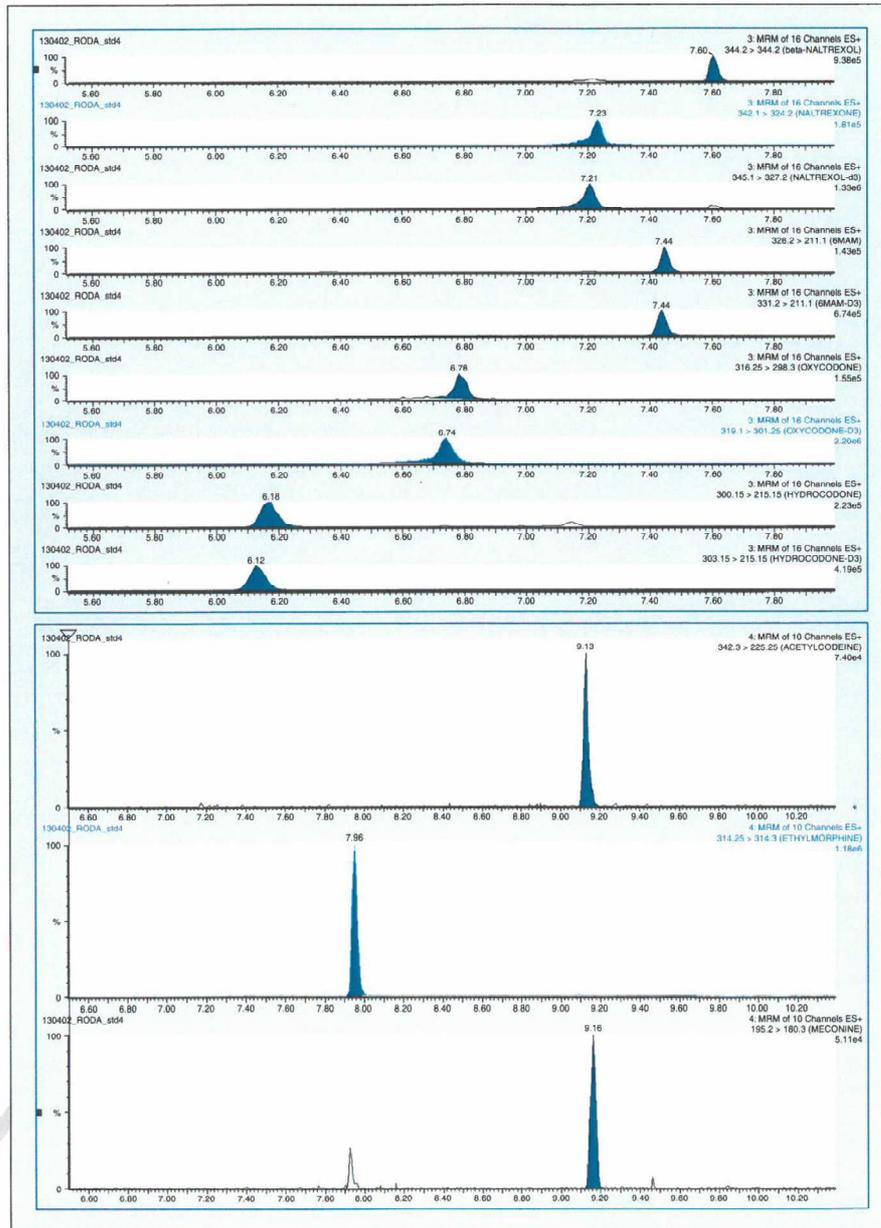


Figure 1. (suite)

Article original

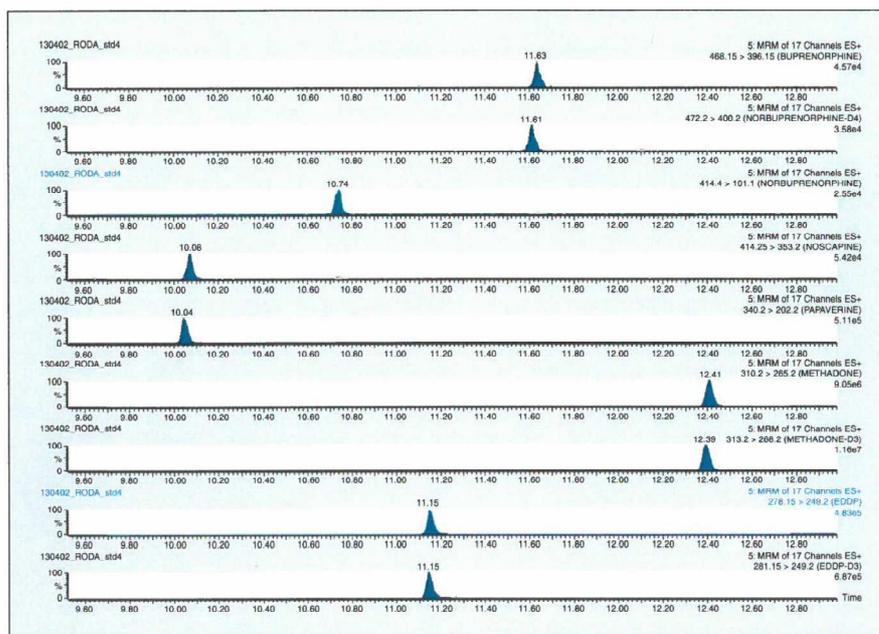


Figure 1. (suite)

- ils sont bien maîtrisés (effet matrice moyen compris entre 93,3 % et 106,2 % et une variation de l'effet matrice d'un échantillon à l'autre inférieure à 15 % [18]) pour la 6AM, la buprénorphine, la codéine, la dihydrocodéine, l'EDDP, l'hydrocodone, l'hydromorphone, la M3G, la M6G, la méthadone, la morphine, la naloxone, la naltrexone, la norbuprénorphine, la normorphine et l'oxycodone ;
- il existe un effet suppresseur d'ionisation (EM < 100 %) avec une fluctuation de l'effet inférieure à 15 % pour la 6-acétylcodéine, la noscapine et la papavérine ;
- on note une amplification d'ionisation (EM > 100 %) avec une fluctuation de l'effet inférieure à 15 % pour la pholcodine ;
- on constate une fluctuation de l'effet matrice supérieure à 15 % pour la codéine-6-glucuronide, l'éthylmorphine et la méconine (leur quantification est dans ce cas problématique).

Application de la méthode décrite à la mise en évidence de consommation d'opiacés

Sur les 1 244 recherches d'opiacés plasmatiques effectuées au laboratoire de toxicologie du CHU de Liège entre le 1^{er} novembre 2012 et le 30 juin 2013, on a pu mettre en évi-

dence la présence d'opiacés chez 145 patients (11,6 %). Le tramadol a été recherché et quantifié par la méthode basée sur de la chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC/DAD) utilisée au laboratoire pour dépister les intoxications médicamenteuses. Les autres opiacés ont été identifiés grâce à la méthode UHPLC/MSMS faisant l'objet de ce travail.

Sur les 145 résultats positifs :

- 65 (5,2 %) avaient reçu du tramadol seul ;
- 8 (0,6 %) avaient pris du tramadol associé à un autre opiacé ;
- 72 (5,8 %) avaient consommé un ou plusieurs opiacés autres que le tramadol.

Parmi les 80 sujets à avoir pris un opiacé autre que le tramadol, ou plusieurs opiacés dont parfois le tramadol associé à une autre substance, on dénombre :

- 11 individus qui ont consommé de l'héroïne (objectivée par la présence de méconine) ;
- 33 sujets qui ont reçu de la codéine (présence de codéine avec un rapport entre la concentration de morphine totale et la concentration de codéine totale inférieur à 1) ;
- 32 personnes qui ont utilisé de la méthadone ;
- 3 individus qui ont été traités par de la dihydrocodéine et 3 autres par de l'oxycodone ;

– 1 patient qui a ingéré de la pholcodine et un autre de l'éthylmorphine ;
 – enfin 11 sujets (13,7 %) pour lesquels on ne peut identifier le produit consommé et chez qui on a mis en évidence de la morphine libre et/ou conjuguée non associée à de la codéine ou à de la méconine.

Conclusion

Dans la technique que nous proposons, la préparation de l'échantillon biologique est rapide puisqu'elle consiste en une simple extraction en phase solide. Contrairement aux méthodes basées sur de la chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse, la méthode UHPLC développée ne nécessite pas la mise en œuvre d'une étape de dérivation, particulièrement chronophage. De plus, les dérivés glucuro-conjugués de la morphine et de la codéine étant recherchés, une étape d'hydrolyse n'est plus néces-

saire. Or, pour interpréter la toxicité de l'héroïne et de la morphine [10], il est préférable de séparer les deux dérivés glucuroconjugués de la morphine plutôt que de doser la morphine totale, ce qui est réalisable avec une colonne chromatographique Acquity® HSS-T3 séparant efficacement des composés polaires, tels que la M3G et la M6G, non retenus par les colonnes apolaires classiques. En un temps relativement court (19 minutes), la séparation chromatographique des composés ayant les mêmes transitions MRM peut se faire.

La validation analytique de la technique répond aux objectifs FDA pour toutes les molécules étudiées à l'exception de la codéine-6-glucuronide, l'éthylmorphine, la méconine et la norbuprénorphine. Mais pour ces 4 molécules, la performance analytique de la méthode (justesse, précision, effets matrices) sera grandement améliorée si on utilise des standards internes deutérés.

L'identification du (ou des) produit(s) consommé(s) par 80 patients a été effective dans 86 % des cas :

Tableau 5. Résultats de la validation analytique.

Molécules	Sensibilité		Justesse Biases (%) (n = 9)			Répétabilité CV (%) (n = 9)			Précision intermédiaire CV (%) (n = 9)			Effet matrice (n = 25)	
	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Bas	Moyen	Haut	Bas	Moyen	Haut	Bas	Moyen	Haut	Moyenne (%)	CV (%)
6-acétylcodéine	0,25	2,0	16,00	8,29	16,17	2,04	6,82	6,60	19,90	13,56	13,50	34,5	10,75
6AM	0,5	1,0	8,23	-2,50	7,77	7,84	7,27	6,26	8,65	9,56	9,90	102,0	3,58
6-β-naltrexol	0,25	1,0	10,52	-8,92	-1,43	7,05	6,55	7,70	10,25	8,07	10,01	98,8	6,18
Buprénorphine	0,25	1,0	10,23	-6,03	2,96	10,57	12,02	11,27	10,57	14,13	15,40	96,7	6,04
Codéine	1,0	5,0	3,58	-6,49	2,53	4,88	6,74	5,25	7,17	6,74	6,54	102,6	2,95
C6G	5,0	19,75	13,78	19,90	8,24	7,05	8,57	7,69	12,18	13,32	7,69	45,4	23,9
Dihydrocodéine	2,0	10,0	5,53	-9,54	-3,41	4,23	6,16	6,32	4,23	12,89	10,11	98,8	11,41
EDDP	5,0	10,0	5,96	5,95	7,00	8,29	15,33	1,10	13,66	15,33	15,80	96,9	2,94
Ethylmorphine	1,0	-	28,86	7,17	14,11	8,62	11,31	8,53	19,94	15,23	20,31	76,1	23,59
Hydrocodone	2,0	5,0	2,74	-5,20	4,96	9,18	9,55	9,68	14,55	12,24	9,78	106,2	4,80
Hydromorphone	0,5	2,0	1,84	-8,18	2,06	4,13	5,91	6,49	5,62	10,64	9,18	98,6	5,20
Méconine	5,0	-	12,27	5,57	12,36	15,09	9,79	8,27	25,17	19,06	19,17	40,1	25,22
M3G	1,0	10,0	13,76	-3,27	7,47	5,52	5,23	6,02	11,50	8,47	9,47	93,3	5,92
M6G	1,0	10,0	5,07	-2,50	8,31	4,64	6,74	5,57	8,96	9,66	8,87	102,5	4,61
Méthadone	1,0	10,0	12,17	-3,09	5,67	3,33	5,08	6,41	8,70	5,59	8,76	98,1	1,47
Morphine	0,5	4,0	8,35	-6,60	6,18	6,64	4,24	7,10	6,64	11,45	11,63	99,2	11,24
Naloxone	0,5	1,0	13,63	2,50	2,95	5,79	4,96	4,82	12,36	11,15	11,29	110,8	6,68
Naltrexone	0,5	1,0	8,85	-2,75	3,58	2,08	6,35	2,70	3,15	6,35	2,70	103,4	3,98
Norbuprénorphine	0,5	-	22,33	13,29	12,81	2,67	8,94	9,79	8,94	10,81	6,68	114,1	11,96
Norcodéine	0,5	4,0	13,82	-2,51	4,83	13,26	3,66	7,73	14,92	10,32	11,19	104,4	10,65
Normorphine	0,5	2,0	16,00	4,37	7,38	1,64	8,16	6,59	3,73	11,98	9,05	105,7	15,05
Noscapine	0,25	1,0	13,92	2,73	7,44	5,20	8,58	6,54	10,32	8,58	11,14	35,9	12,75
Oxycodone	1,0	2,0	7,33	-4,10	9,09	7,91	7,71	6,00	9,57	12,79	8,10	105,0	3,60
Papavérine	0,25	1,0	10,93	0,80	6,54	4,29	8,61	5,78	6,84	8,67	11,14	37,5	7,91
Pholcodine	0,25	4,0	17,46	18,70	3,54	11,12	7,66	2,64	15,54	15,10	2,64	246,7	9,25

En italique : valeurs « hors-limites ».

Article original

– la 6-AM, seul biomarqueur spécifique d'une consommation d'héroïne, n'a été retrouvée que chez un seul patient ;
 – même si la méconine est une des 4 substances pour lesquelles les objectifs analytiques de la méthode n'ont pas été atteints, son identification correspond malgré tout à une preuve de consommation d'héroïne ;
 – la 6-acétylcodéine n'a été retrouvée chez aucun des 80 patients étudiés.

Au total, nous avons validé et développé une méthode de dosage de 25 dérivés opiacés, accessible en routine, et qui permet, grâce à la grande variabilité des molécules recherchées, d'identifier dans 86 % des cas le produit consommé.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. United nations office on drugs and crime. World drug report, 2013. Vienne : United Nations, 2013 : x.
2. Hall W, Doran C, Degenhardt L, Shepard D. *Disease control priorities in developing countries*. 2nd edition. Washington (DC) : World Bank, 2006 : 907-931.
3. Scidenberg A, Honegger U. *Méthadone, héroïne et autres opioïdes. La prescription des opioïdes en milieu ambulatoire*. Genève : Médecine et hygiène, 2008.
4. Rook E, Huitema A, van den Brinck W, Hillebrand M, van Ree J, Beijnen J. Screening for illicit heroin use in patients in a heroin-assisted treatment program. *J Anal Toxicol* 2006 ; 30 : 390-4.
5. Morley S, Forrest R, Galloway J. Validation of meconin as a marker for illicit opiate use. *J Anal Toxicol* 2007 ; 31 : 105-8.
6. Stefanidou M, Athanasis S, Spiliopoulou C, Dona A, Maravelias C. Biomarkers of opiate use. *Int J Clin Pract* 2010 ; 64 : 1712-8.
7. Wyman J, Bultman S. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid and vitreous humor. *J Anal Toxicol* 2004 ; 28 : 260-3.
8. Konstantinova SV, Normann PT, Arnestad M, Karinen R, Christophersen AS, Morland J. Morphine to codeine concentration ratio in blood and urine as a marker of illicit heroin use in forensic autopsy samples. *Forensic Sci Int* 2012 ; 217 : 216-21.
9. Jones AW, Holmgren A. Concentration ratios of free-morphine to free-codeine in femoral blood in heroin-related death. *Leg Med* 2011 ; 13 : 171-3.
10. Drummer O. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int* 2004 ; 142 : 101-13.
11. Drummer O. Recent trends in narcotic deaths. *Ther Drug Monit* 2005 ; 27 : 738-40.
12. MacCarthy JR, Moore JL, Cregge RJ. A convenient new method for converting aromatic methyl ethers to phenols with sodium cyanide-dimethylsulfoxide. *Tetrahedron Lett* 1978 ; 52 : 5183-6.
13. Orito K, Miyazawa M, Sugimoto H. Studies on carboxylation of alkoxy-substituted benzyl alcohols via direct lithiation and bromine-lithium exchange : synthesis of phthalides and phthalidisoquinoline alkaloids. *Tetrahedron* 1995 ; 51 : 2489-96.
14. 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 : 25-38.
15. Rook E, Hillebrand M, Rosing H, van Ree J, Beijnen J. 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 Chromatograph B Biomed Sci Appl* 2005 ; 824 : 213-21.
16. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.
17. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003 ; 75 : 3019-30.
18. Meng M, Bennett PK. *Method development, validation and sample analysis for regulated quantitative bioanalysis using LS-MS/MS in LC/MS in drug bioanalysis*. In : Xu A, Madden T, eds. New-York : Springer Science + Business Media, LLC 2012.

II.2 – Identification et dosage des opiacés associés aux principales drogues illicites (cocaïne, amphétamines, cannabis) dans le sang

Les usagers problématiques d'héroïne sont généralement polyconsommateurs, utilisant fréquemment d'autres drogues illicites, cocaïne, amphétamines ou cannabis, qui peuvent modifier les effets et la pharmacocinétique de l'héroïne.

Nous avons donc développé une technique chromatographique dédiée à l'identification et au dosage non seulement des opiacés mais aussi de la cocaïne et des amphétamines dans le sang (Publication 2). Les propriétés physicochimiques des cannabinoïdes imposent une méthode spécifique d'identification et de dosage (Publication 3).

Les caractéristiques de ces deux méthodes sont présentées de façon sommaire au paragraphe II.3.

II.2.1 – Identification et dosage de la cocaïne, des opiacés et des amphétamines dans le sang

En plus des opiacés habituellement consommés, cette méthode permet l'identification et le dosage de la cocaïne et de deux de ses métabolites, la benzoylecgonine et le cocaéthylène, ainsi que des principales amphétamines : amphétamine, méthamphétamine, 3,4-méthylènedioxyméthamphétamine (MDMA), méthylènedioxyamphétamine (MDA), et N-méthyl-1-(3,4-méthylènedioxyphényl)-2-butamine (MBDB).

C'est une méthode générique de recherche et de dosage des opiacés, elle ne permet donc pas de prouver formellement une consommation d'héroïne puisque ni les alcaloïdes du pavot - la papavérine, la noscapine et son principal métabolite, la méconine - ni le dérivé glucuroconjugué de la codéine, la codéine-6-glucuronide, ne sont mis en évidence.

Cette technique est similaire à celle décrite dans le paragraphe II.1. en termes de préparation d'échantillon et de méthode UPLC. Seule la programmation du spectromètre de masse change pour permettre l'analyse de la cocaïne, de ses métabolites et des dérivés amphétaminiques. On pourrait se dire qu'il aurait été plus élégant et plus efficace de regrouper en une seule méthode les techniques décrites aux paragraphes II.1. et II.2.1. Cependant, le nombre d'analytes avec des temps de rétention proches les uns des autres empêche ce regroupement. En effet, le nombre de fragmentations qu'il aurait fallu suivre sur le même segment de temps aurait dépassé 19, le nombre maximum de transitions que le spectromètre de masse est capable de suivre en même temps.

PUBLICATION 2

Validated quantitative simultaneous determination of cocaine, opiates and amphetamines in serum by U-HPLC coupled to tandem mass spectrometry

N. Dubois, B. Debrus, Ph. Hubert, C. Charlier

Acta Clinica Belgica, **2010**, 65, supplement 1, 75-84

Forensic toxicology

VALIDATED QUANTITATIVE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF COCAINE, OPIATES AND AMPHETAMINES IN SERUM BY U-HPLC COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRYN. Dubois¹, B. Debrus^{2,3}, Ph. Hubert^{2,3}, C. Charlier^{1,3}**Key words:** Cocaine, opiates, amphetamines, UHPLC-MS/MS method, validation, total error**ABSTRACT**

Simultaneous determination of cocaine, opiates and amphetamines in serum by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) allowed to replace favourably gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) used until now in our laboratory. It had to answer to accreditation demand according to Belgian Accreditation (Belac).

Twenty-one deuterated internal standards were added to 500µL of serum. Sample pre-treatment consisted of solid-phase extraction using Oasis MCX cartridges 1mL, 30mg (Waters, Zellik, Belgium). Chromatographic separation was done on an Acquity HSS T3 column (2.1 x 100mm, 1.8µm,

Waters). Mobile phase consisted of pH 3 ammonium formate buffer and of methanol adjusted to pH 3 with formic acid. Compounds were next analysed by tandem mass spectrometry operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method was validated using total error approach.

Twenty-seven drugs were separated in 19 minutes. The linearity of the method was acceptable in the validated range of concentrations. The bias and the relative standard deviations for repeatability and intermediate precision were acceptable. Lower and upper β -expectation tolerance limits did not exceed the acceptance limits of 20% for concentrations upper than 20µg/L and 50% for concentrations lower than 20µg/L. The limits of quantitation were lower than 7µg/L for all compounds.

1 Service de Toxicologie Clinique, Médicolégale, de l'Environnement et en Entreprise, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgique.

2 Service de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, Université de Liège, Belgique.

3 CIRIM, Université de Liège, Belgique.

Address for Correspondence

N. Dubois
Service de Toxicologie Clinique, Médicolégale,
de l'Environnement et en Entreprise.
CHU Sart-Tilman B35, Tour II, +5
B-4000 Liège
Belgique
Tél.: +32 4 366 76 80
Fax: + 32 4 366 88 89
E-mail: nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be

INTRODUCTION

The use of drugs of abuse is increasing worldwide and causing serious social problems. About 3.9% of European adults would have used cocaine last year (1). Benzoylcegonine is one of the major metabolites of cocaine formed by either spontaneous hydrolysis or by hepatic carboxyesterase enzymes. When cocaine is co-administered with alcohol, cocaethylene is formed in the body (2). About 3.1% of European adults would have used ecstasy and related compounds last year (1). During the last two decades, the abuse of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) - prototype of designer drugs - has increased considerably. Some homologous compounds with similar effects, such as

methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) and N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamine (MBDB) have also appeared on the market, but are less often used (3). The number of opioid users is estimated at between 1.2 and 1.5 millions in Europe and about 650000 of them would have received substitution treatment in 2007. Heroin accounts for the greatest share of morbidity and mortality related to drug use in the European Union (1). Once in the body, heroin is very rapidly converted by deacetylation using a plasmatic esterase to form 6-acetylmorphine (6-MAM), which is hydrolyzed into morphine with a hepatic esterase. Morphine is quickly converted to its principal metabolite, morphine-3-glucuronide (M3G) and somewhat more slowly to smaller amounts of morphine-6-glucuronide (M6G). According to the report of the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction published in November 2009 (1), polydrug patterns are today the norm in Europe and the combined use of different substances is responsible for, or complicates, most of the problems Europe faces.

To our knowledge only a few methods allowed simultaneous determination of drugs of abuse in biological fluids (4,5,6). The aim of this method was to allow simultaneously the quantitative determination of cocaine and two of its metabolites - benzoylecgonine and cocaethylene - of amphetamines commonly used in Europe - amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA and MBDB - and of heroin and its metabolites - 6-MAM, morphine, M3G and M6G. Others opioids were added to the method: hydromorphone, pholcodine, codeine, dihydrocodeine, hydrocodone, oxycodone, ethylmorphine and drugs used for substitution treatment: methadone and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) and buprenorphine and its metabolite norbuprenorphine. Naloxone and naltrexone, two narcotic antagonists, were also quantified. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) had been widely used for many years, (7,8) but, recently, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was becoming increasingly important for the quantitative determination of drugs of abuse (2-6,9). The technology we had chosen for the quantification of 27 compounds was the ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). It replaced favourably GC-MS techniques used until now in our laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Reference materials for all compounds and internal standards were purchased from LGC Promochem (Molsheim, France). All standards had a degree of purity upper than 99%.

Methanol, water and formic acid (LC-MS grade) were purchased from Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands); citric acid and ammonium formate, at least of analytical grade, were purchased from Sigma (Steinheim, Germany), ammonia from VWR. Int. (Leuven, Belgium). Solid phase extraction (SPE) cartridges, Oasis MCX (30mg, 1mL), were obtained from Waters (Zellik, Belgium).

Stock solutions and standards

For the preparation of the stock solution of internal standard, commercial solutions of cocaine-d₃, benzoylecgonine-d₃, cocaethylene-d₃, morphine-d₃, codeine-d₃, 6-acetylmorphine-d₃, heroin-d₉, oxycodone-d₃, hydromorphone-d₃, dihydrocodeine-d₆, hydrocodone-d₃, methadone-d₃, EDDP-d₃, morphine-6-glucuronide-d₃, morphine-3glucuronide-d₃, amphetamine-d₈, methamphetamine-d₈, MDMA-d₅, MDA-d₅, MBDB-d₅ and buprenorphine-d₄ were diluted in methanol. Concentration of the internal standard stock solution was 1mg/L for all compounds except for buprenorphine-d₄ (100µg/L).

Calibration standards and validation standards were prepared by spiking drug-free serum with stock solution containing all the compounds. The first group of analytes was constituted of amphetamine (AMP), methamphetamine (MAMP), MDMA, MDA, MBDB, 6-acetylmorphine (6MAM), morphine (MOR), oxycodone (OCOD) and hydromorphone (HMOR); the second group of cocaine (COC), benzoylecgonine (BZE), cocaethylene (COET), codeine (COD), norcodeine (NCOD), 6-acetylcodeine (6ACOD), dihydrocodeine (DHCOD), hydrocodone (HCOD), ethylmorphine (EMOR), pholcodine (PHOL), methadone (METHA), EDDP, M3G, M6G, naloxone and naltrexone and the third one of buprenorphine (BUP) and norbuprenorphine (NBUP). Group constitution depends on the expected analyte concentration. Calibration standards were prepared to obtain final concentration of 2, 5, 10, 20, 40 and 80µg/L for group 1; 10, 25, 50, 100, 200 and 400µg/L for group 2; 1, 2.5, 5, 10, 20 and 40µg/L for group 3; they were analyzed in duplicate for three days and were used to establish the calibration curves

Table 2 – Retention times and MRM transitions of each analyte and internal standard (IS)

Compound	Internal std	Ret. time (min.)	Cone voltage (V)	MRM1	Collision energy (V)	MRM2	Collision energy (V)
M3G-d ₃	-	2.86	39	465.10>289.20	33	-	-
M6G-d ₃	-	3.29	39	465.10>289.20	33	-	-
M3G	M3G-d ₃	2.88 3.31	39	462.25>462.25	12	462.25>286.25	33
M6G	M6G-d ₃	2.88 3.31	39	462.25>462.25	12	462.25>286.25	33
Pholcodine	Morphine-d ₃	3.00	35	399.20>399.20	10	399.2>114.10	31
Morphine-d ₃	-	3.40	35	289.05>201.20	28	-	-
Morphine	Morphine-d ₃	3.41	35	286.10>286.10	12	286.10>201.10	29
Hydromorphone-d ₃	-	4.18	35	289.10>185.10	28	-	-
Hydromorphone	Hydromorphone-d ₃	4.20	35	286.10>286.10	12	286.10>185.00	31
Norcodeine	Codeine-d ₃	6.42	30	286.20>286.25	10	286.20>268.15	20
Dihydrocodeine-d ₆	-	6.42	30	308.15>202.15	32	-	-
Dihydrocodeine	Dihydrocodéine-d ₆	6.44	30	302.15>302.15	9	302.15>199.15	32
Codeine-d ₃	-	6.50	35	303.15>215.15	25	-	-
Codeine	Codeine-d ₃	6.52	35	300.15>300.15	13	300.15>215.15	25
Naloxone	Codeine-d ₃	6.62	27	328.10>328.30	8	328.10>114.10	20
Oxycodone-d ₃	-	7.01	28	319.10>301.25	18	-	-
Oxycodone	Oxycodone-d ₃	7.03	28	316.25>298.30	19	316.25>241.25	30
Hydrocodone-d ₃	-	7.33	35	303.15>215.15	25	-	-
Hydrocodone	Hydrocodone-d ₃	7.35	39	300.15>300.15	13	300.15>215.15	25
Amphetamine-d ₈	-	6.85	16	144.00>127.10	8	-	-
Amphetamine	Amphetamine-d ₈	6.87	16	136.00>119.10	8	136.00>91.00	16
Methamphetamine-d ₈	-	7.34	19	158.00>124.05	11	-	-
Methamphetamine	Methamphetamine-d ₈	7.36	19	150.00>119.10	11	150.00>91.00	20
Naltrexone	Codeine-d ₃	7.42	27	342.15>342.15	10	342.15>324.15	21
MDA-d ₅	-	7.47	15	185.00>168.05	11	-	-
MDA	MDA-d ₅	7.49	15	180.00>163.10	11	180.00>105.00	23
6-MAM-d ₃	-	7.61	39	331.20>211.10	24	-	-
6-MAM	6-MAM-d ₃	7.63	39	328.20>211.10	24	328.20>165.10	40
MDMA-d ₅	-	7.70	20	199.05>165.05	13	-	-
MDMA	MDMA-d ₅	7.72	20	194.05>163.05	13	194.05>105.00	24
Ethylmorphine	Codeine-d ₃	8.19	35	314.25>314.30	12	-	-
Benzoylcegonine-d ₃	-	8.88	26	293.00>171.10	18	-	-
Benzoylcegonine	Benzoylcegonine-d ₃	8.90	26	290.20>168.15	18	290.20>105.10	30
MBDB-d ₅	-	8.98	18	213.10>179.10	11	-	-
MBDB	MBDB-d ₅	9.00	18	208.20>177.15	11	208.20>135.10	11
Acetylcodeine	Codeine-d ₃	9.43	40	342.30>342.30	11	342.30>225.25	28
Cocaine-d ₃	-	9.55	27	307.10>185.10	21	-	-
Cocaine	Cocaine-d ₃	9.57	27	304.20>182.15	21	304.20>82.15	32
Cocaethylene-d ₃	-	10.43	30	321.15>199.15	19	-	-
Cocaethylene	Cocaethylene-d ₃	10.45	30	318.25>196.20	19	318.25>82.15	30
Buprenorphine-d ₄	-	11.98	60	472.20>400.20	42	-	-
Buprenorphine	Buprenorphine-d ₄	12.00	60	468.15>414.15	36	468.15>396.15	42
Norbuprenorphine	Buprenorphine-d ₄	11.14	60	414.40>101.10	35	414.40>83.10	65
EDDP-d ₃	-	11.57	35	281.15>249.20	24	-	-
EDDP	EDDP-d ₃	11.59	35	278.15>249.20	24	278.15>234.10	32
Methadone-d ₃	-	12.82	25	313.20>268.20	15	-	-
Methadone	Methadone-d ₃	12.84	25	310.20>310.20	5	310.20>265.20	15

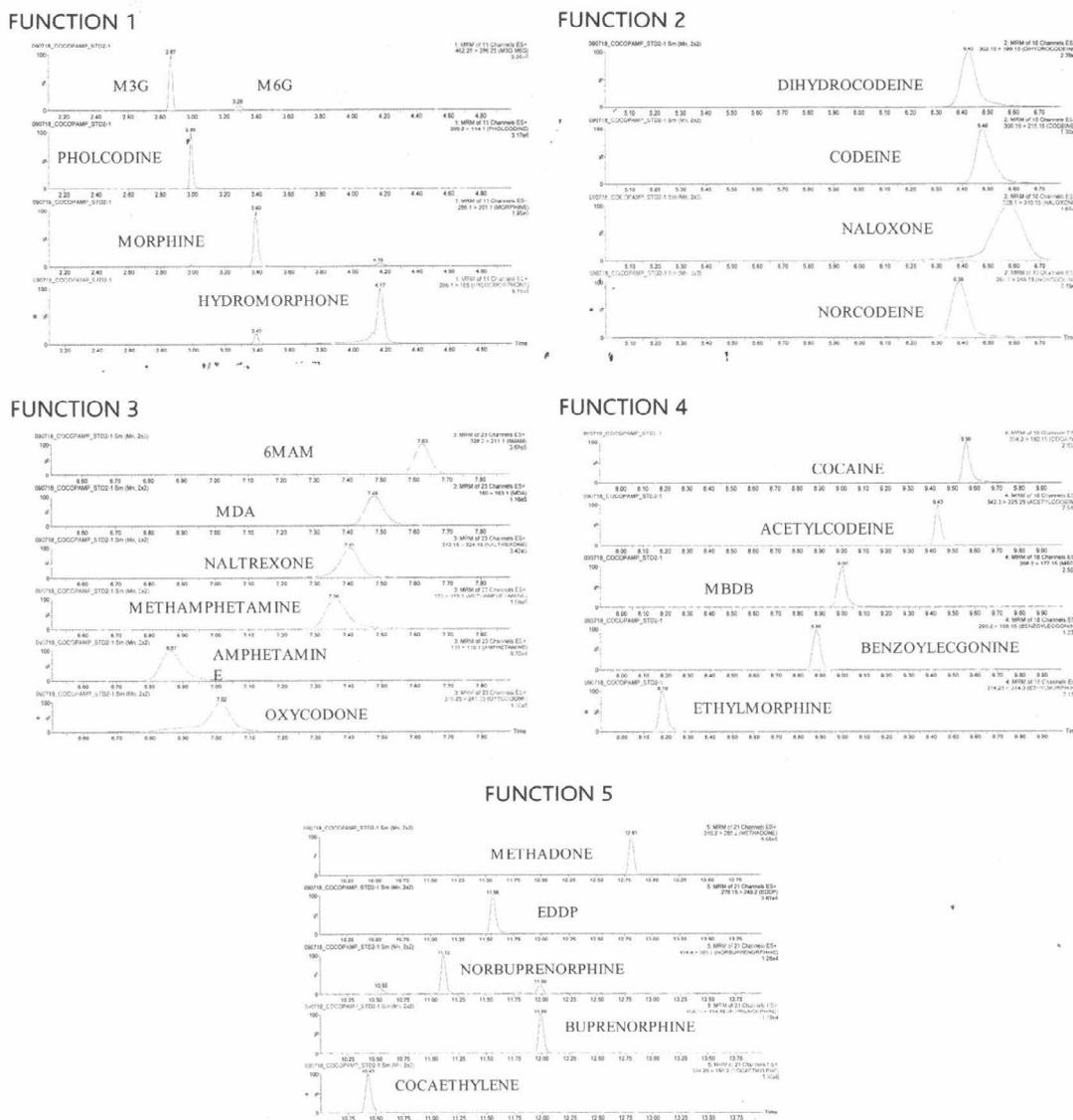


Figure 1 – Chromatogram example of an extracted spiked serum

Trueness is expressed in terms of relative bias (systematic error) (11). Trueness was acceptable for all compounds, since the relative biases were always smaller than 19% for concentrations lower than 20µg/L and than 12% for concentrations upper than 20µg/L. Results are presented in Table 2.

The precision was determined by computing the Relative Standard Deviations (RSDs) for repeatability and intermediate precision at each concentration level

of the validation standards (13). They did not exceed 20% for concentrations lower than 20µg/L and 8% for concentrations upper than 20µg/L for repeatability; they did not exceed 30% for concentrations lower than 20µg/L and 15% for concentrations upper than 20µg/L for intermediate precision. RSDs are presented in Table 2.

The uncertainty characterizes the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the

Table 3 Trueness, precision, uncertainty of measurement, lower- and upper- limit of quantitation
Group 1

	Target conc. µg/L	AMP	MAMP	MDMA	MDA	MBDB	6MAM	MOR	OCOD	HMOR
Trueness Relative bias (%)	1.0	2.77	0.00	11.51	15.34	2.15	18.43	-2.58	7.87	-12.18
	2.0	-3.87	-9.79	-2.11	1.90	-3.98	1.50	-8.21	1.79	-8.72
	4.0	1.70	-0.13	1.45	1.39	0.06	1.77	-3.58	3.42	-2.42
	6.0	3.67	0.58	1.63	0.51	4.30	3.21	-0.40	6.26	-2.14
	10.0	0.62	2.85	1.22	-2.27	2.82	-1.79	-0.41	3.70	-3.30
	30.0	6.81	6.05	5.78	5.52	4.63	5.25	3.43	2.38	6.83
	60.0	8.81	4.47	4.85	7.32	4.90	4.28	7.36	3.14	2.32
	100.0	4.87	2.51	6.40	6.71	2.69	5.26	9.24	-0.85	6.52
Intra-assay precision Repeatability (RSD%)	1.0	10.65	6.69	2.86	6.59	5.71	7.19	10.87	1.88	7.24
	2.0	3.15	4.14	2.92	2.34	2.85	4.50	5.90	5.65	5.57
	4.0	5.09	4.50	2.58	5.11	3.52	2.47	3.37	6.15	8.39
	6.0	6.78	4.09	4.73	5.44	4.49	3.64	3.47	0.56	3.90
	10.0	2.17	2.84	2.19	3.34	4.01	2.66	2.34	1.35	1.62
	30.0	2.33	4.77	3.04	3.41	3.12	1.67	1.62	1.61	1.95
	60.0	1.89	1.09	1.86	2.30	2.41	1.81	2.05	0.77	1.11
	100.0	2.83	2.21	3.78	4.19	3.69	3.56	5.38	2.24	5.23
Inter-assay precision Intermediate precision (RSD%)	1.0	14.02	41.92	14.43	10.89	26.99	11.99	48.71	9.78	97.67
	2.0	8.50	22.74	4.23	10.72	19.62	4.50	33.47	8.73	50.73
	4.0	5.18	10.68	2.58	6.80	8.74	2.87	10.72	7.07	34.91
	6.0	8.35	11.56	4.73	9.10	12.66	3.64	8.25	10.19	22.42
	10.0	10.07	7.90	7.06	8.65	12.67	5.31	5.27	7.13	15.63
	30.0	5.43	4.77	4.52	6.47	7.25	1.76	5.99	5.36	4.23
	60.0	4.95	5.70	2.04	4.32	2.73	1.81	3.08	3.50	6.65
	100.0	5.67	10.28	8.53	14.87	13.07	5.44	6.32	6.57	8.28
Uncertainty Relative expended uncertainty (%)	1.0	30.79	96.59	33.21	24.37	62.10	26.85	112.00	22.51	225.4
	2.0	19.41	52.38	9.38	24.66	45.23	9.49	77.10	19.45	117.0
	4.0	10.96	24.29	5.44	14.95	19.91	6.20	24.54	15.25	80.22
	6.0	18.20	26.41	9.98	20.37	28.94	7.67	18.78	23.53	51.65
	10.0	23.17	18.04	16.17	19.73	29.02	12.07	11.97	16.42	36.07
	30.0	12.34	10.05	10.02	14.60	16.47	3.76	13.75	12.29	9.60
	60.0	11.28	13.11	4.39	9.74	5.89	3.82	6.85	8.04	15.08
	100.0	12.83	23.67	19.37	34.14	29.97	12.11	13.81	15.01	18.49
LQL (µg/L)		1.0	2.6	1.0	1.0	2.0	1.0	3.2	1.0	7.3
UQL (µg/L)		100.0	70.6	89.4	66.5	78.6	100.0	98.5	100.0	85.8

Legend: AMP = amphetamine, MAMP = methamphetamine, 6MAM = 6-acetylmorphine, MOR = morphine, OCOD = oxycodone, HMOR = hydromorphone

Group 2

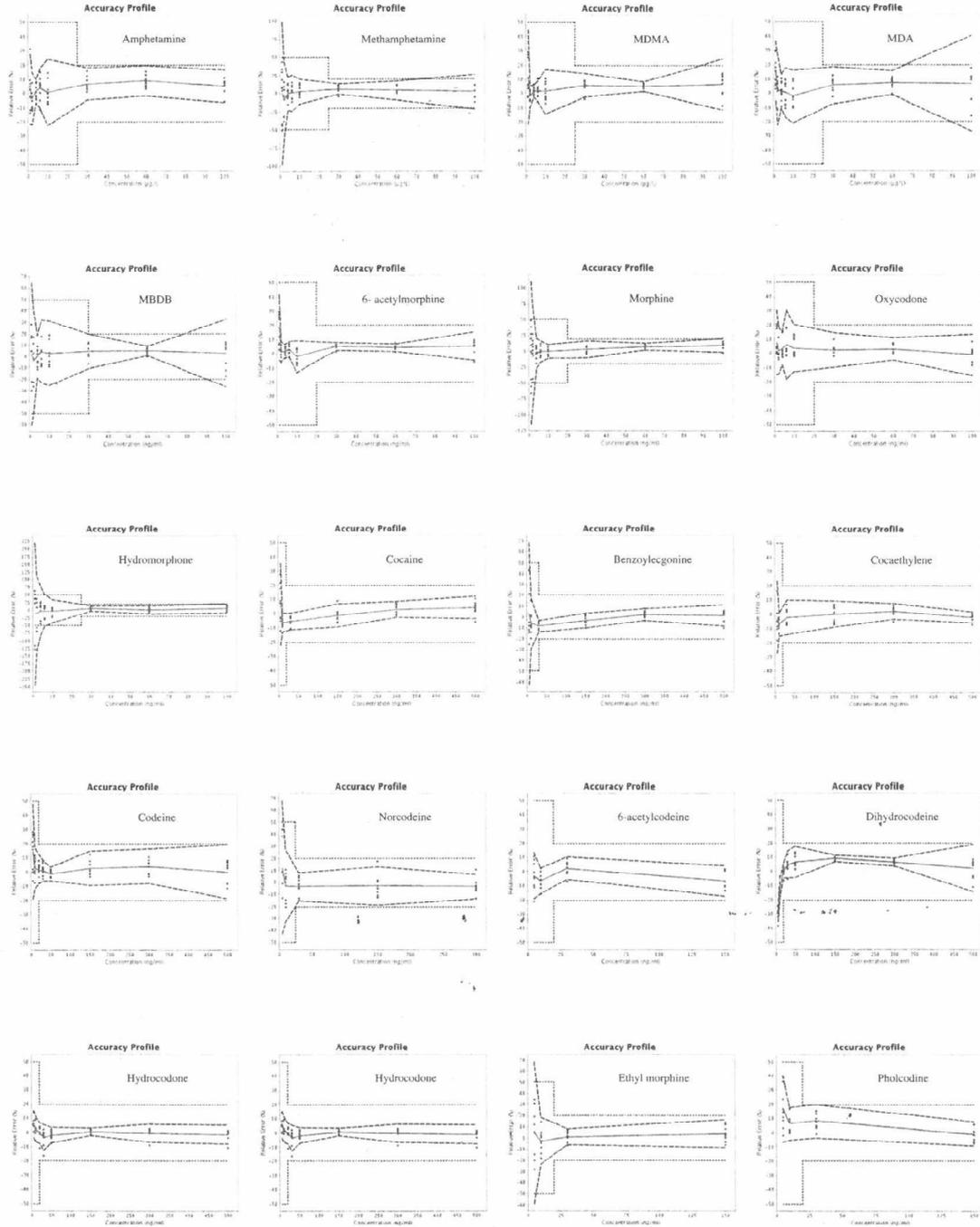
	Target conc. µg/L	COC	BZE	COCET	COD	NCOD	6ACOD	DHCOD	HCOD	EMOR	PHOL
Trueness Relative bias (%)	5.0	6.75	3.13	-2.09	14.49	12.25	-2.95	-28.38	5.77	4.86	16.77
	10.0	-6.26	-5.98	-7.29	2.84	-3.13	-6.44	-12.21	2.41	-2.80	6.32
	30.0	-5.60	-8.63	-2.24	1.12	-3.46	2.35	4.79	-3.67	1.25	8.17
	150.0	-1.32	-3.24	0.16	2.57	-2.67	-6.54	9.18	0.68	3.92	-0.85
	300	3.16	2.36	2.04	3.96	-3.51	-	6.62	-0.14	-	-
500	4.23	1.46	-2.26	0.15	-	-	2.22	-1.27	-	-	
Intra-assay precision Repeatability (RSD%)	5.0	8.74	9.17	7.04	3.11	5.31	10.26	4.61	2.59	6.09	12.91
	10.0	3.83	5.56	2.50	2.75	2.99	5.83	3.72	3.21	6.55	6.49
	30.0	3.44	3.18	3.49	4.58	6.59	4.95	4.30	5.79	4.21	3.84
	150.0	4.03	4.09	5.88	2.11	7.62	6.38	0.72	1.22	5.15	4.85
	300.0	3.55	3.62	2.85	1.51	6.40	-	0.89	3.04	-	-
500.0	4.52	4.02	2.44	2.29	-	-	2.76	3.23	-	-	
Inter-assay precision Intermediate precision (RSD%)	5.0	14.93	29.31	12.76	14.5	24.00	10.26	4.61	4.71	27.51	14.35
	10.0	4.15	11.36	4.18	6.79	13.03	5.83	4.35	4.81	10.90	7.13
	30.0	3.65	3.18	6.26	4.58	7.19	5.03	5.48	5.79	4.43	6.19
	150.0	4.90	4.36	5.88	5.60	9.33	6.38	1.16	1.55	6.94	5.13
	300.0	3.55	3.62	3.40	5.42	6.40	-	1.42	3.68	-	-
500.0	4.77	5.59	2.44	8.42	-	-	7.64	3.90	-	-	
Uncertainty Relative expended uncertainty (%)	5.0	33.48	67.14	28.72	33.35	55.24	21.63	9.72	10.59	63.28	30.83
	10.0	8.88	25.71	9.37	15.47	29.96	12.30	9.41	10.68	24.41	15.29
	30.0	7.79	6.87	14.09	9.66	15.41	10.63	11.98	12.21	9.44	13.82
	150.0	10.67	9.31	12.40	12.77	20.32	13.78	2.59	3.38	15.28	11.00
	300.0	7.49	7.62	7.37	12.44	13.48	-	3.17	8.00	-	-
500.0	10.15	12.33	5.15	19.31	-	-	17.46	8.48	-	-	
LQL (µg/L)		5.0	6.9	5.0	5.0	7.2	5.0	5.0	5.0	6.8	5.0
UQL (µg/L)		500.0	500.0	500.0	500.0	300.0	150.0	500.0	500.0	150.0	150.0

Legend: COC = cocaine, BZE = benzoylecgonine, COCET = cocaethylene, COD = codeine, NCOD = norcodeine, 6ACOD = 6-acetylcodeine, DHCOD = dihydrocodeine, HCOD = hydrocodone, EMOR = ethylmorphine, PHOL = pholcodine.

Group 2 (continued) and group 3

	Target conc. µg/L	METHA	EDDP	M3G	M6G	Naloxone	Naltrexone	Target conc. µg/L	BUP	NBUP
Trueness Relative bias (%)	5.0	-9.46	-7.47	13.78	1.33	7.11	13.64	0.5	15.11	10.10
	10.0	-13.23	-10.2	-4.80	-7.25	-4.33	2.39	1.0	-9.35	-6.12
	30.0	-5.99	-0.11	-4.63	1.23	1.65	-2.42	3.0	-7.69	6.91
	150.0	-6.95	3.51	-2.13	-0.41	2.66	0.05	15.0	-3.64	-8.14
	300.0	-1.90	3.85	3.39	-3.01	-1.67	3.22	30.0	2.61	2.16
500.0	-2.17	-1.94	-0.42	-3.21	7.27	0.57	50.0	-4.97	-3.84	
Intra-assay precision Repeatability (RSD%)	5.0	10.36	13.54	11.94	20.91	11.95	13.54	0.5	9.81	34.70
	10.0	5.96	6.28	6.55	5.93	5.89	2.95	1.0	7.84	11.18
	30.0	4.09	6.69	3.47	9.43	6.00	7.96	3.0	8.80	9.46
	150.0	6.56	5.11	6.66	5.85	6.89	7.82	15.0	6.11	8.13
	300.0	3.01	6.02	4.36	7.04	6.11	5.74	30.0	5.75	7.57
500.0	5.86	4.85	5.97	5.14	3.32	2.36	50.0	5.76	9.50	
Inter-assay precision Intermediate precision (RSD%)	5.0	19.53	17.28	26.77	20.91	21.25	24.01	0.5	33.91	37.34
	10.0	6.43	7.95	10.96	7.14	8.96	8.60	1.0	12.12	20.63
	30.0	5.51	6.74	4.27	13.75	6.48	8.91	3.0	8.80	9.46
	150.0	7.15	5.42	7.36	7.05	6.89	10.46	15.0	6.11	8.44
	300.0	3.01	6.02	4.36	8.86	6.16	6.61	30.0	5.75	7.57
500.0	5.86	6.32	6.78	5.98	3.32	3.13	50.0	8.04	9.50	
Uncertainty Relative expended uncertainty (%)	5.0	44.04	37.82	60.79	44.08	47.85	54.06	0.5	77.90	79.79
	10.0	13.75	17.38	24.56	15.52	19.93	19.65	1.0	27.14	46.75
	30.0	12.13	14.23	9.29	30.49	13.85	19.15	3.0	18.67	20.06
	150.0	15.32	11.56	15.79	15.38	14.62	23.01	15.0	12.87	18.16
	300.0	6.35	12.77	9.19	19.63	13.00	14.28	30.0	12.13	16.07
500.0	12.36	13.85	14.61	12.98	6.99	6.89	50.0	17.76	20.16	
LQL (µg/L)		5.0	5.0	6.9	5.0	5.0	6.4		0.8	0.8
UQL (µg/L)		500.0	500.0	500.0	500.0	500.0	500.0		50.0	50.0

Legend: METHA = methadone, M3G = morphine-3-glucuronide, M6G = morphine-6-glucuronide, BUP = buprenorphine, NBUP = norbuprenorphine.



Acta Clinica Belgica, 2010; 65-Supplement 1

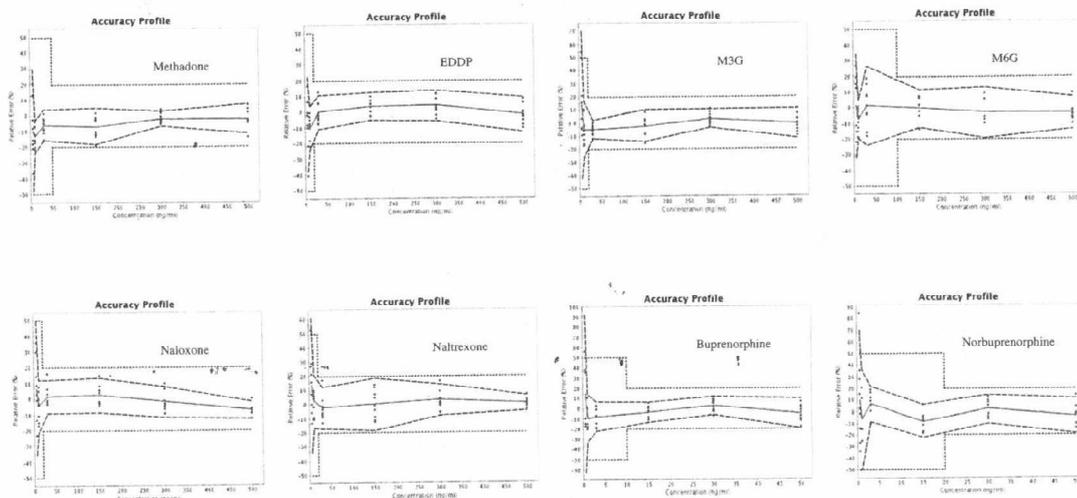


Figure 2 – Accuracy profiles for each analyte

Legend: The plain line is the relative bias, the dashed lines are the β -expectation tolerance limits and the dotted curves represent the acceptance limits (20%). The dots represent the relative back-calculated concentrations and are plotted with respect to their targeted concentration.

measurand. The expanded uncertainty represents an interval around the results where the unknown true value can be observed with a confidence level of 95%. The relative expanded uncertainties (%) are obtained by dividing the corresponding expanded uncertainties with the corresponding introduced concentrations. Values for each analyte are presented in Table 2.

The total error evaluates the ability of the method to produce accurate results. Thus, the total error estimation of a procedure is fundamental to assess the validity of the method. Total error is the sum of trueness and precision, and is clearly a good indicator of results accuracy. The accuracy expresses the closeness of agreement between the value found and the value which is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value (12,13).

The accuracy profile is obtained by joining the extremes of the 87.5% interval, i.e. the interval that will contain 87.5% of the future individual results. The acceptance limits were set at $\pm 20\%$ for concentrations upper than $20\mu\text{g/L}$ and at $\pm 50\%$ for concentrations lower than $20\mu\text{g/L}$. As shown in Figure2, the relative upper and lower β -expectation tolerance intervals did not exceed the acceptance limits for each compound in the dosing range.

The intersections between the accuracy profile and the acceptance limits define the lower limit of quanti-

tation (LQL) as well as the upper limit of quantitation (UQL) (12,13). LQL and UQL of all compounds are presented in Table2.

DISCUSSION

Sample pre-treatment was fairly rapid; it consisted in a simple solid-phase extraction procedure. Contrary to GC-MS method, UHPLC method did not require derivatization of the sample which is time-consuming. Glucuronide conjugated compounds of morphine were monitored in the method, therefore hydrolysis step was not necessary anymore. We were not able to validate heroin analysis with this method; actually, heroin is not stable at room temperature, so sample had to be analysed as rapidly as possible; furthermore, it is not stable at basic pH, elution step during SPE should be adapted (9). The use of an Acquity HSS T3 column allowed separating efficiently polar compounds (notably morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide) contrary to a classical C18 column. UHPLC technology allowed to obtain very good and reproducible chromatographic separation in a fairly short time, it was important to have a separation as good as possible to be able to measure two MRM by analyte in the mass spectrometer ; indeed, only 19 MRM channels can be

measured by time function. The MS method was divided in five time functions and MRM dwell times were adjusted to maximize sensitivity.

The quantitative determination of cocaine, opiates and amphetamines in serum answered to our objectives : function responses were established for each analyte, method presented an acceptable linearity : from LQL to 500µg/l for cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, codeine, dihydrocodeine, methadone, EDDP, M3G, M6G, naloxone and naltrexone ; from LQL to 300µg/L for norcodeine ; from LQL to 150µg/L for 6-acetylcodeine, ethylmorphine and pholcodine, from LQL to about 100µg/L for amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, MBDB, 6-acetylmorphine, morphine, oxycodone and hydromorphone; from LQL to 50µg/l for buprenorphine and norbuprenorphine. Biases were smaller than 19% for concentrations lower than 20µg/L and than 12% for concentrations upper than 20µg/L. For repeatability, RSDs did not exceed 20% for concentrations lower than 20µg/L and 8% for concentrations upper than 20µg/L; they did not exceed 30% for concentrations lower than 20µg/L and 15% for concentrations upper than 20µg/L for intermediate precision. The lower and upper β -expectation tolerance limit did not exceed the acceptance limits (20% for concentrations lower than 20µg/L, 50% for concentrations upper than 20µg/L) at 87.5% level. The lower limit of quantitation was lower than 7µg/L for each compound which was quiet better than LQL generally obtained by GC-MS technology.

CONCLUSION

In order to detect easily and rapidly narcotic substances responsible for addiction and/or intoxication, we developed a method which allowed quantifying simultaneously 27 compounds belonging to cocaine, opiates or amphetamines chemical family in serum by UHPLC-MS/MS. This method is fully validated using total error approach which is a really innovative procedure for analytical validation in toxicological laboratories. Finally, this method could be used as a generic method to identify and quantify ones of the most common drugs of abuse in human serum.

REFERENCES

1. Observatoire européen des drogues et des toxicomanies, Rapport annuel, Luxembourg, Office des publications de l'Union Européenne, 2009.
2. Jagerdeo E., Montgomery M.A., LeBeau M.A., Sibum M., An automated SPE/LC/MS/MS method for the analysis of cocaine and metabolites in whole blood. *J of Chrom B*, 2008; 874:15-20.
3. Chèze M., Deveaux M., Martin C., Lhermitte M., Pépin G., Simultaneous determination 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.
4. Bjork M.K., Nielsen M.K.K., Markussen L.O., Klinke H.B., Linnet K. Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2009, in press.
5. Sergi M., Bafile E., Compagnone D., Curini R., D'Ascenzo G., Romolo F.S., Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 2009; 393: 709-718.
6. Lacroix C., Saussereau E., Bodin G., Goullé J.P. Quantification des opiacés, cocaïniques et amphétamines par chromatographie liquide haute performance / spectrométrie de masse en tandem après préparation en ligne de l'échantillon. *ATA*, 2008; 20(1): 25-38.
7. Paterson S., Lintzeris N., Mitchell T.B., Cordero R., Nestor L., Strang J., Validation of techniques to detect illicit heroin use in patients prescribed pharmaceutical heroin for the management of opioid dependence. *Addiction*, 2005; 100: 1832-1839.
8. Kudo K., Ishida T., Hara K., Kashimura S., Tsuji A., Ikeda N., Simultaneous determination of 13 amphetamine related drugs in human whole blood using an enhanced polymer column and gas chromatography-mass spectrometry. *J of Chrom B*, 2007; 855: 115-120.
9. Rook E.J., Hillebrand M.J., Rosing H. et al. 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 of Chrom B*, 2005; 824: 213-221.
10. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004; 36: 579-586.
11. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45: 70-81.
12. Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B. et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part III. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45: 82-96.
13. Rozet E., Ceccato A., Hubert C. et al., Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J of Chrom A*, 2007, 1158, 111-125.

II.2.2 – Identification et dosage du cannabis dans le sang

Exclusivement réservée à la mise en évidence d'une consommation de cannabis, cette méthode permet de quantifier le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) ainsi que ses deux métabolites principaux le 11-hydroxytétrahydrocannabinol (THC-OH) et le 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC-COOH).

La chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à la spectrométrie de masse offre une séparation rapide du THC et de ses métabolites (3 minutes). La limite de quantification est inférieure ou égale à 1 $\mu\text{g/L}$ pour tous les composés. La linéarité est acceptable dans le domaine de concentrations validé (de 0.5 à 50 $\mu\text{g/L}$ pour le THC et pour le THC-OH et de 1.1 à 100 $\mu\text{g/L}$ pour le THC-COOH). Le biais est inférieur à 13% et les coefficients de variation de répétabilité et de précision intermédiaire ne dépassent pas 15%. Les bornes inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance β ne dépassent pas les limites d'acceptation de 20% pour les concentrations supérieures à 2 $\mu\text{g/L}$ pour le THC et le THC-OH et à 4 $\mu\text{g/L}$ pour le THC-COOH. Les limites d'acceptation sont fixées à 30% pour les concentrations inférieures à 2 $\mu\text{g/L}$ pour le THC et le THC-OH et à 4 $\mu\text{g/L}$ pour le THC-COOH.

La méthode a été validée à l'aide du logiciel e-noval[®] (Arlenda).

PUBLICATION 3

Validation of the quantitative determination of tetrahydrocannabinol and its two major metabolites in plasma by ultra-high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry according to the total error approach

N. Dubois, A.P. Paccou, B.G. De Backer, C.J. Charlier

Journal of Analytical Toxicology, **2012**, 36, 25-29

Validation of the Quantitative Determination of Tetrahydrocannabinol and Its Two Major Metabolites in Plasma by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry According to the Total Error Approach*

N. Dubois^{1†}, A.P. Paccou², B.G. De Backer¹ and C.J. Charlier^{1,3}

¹Service de Toxicologie Clinique, Médicolégale, de l'Environnement et en Entreprise, CHU, Liège, Belgium, ²Waters NV/SA, Zellik, Belgium, and ³CIRM, Université de Liège, Liège, Belgium

*First presented as a poster at the Joint Meeting of the BLT and BESEDIM at UCL, April 12, 2010.

†Author to whom correspondence should be addressed: N. Dubois, Service de Toxicologie Clinique, Médicolégale, de l'Environnement et en Entreprise, CHU Sart-Tilman B35, Tour II, +5, B-4000 Liège, Belgique. Email: nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be.

In Belgium, driving under the influence (DUI) of cannabis is prohibited and has severe legal consequences for the driver if the blood plasma concentration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) exceeds 1 $\mu\text{g/L}$. A method to quantify low concentrations of THC and its hydroxylated (THC-OH) and carboxylated (THC-COOH) metabolites in plasma was developed for DUI but also for other applications. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry seems to be a very convenient method to combine fast chromatographic separation and good sensitivity. The method was validated according to total error approach. Chromatographic separation was achieved in a 3-min total run time. The limits of quantitation were lower or equal to 1 $\mu\text{g/L}$ for all compounds. The linearity of the method was acceptable in the validated range of concentrations (from 0.5 to 50 $\mu\text{g/L}$ for THC, from 0.9 to 50 $\mu\text{g/L}$ for THC-OH and from 1.1 to 100 $\mu\text{g/L}$ for THC-COOH). The biases were lower than 13%, and the relative standard deviations for repeatability and intermediate precision did not exceed 15%. Lower and upper β -expectation tolerance limits did not exceed the acceptance limits of 20% for concentrations higher than 2 $\mu\text{g/L}$ for THC and THC-OH and higher than 4 $\mu\text{g/L}$ for THC-COOH. The acceptance limits were 30% for THC and THC-OH concentrations lower than 2 $\mu\text{g/L}$ and for THC-COOH concentrations lower than 4 $\mu\text{g/L}$.

Introduction

Cannabis is the most widely used illicit drug worldwide (1, 2). Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic acid (THCA-A) is the precursor of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), the most psychoactive component of marijuana and hashish. When cannabis products are heated before or during consumption (i.e., smoking, vaporizing, tea, or baked products), the non-psychoactive THCA-A is converted by decarboxylation to THC (3, 4). THC is very lipophilic, and after entering the lungs, it dissolves quickly in pulmonary surfactant, enabling rapid passage into the bloodstream (5). THC is metabolized by hepatic cytochromes P450 2C9 and 2C19 to 11-hydroxytetrahydrocannabinol (THC-OH), which is also psychoactive (6, 7). It is further oxidized to 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), an inactive metabolite, mainly by CYP2C9 liver enzymes (8, 9). Since 1999, driving under the influence of cannabis has been prohibited in Belgium, and the driver can be checked first by roadside testing (saliva) and, as confirmation, by blood analysis. The analytical level considered positive for THC concentration in plasma by Belgian authorities is 1 $\mu\text{g/L}$ (10).

Several methods have been described to quantify simultaneously THC and its two major metabolites THC-OH and THC-COOH in blood. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) has been used for a long time and is still the reference method to quantify THC in biological matrices (2, 7, 11–13). For a few years, liquid chromatography (LC) coupled to MS was developed for THC determination. LC-MS offers very good results with a simpler sample pretreatment, because no derivatization step is required, and with shorter chromatographic run-times (8, 9, 14–16). In 2005, the arrival of ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem MS allowed even more rapid chromatographic separation and a better sensitivity (17, 18).

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Reference materials for all compounds and internal standards were purchased from LGC Promochem (Molsheim, France). All standards had a degree of purity higher than 99%.

Hexane (analysis grade) was purchased from Lab-scan Analytical Sciences (Gliwice, Poland); methanol and water (LC-MS grade) were purchased from Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands); ammonium bicarbonate, of at least analytical grade, was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); ethyl acetate and ammonia were from VWR (Leuven, Belgium).

Stock solutions and standards

For the preparation of the internal standard (IS) stock solution, commercial solutions of THC- d_3 , THC-OH- d_3 , and THC-COOH- d_3 were diluted in methanol. The concentration of the IS stock solution was 1.67 mg/L for THC- d_3 and THC-OH- d_3 and 3.33 mg/L for THC-COOH- d_3 .

Calibration standards and validation standards were prepared by fortifying drug-free plasma with stock solution containing all the compounds. Calibration standards were prepared to obtain final concentrations of 0.83, 2.08, 4.17, 8.33, 20.83, and 41.67 $\mu\text{g/L}$ for THC and THC-OH and concentrations of 1.67, 4.17, 8.33, 16.67, 41.67, and 83.33 $\mu\text{g/L}$ for THC-COOH. The calibration standards were analyzed in duplicate for three days and were used to establish the calibration curves (response function). The concentrations of the validation standards were 0.5, 1, 2, 10, and 50 $\mu\text{g/L}$ for THC and THC-OH and 1, 2, 4, 20,

and 100 µg/L for THC-COOH. The validation standards were analyzed in triplicate for three days and were used to estimate the validation parameters and thus the method limits. Stock solutions for calibration and validation standards were prepared independently. An extract of drug-free plasma was also prepared for each run. Internal quality controls (BTMF) purchased from LGC Promochem (Molsheim, France) were included in each batch.

Sample pretreatment

Ten microliters of IS solution was added to 500 µL of plasma. After addition of 100 µL of a 10% acetic acid solution, sample was extracted with 5 mL of a mixture of hexane and ethyl acetate (90:10, v/v).

The aqueous phase was discarded, the organic layer was evaporated to dryness under gentle nitrogen flow at 40 °C and reconstituted with 100 µL of a mixture of H₂O and methanol (80:20, v/v). Ten microliters was injected into the column.

Instrumentation

Analysis was performed on an UPLC Acquity coupled to a tandem MS (Quattro Premier XE (Waters, Zellik, Belgium)). The chromatographic separation was done on an Acquity C₁₈ column (1.8 µm, 50 × 2.1-mm i.d., Waters) equipped with an online filter at 40 °C. Gradient elution was performed at a constant flow of 0.45 mL/min, using a mixture of 10 mM ammonium bicarbonate in water (pH 10) and methanol, as described in Table I.

After chromatographic separation, compounds were analyzed in the tandem MS operated in the positive electrospray mode at 1.0 kV, at a source temperature of 120 °C and at a desolvation temperature of 350 °C. The collision gas flow was set at 50 L/h and the desolvation gas flow at 800 L/h. The MS method was divided into three functions depending on the retention times of the analytes. Two transitions for each compound were monitored in the multiple reaction monitoring

(MRM) mode. Ion ratio of each analyte was measured and compared to its acceptance limits to check compound identification (Table II). Acceptance limits for ion ratios are based on European Commission decision (19).

Method validation

According to ISO17025 and the guidelines of the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques (SFSTP), the present method was fully validated using total error approach (20–22). The e-nova software V3.0 (Arlenda, Liège, Belgium) was used to compute all validation results and to build the accuracy profiles.

Results and Discussion

Elution was carried out using a segmented gradient of 3 min. Compounds were well separated, with retention times from 1.5 to 2.5 min. UHPLC offered a much shorter run-time in comparison with classical LC method (8, 16). A chromatogram of an extracted, fortified plasma sample is presented in Figure 1. The MS method was divided into three time functions, and MRM dwell times were adjusted to maximize sensitivity.

The response function is within the range of the existing relationship between the response (signal) and the concentration of the analyte in the sample (21). It was built from the calibration standards. The response function was a weighted quadratic regression for THC and a weighted linear regression for THC-OH and THC-COOH.

The linearity is the method's ability to obtain results directly proportional to the concentrations of the analyte in the sample (21). The method presents a good linearity for each compound: from 0.5 to 50 µg/L for THC, from 0.9 to 50 µg/L for THC-OH, and from 1.1 to 100 µg/L for THC-COOH.

The trueness expresses the closeness of agreement between the mean value obtained from the validation standards and the value that is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value. Trueness is expressed in terms of relative bias (systematic error) (21). Trueness was acceptable for all compounds because the relative biases were always lower than 1.3%. Results are presented in Table III.

The precision was determined by computing the relative standard deviations (RSDs) for repeatability and intermediate precision at each concentration of the validation standards (23). They did not exceed 9% for repeatability and 15% for intermediate precision. RSDs are presented in Table III.

The uncertainty characterizes the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand. The

Table I
UHPLC Elution Gradient*

Time (min)	A %	B %
0.0	50.0	50.0
0.3	50.0	50.0
2.0	5.0	95.0
2.5	5.0	95.0
3.0	50.0	50.0

* A, 10 mM ammonium bicarbonate, pH 10 and B, methanol.

Table II
Retention Times and MRM Transitions of Each Analyte and Internal Standard (IS)

Compound	Ret. Time (min)	Cone Voltage (V)	MRM1 (Quantifier)	Collision Energy (V)	MRM2 (Qualifier)	Collision Energy (V)	Acceptance Limits for Ion Ratio (%) MRM1/MRM2
THC-d ₅ (IS)	2.47	30	318.40 > 196.35	24	–	–	–
THC		30	315.40 > 193.35	24	315.40 > 123.25	35	78.1–117.2
THC-OH-d ₅ (IS)	2.16	30	334.20 > 316.30	17	–	–	–
THC-OH		30	331.20 > 313.30	15	331.20 > 193.20	25	351.3–585.4
THC-COOH-d ₅ (IS)	1.69	32	348.35 > 302.40	20	–	–	–
THC-COOH		32	345.35 > 299.40	20	345.35 > 327.40	17	102.1–153.2

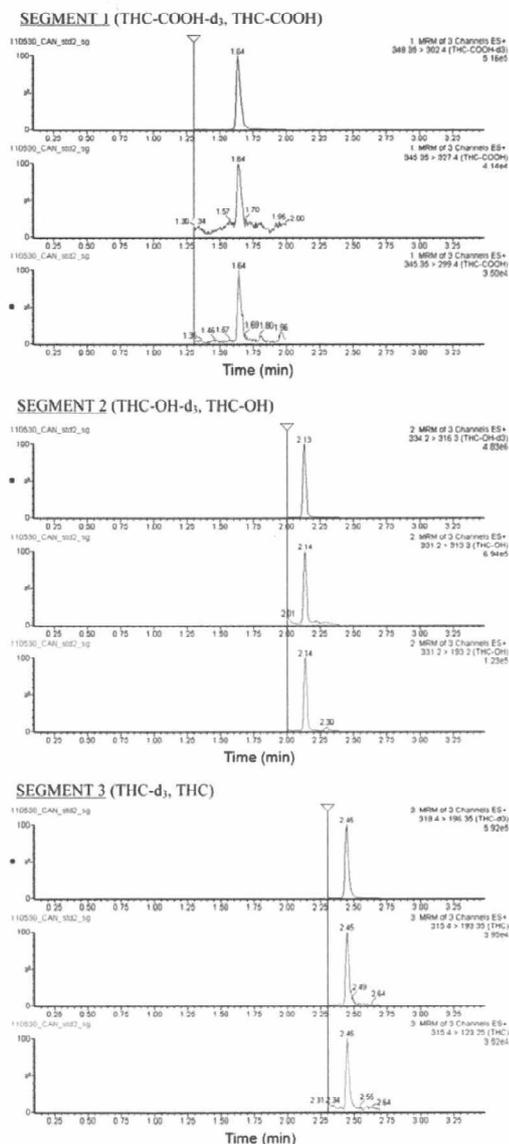


Figure 1. Chromatogram example of an extracted, fortified plasma (THC, THC-OH = 2.08 µg/L, THC-COOH = 4.17 µg/L).

expanded uncertainty represents an interval around the results where the unknown true value can be observed with a confidence level of 95%. The relative expanded uncertainties (%) are obtained by dividing the corresponding expanded uncertainties with the corresponding introduced concentrations. Values for each analyte are presented in Table III.

Table III

Trueness, Precision, Uncertainty of Measurement, Lower and Upper Limit of Quantitation for Plasma Determination of THC, THC-OH, and THC-COOH by UHPLC-MS-MS (n = 9)

	Target Conc. (µg/L)	THC	THC-OH	Target Conc. (µg/L)	THC-COOH
Trueness	0.5	-4.29	8.97	1.0	-7.69
Relative bias (%)	1.0	12.61	12.78	2.0	10.45
	2.0	0.70	0.32	4.0	-0.77
	10.0	10.60	7.02	20.0	9.49
	50.0	1.65	2.59	100.0	4.60
<u>Intraassay precision</u>	0.5	5.44	4.80	1.0	8.46
Repeatability (RSD%)	1.0	5.29	2.15	2.0	5.17
	2.0	6.17	3.59	4.0	5.31
	10.0	3.55	2.83	20.0	4.29
	50.0	3.66	2.02	100.0	3.34
<u>Interassay precision</u>	0.5	9.43	14.17	1.0	12.83
Intermediate precision (RSD%)	1.0	8.22	6.50	2.0	8.96
	2.0	6.17	3.59	4.0	6.22
	10.0	3.83	2.94	20.0	5.32
	50.0	5.82	2.25	100.0	4.80
<u>Uncertainty</u>	0.5	21.15	32.42	1.0	28.60
Relative expanded uncertainty (%)	1.0	18.32	14.88	2.0	20.11
	2.0	13.00	7.57	4.0	13.51
	10.0	8.19	6.25	20.0	11.61
	50.0	12.99	4.84	100.0	10.61
LOD (µg/L)		0.2	0.3		0.3
LLOQ (µg/L)		0.5	0.9		1.1
ULOQ (µg/L)		50.0	50.0		100.0

The total error evaluates the ability of the method to produce accurate results. Thus, the total error estimation of a procedure is fundamental to assess the validity of the method. Total error is the sum of trueness and precision, and it is clearly a good indicator of results accuracy. The accuracy expresses the closeness of agreement between the value found and the value that is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value (22, 23).

The accuracy profile is obtained by joining the extremes of the 87.5% interval, that is, the interval that will contain 87.5% of the future individual results. The acceptance limits were ±20% for concentrations higher than 2 µg/L and ±30% for concentrations lower than 2 µg/L for THC and THC-OH; they were set at ±20% for concentrations higher than 4 µg/L and at ±30% for concentrations lower than 4 µg/L for THC-COOH. As shown in Figure 2, the relative upper and lower β-expectation tolerance intervals did not exceed the acceptance limits for each compound in the dosing range.

The intersections between the accuracy profile and the acceptance limits define the lower limit of quantitation (LQL) as well as the upper limit of quantitation (UQL) (22, 23). The limit of detection (LOD) is the smallest quantity of the substance that can be detected, but not accurately quantified in the sample; it is one-third of the limit of quantitation. LOD, LQL, and UQL of the three compounds are presented in Table III. The LQL was lower than 1.1 µg/L for each compound, which is better than LQL generally obtained by GC-MS technology.

The selectivity is the method's ability to measure unequivocally and to differentiate the analyte(s) in the presence of components which may be expected to be present (22, 23). An extract of drug-free plasma (from different sources) was prepared for each run, and samples spiked with possibly interfering compounds (6 different amphetamines, cocaine and its main metabolite benzoylecgonine, and 27 opiates) were

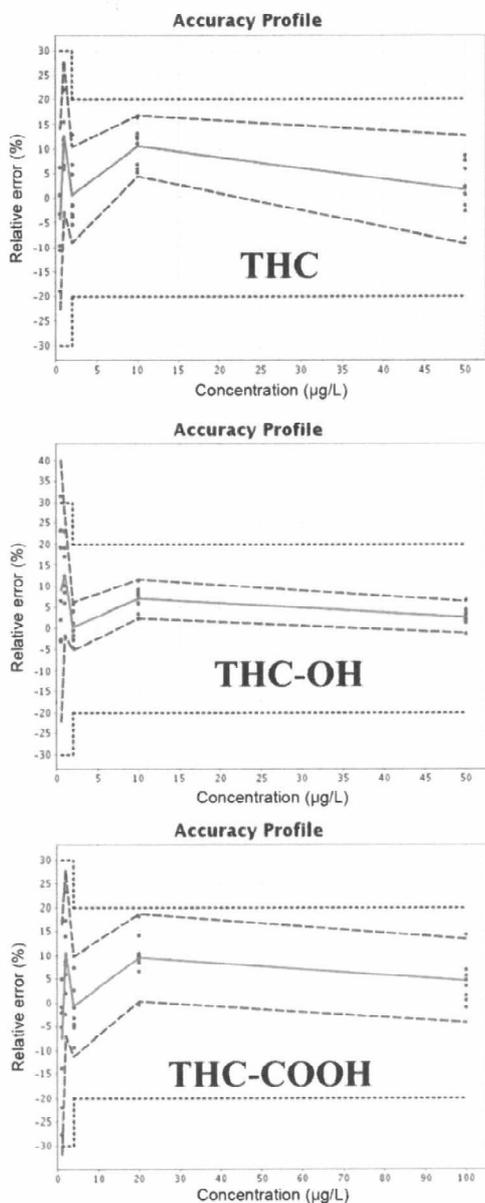


Figure 2. Accuracy profiles obtained for THC, THC-OH, and THC-COOH with e-nova validation software. The plain line is the relative bias, the dashed lines are the β -expectation tolerance limits (87.5%), and the dotted curves represent the acceptance limits [30% for concentrations lower than 2 µg/L (4 µg/L for THC-COOH) and 20% for concentrations higher than 2 µg/L (4 µg/L for THC-COOH)]. The dots represent the relative back-calculated concentrations and are plotted with respect to their targeted concentration.

28 Dubois et al.

injected; real samples containing other drugs than cannabis were analyzed. No interferences were found.

Matrix effect was analyzed by post-column infusion technique. Analytes were infused post-column via a T-shaped connector at a steady rate of 20 µL/min into the UHPLC eluant stream. At the same time, 10 µL of blank serum extracts were injected. Ten sources of blank samples were evaluated. Ion suppression effect was lower than 10% (24).

Stability of plasma specimens was tested on real samples. Ten samples were stored at a temperature between 2 and 8°C and analyzed after 7 and 14 days; they were still stable after 14 days. Stability of the drug extracts was tested on internal QC and real samples; they were stable at least five days at 10°C (temperature of the sample unit).

Our laboratory took part five times in external QC program BTMF Illicit Drugs in Serum from Arvecon (Waldorf, Germany) and obtained successful results (z-score < 2).

Thirty-six real samples were analyzed in 3 months; 21 were negative and 15 were positive for at least THC-COOH. Concentrations ranged between 0 and 3.6 µg/L for THC, between 0 and 3.6 µg/L for THC-OH, and between 1.7 and 41.4 µg/L for THC-COOH.

Conclusions

UHPLC technique coupled to tandem MS is a very convenient method for rapid, specific, and sensitive quantitative determination of THC, THC-OH, and THC-COOH in plasma. The sample pre-treatment is simple and the three compounds of interest are separated in 3 min. In 2008, Jamey et al. (17) developed a method similar to the proposed method. They used the same apparatus, a column with same physicochemical properties but two times longer, and a mobile phase containing formic acid (pH 2.6) and acetonitrile, whereas we used basic buffer and methanol. They achieved chromatographic separation in 10 min and used a sample volume twice as large compared to our method. Our method is more rapid and needs smaller sample volume, which is appreciable when many DUI analyses have to be performed. Finally, this method was successfully analytically validated using total error approach, which is a really innovative procedure for analytical validation in toxicological laboratories.

Acknowledgments

Thanks are due to the Fonds d'Investissement pour la Recherche Scientifique from CHU-Liège for its financial support (FIRS 4702).

References

1. European Monitoring Centre for drugs and drug addiction. *Annual Report*. Office des publications de l'Union Européenne, Luxembourg, 2009.
2. Toennes, S.; Ramaekers, J.; Theunissen, E.; Moeller, M.; Kauert, G. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 470–477.
3. De Backer, B.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Theunis, L.; Dubois, N.; Decock, L.; Verstracte, A.; Hubert, P.; Charlier, C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the

- qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 4115–4124.
4. Dussy, F.; Hamberg, C.; Luginbübl, M.; Schwesermann, T.; Briellmann, T. Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products. *Forensic Sci. Int.* **2005**, *149*, 3–10.
 5. Wills, S. *Drugs of Abuse*, 1st ed., The Pharmaceutical Press, London, 1997, pp 35–47.
 6. Jung, J.; Kempf, J.; Mahler, H.; Weinmann, W. Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 354–360.
 7. Karschner, E.; Schwilke, E.; Lowe, R.; Darwin, W.; Pope, H.; Herning, R.; Cadet, J.; Huestis, M. Do Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations indicate recent use in chronic cannabis users? *Addiction* **2009**, *104*, 2041–2048.
 8. del Mar Ramirez Fernandez, M.; De Boeck, G.; Wood, M.; Lopez-Rivadulla, M.; Samyn, N. Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 465–470.
 9. Hunault, C.; Mensinga, T.; de Vries, I.; Kelholt-Dijkman, H.; Hock, J.; Kruidenier, M.; Leenders, M.; Meulenbelt, J. Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) serum concentrations and pharmacological effects in males after smoking a combination of tobacco and cannabis containing up to 69 mg THC. *Psychopharmacology* **2008**, *201*, 171–181.
 10. Law relating to introduction of salivary assays as far as drugs in traffic, Law of 31 July 2009, Belgian Monitor of 15 September 2009.
 11. Lott, S.; Henrion, A.; Kessler, A.; Güttler, B.; Aderjan, R. Reference measurement procedure for Δ^9 -tetrahydrocannabinol in serum. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1003–1010.
 12. Schroeder, J.; Marinetti, L.; Smith, R.; Brewer, W.; Clelland, B.; Morgan, S. The analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and metabolite in whole blood and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using disposable pipette extraction with confirmation and quantification by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 659–666.
 13. Röhrich, J.; Schimmel, I.; Zörntlein, S.; Becker, J.; Drobnik, S.; Kaufmann, T.; Kuntz, V.; Urban, R. Concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxytetrahydrocannabinol in blood and urine after passive exposure to cannabis smoke in a coffee shop. *J. Anal. Toxicol.* **2010**, *34*, 196–203.
 14. Teixeira, H.; Verstraete, A.; Proença, P.; Corte-Real, F.; Monsanto, P.; Nuno Vieira, D. Validated method for the simultaneous determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Sci. Int.* **2007**, *170*, 148–155.
 15. Jagerdeo, E.; Schaff, J.; Montgomery, M.; LeBeau, M. A semi-automated solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the analysis of tetrahydrocannabinol and metabolites in whole blood. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2697–2705.
 16. Coulter, C.; Miller, E.; Crompton, K.; Moore, C. Tetrahydrocannabinol and two of its metabolites in whole blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 653–658.
 17. Jamey, C.; Szwarc, E.; Tracqui, A.; Ludes, B. Determination of cannabinoids in whole blood by UPLC–MS–MS. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, *32*, 349–354.
 18. Dubois, N.; Debrus, B.; Hubert, Ph.; Charlier, C. Validated quantitative simultaneous determination of cocaine, opiates and amphetamines in serum by U-HPLC coupled to tandem mass spectrometry. *Acta Clin. Belg.* **2010**, *65* Suppl., 75–84.
 19. 2002/657/EC, Commission Decision implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002)5044). European Union Law, 2002.
 20. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—Part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 579–586.
 21. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P.A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—Part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 70–81.
 22. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J.J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P.A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—Part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 82–96.
 23. Rozet, E.; Ceccato, A.; Hubert, C.; Zicmons, E.; Oprcan, R.; Rudaz, S.; Boulanger, B.; Hubert, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158*, 111–125.
 24. Taylor, P. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 328–334.

II.3 – Présentation sommaire des principales caractéristiques analytique des trois méthodes développées dans le cadre de ce travail

Afin de permettre au lecteur d’apprécier rapidement les performances analytiques des 3 méthodes évoquées ci-avant, nous avons résumé leurs caractéristiques dans les tables 1 et 2.

	Sensibilité LOQ (µg/L)		Justesse Biais (%)	
	Opiacés, cocaïne et amphétamines			
	Opiacés seuls	Opiacés, cocaïne et amphétamines	Opiacés seuls	Opiacés, cocaïne et amphétamines
6-acétylcodéine	2.0	5.0	4.4 – 16.2	-6.5 – 2.3
6AM	1.0	1.0	-5.4 – 10.6	-1.8 – 18.4
6-β-naltrexol	1.0	-	-8.9 – 10.5	-
Buprénorphine	1.0	0.8	-17.6 – 10.2	-9.3 – 15.1
Codéine	5.0	5.0	-7.9 – 1.5	0.1 – 14.5
C6G	19.75	-	-16.7 – 19.9	-
Dihydrocodéine	10.0	5.0	-13.1 – 5.5	-28.4 – 9.2
EDDP	10.0	5.0	-13.3 – 18.7	-10.2 – 3.8
Ethylmorphine	-	6.8	5.0 – 28.9	-2.8 – 4.9
Hydrocodone	5.0	5.0	-5.2 – 6.4	-3.7 – 5.8
Hydromorphone	2.0	7.3	-13.1 – 2.4	-12.2 – 6.8
Méconine	-	-	5.6 – 12.4	-
M3G	10.0	6.9	-5.8 – 13.8	-4.8 – 13.8
M6G	10.0	5.0	-10.0 – 11.5	-7.2 – 1.3
Méthadone	10.0	5.0	-4.7 – 12.2	-13.2 – -1.9
Morphine	4.0	3.2	-14.1 – 8.3	-8.2 – 9.2
Naloxone	1.0	5.0	-4.1 – 13.6	-4.3 – 7.3
Naltrexone	1.0	6.4	-5.8 – 8.8	-2.4 – 13.6
Norbuprénorphine	-	0.8	2.3 – 22.3	-8.1 – 10.1
Norcodéine	4.0	7.2	-13.4 – 13.8	-3.5 – 12.2
Normorphine	2.0	-	-14.3 – 16.0	-
Noscapine	1.0	-	-1.3 – 13.9	-
Oxycodone	2.0	1.0	-6.7 – 9.1	-0.8 – 7.9
Papavérine	1.0	-	-2.0 – 16.6	-
Pholcodine	4.0	5.0	2.6 – 18.7	-0.8 – 16.8
Benzoylécgonine	-	6.9	-	-8.6 – 3.1
Cocaéthylène	-	5.0	-	-7.3 – 2.0
Cocaïne	-	5.0	-	-6.3 – 6.7
Amphétamine	-	1.0	-	-3.9 – 8.8
Méthamphétamine	-	2.6	-	-9.8 – 6.0
MDMA	-	1.0	-	-2.1 – 11.5
MDA	-	1.0	-	-2.3 – 15.3
MBDB	-	2.0	-	-4.0 – 4.9
	Cannabis			
THC		0.5		-4.3 – 12.6
THC-OH		0.9		0.3 – 12.8
THC-COOH		1.1		-7.7 – 10.4

Table 1 : Sensibilité et justesse des 3 méthodes développées dans le cadre de ce travail

	Répétabilité		Précision intermédiaire		Incertitude de mesure	
	CV (%)		CV (%)		CV (%)	
Opiacés, cocaïne et amphétamines						
	Opiacés seuls	Opiacés, cocaïne et amphétamines	Opiacés seuls	Opiacés, cocaïne et amphétamines	Opiacés seuls	Opiacés, cocaïne et amphétamines
6-acétylcodéine	2.0 – 16.0	4.9 – 10.3	9.8 – 20.5	5.0 – 10.3	21.8 – 45.9	10.6 – 21.6
6AM	3.6 – 15.2	1.7 – 7.2	6.5 – 15.2	1.8 – 12.0	14.6 – 32.0	3.8 – 26.8
6-β-naltrexol	6.5 – 11.1	-	8.1 – 13.7	-	17.6 – 31.0	-
Buprénorphine	6.5 – 20.7	5.7 – 7.8	6.5 – 20.7	5.7 – 12.1	13.7 – 43.6	12.1 – 27.1
Codéine	4.8 – 14.4	1.5 – 4.6	4.7 – 8.5	4.6 – 14.5	10.0 – 18.0	9.7 – 19.3
C6G	7.0 – 13.5	-	7.7 – 30.7	-	16.3 – 69.7	-
Dihydrocodéine	1.5 – 15.7	0.9 – 4.6	4.2 – 17.0	1.2 – 7.6	3.6 – 38.7	2.6 – 17.5
EDDP	3.0 – 15.3	5.1 – 13.5	11.6 – 15.8	5.4 – 17.3	26.2 – 36.5	12.8 – 37.8
Ethylmorphine	8.5 – 12.8	4.2 – 6.5	15.2 – 20.5	4.4 – 27.5	33.6 – 46.3	9.4 – 63.3
Hydrocodone	6.6 – 20.4	1.2 – 5.8	6.6 – 20.4	1.6 – 5.8	14.0 – 43.0	3.4 – 12.2
Hydromorphone	3.3 – 13.4	1.1 – 8.4	5.2 – 17.4	4.2 – 22.4	11.6 – 39.3	9.6 – 51.6
Méconine	8.3 – 20.3	-	10.0 – 25.2	-	21.5 – 59.1	-
M3G	3.4 – 18.4	3.5 – 11.9	3.4 – 13.3	4.4 – 26.8	7.2 – 28.1	9.2 – 60.8
M6G	4.8 – 13.3	5.1 – 20.9	5.4 – 17.5	6.0 – 20.9	11.5 – 39.6	13.0 – 44.1
Méthadone	2.5 – 12.1	3.0 – 10.3	4.9 – 8.8	3.0 – 19.5	12.0 – 19.9	6.3 – 44.0
Morphine	4.2 – 19.9	1.6 – 10.9	5.3 – 11.6	3.1 – 10.7	14.0 – 26.2	6.8 – 24.5
Naloxone	3.8 – 14.5	2.4 – 13.6	8.1 – 19.5	3.3 – 21.2	18.4 – 44.1	7.0 – 47.8
Naltrexone	2.1 – 7.8	2.4 – 13.5	2.7 – 17.9	3.1 – 24.0	5.8 – 41.1	6.9 – 54.06
Norbuprénorphine	2.7 – 17.5	7.6 – 11.2	6.7 – 19.9	7.6 – 20.6	14.3 – 48.6	16.1 – 46.7
Norcodéine	3.9 – 20.1	3.0 – 7.6	6.1 – 20.1	6.4 – 13.0	15.0 – 42.3	13.5 – 30.0
Normorphine	1.6 – 8.4	-	3.7 – 19.8	-	8.5 – 45.1	-
Noscapine	5.1 – 9.4	-	6.9 – 13.9	-	15.3 – 29.3	-
Oxycodone	4.9 – 14.1	0.6 – 5.6	8.1 – 16.0	3.5 – 10.2	18.0 – 53.3	8.0 – 22.5
Papavérine	3.7 – 8.6	-	6.8 – 11.5	-	15.3 – 25.9	-
Pholcodine	2.6 – 16.5	3.8 – 12.9	2.6 – 21.6	5.1 – 14.3	5.6 – 47.4	11.0 – 30.8
Benzoylecgonine	-	3.2 – 5.6	-	3.2 – 11.4	-	6.9 – 25.7
Cocaéthylène	-	2.5 – 7.0	-	2.4 – 12.8	-	5.1 – 28.7
Cocaïne	-	3.4 – 8.7	-	3.5 – 14.9	-	7.5 – 33.5
Amphétamine	-	1.9 – 10.6	-	4.9 – 14.0	-	11.0 – 30.8
Méthamphétamine	-	1.1 – 6.7	-	4.8 – 22.7	-	10.0 – 52.4
MDMA	-	1.9 – 4.7	-	2.0 – 14.4	-	4.4 – 33.3
MDA	-	2.3 – 6.6	-	4.3 – 14.9	-	9.7 – 24.4
MBDB	-	2.4 – 5.7	-	2.7 – 19.6	-	5.9 – 45.2
Cannabis						
THC	3.5 – 6.2		3.8 – 9.4		8.2 – 21.1	
THC-OH	2.0 – 4.8		2.2 – 14.2		4.8 – 32.4	
THC-COOH	3.3 – 8.5		4.8 – 12.8		10.5 – 28.6	

Table 2 : Précision et incertitude de mesure des 3 méthodes développées dans le cadre de ce travail

CHAPITRE III

PHARMACOCINETIQUE DE L'HEROINE

ESTIMATION DU DELAI ENTRE LA CONSOMMATION D'HEROINE ET LE PRELEVEMENT BIOLOGIQUE



III.1 – Pharmacocinétique de l'héroïne

III.1.1 – Aspects théoriques

Depuis quelques années, la grande majorité (80%) de la population héroïnomanie liégeoise n'injecte plus l'héroïne mais l'inhale au moyen d'une technique appelée « chasing the dragon ». Ce mode de consommation consiste d'abord à déposer la poudre d'héroïne sur un morceau de feuille d'aluminium et ensuite à la chauffer au moyen d'un briquet. Les vapeurs produites sont alors inhalées par le consommateur au moyen d'une paille. L'expression « chasing the dragon » fait référence à la manière dont l'opium était fumé par les Chinois dans les années 1950. La biodisponibilité de l'héroïne par voie pulmonaire est de l'ordre de 50%, elle dépend de l'habileté du consommateur à fumer et est donc soumise à de larges variations interindividuelles. L'héroïne est immédiatement résorbée à travers la muqueuse pulmonaire et rapidement métabolisée (59-63).

Que ce soit après administration parentérale ou résorption pulmonaire, les concentrations plasmatiques d'héroïne diminuent rapidement et l'héroïne n'est déjà plus détectable dans le sang après 45 minutes (Figure 4). La diminution des concentrations plasmatiques en héroïne est biphasique : une phase ultra-rapide ($T_{1/2}$ égale à environ 2 minutes) et une phase rapide ($T_{1/2}$ égale à environ 3.5 minutes). La clairance élevée (environ 900 L/h) de l'héroïne est due à sa métabolisation rapide par des estérases sanguines et hépatiques pour lesquelles il existe une grande variété de génotypes et de phénotypes, à son hydrolyse spontanée au pH basique du sang et à sa distribution tissulaire importante. La demi-vie de l'héroïne est comprise entre 1.3 et 7.8 minutes selon les auteurs. Elle n'aurait jamais été détectée dans les urines des consommateurs (62-72).

La 6-acétylmorphine (6AM) est formée très rapidement, elle atteint sa concentration maximale après environ 2 minutes. La concentration de 6AM au pic est 2 à 4 fois plus faible

après inhalation qu'après injection intraveineuse, elle peut être détectée dans le sang pendant 1 à 3 heures ($T_{1/2}$ de 20 minutes en moyenne). La 6AM est métabolisée en morphine par les mêmes estérases que celles qui interviennent dans le métabolisme de l'héroïne. Environ 1.5% de la dose d'héroïne est éliminée sous forme de 6AM dans les urines où elle peut être détectée pendant 1 à 4 heures (62-74).

La concentration maximale de la morphine est atteinte environ 6 minutes après la prise d'héroïne et elle est deux fois moins importante par voie pulmonaire que par voie parentérale. Sa demi-vie est comprise entre 100 et 280 minutes selon les études. Elle subit une glucuroconjugaison par l'uridine 5'-disphosphate-glucuronosyl transférase (principalement, l'UGT 2B7, et secondairement, l'UGT 1A1) surtout dans le foie et dans une moindre mesure dans le cerveau, le rein et l'intestin pour former de la morphine-6-glucuronide et de la morphine-3-glucuronide. Le polymorphisme de l'UGT 2B7 et 1A1 n'aurait aucune influence sur les quantités respectives de morphine libre et conjuguée (75). La morphine conjuguée, plus hydrophile, est principalement excrétée dans les urines, elle peut cependant subir un cycle entéro-hépatique après hydrolyse en morphine libre dans le tractus digestif par des β -glucuronidases de la flore du colon. Septante pourcents de la dose d'héroïne sont éliminés dans les urines sous forme de morphine libre (15%) et conjuguée (55%). La M3G est le métabolite majoritaire sanguin et urinaire de l'héroïne. Les pharmacocinétiques de la M6G et de la M3G ont été peu étudiées, mais selon les renseignements disponibles, leur demi-vie est comprise entre 2.0 et 6.4 heures (62-74).

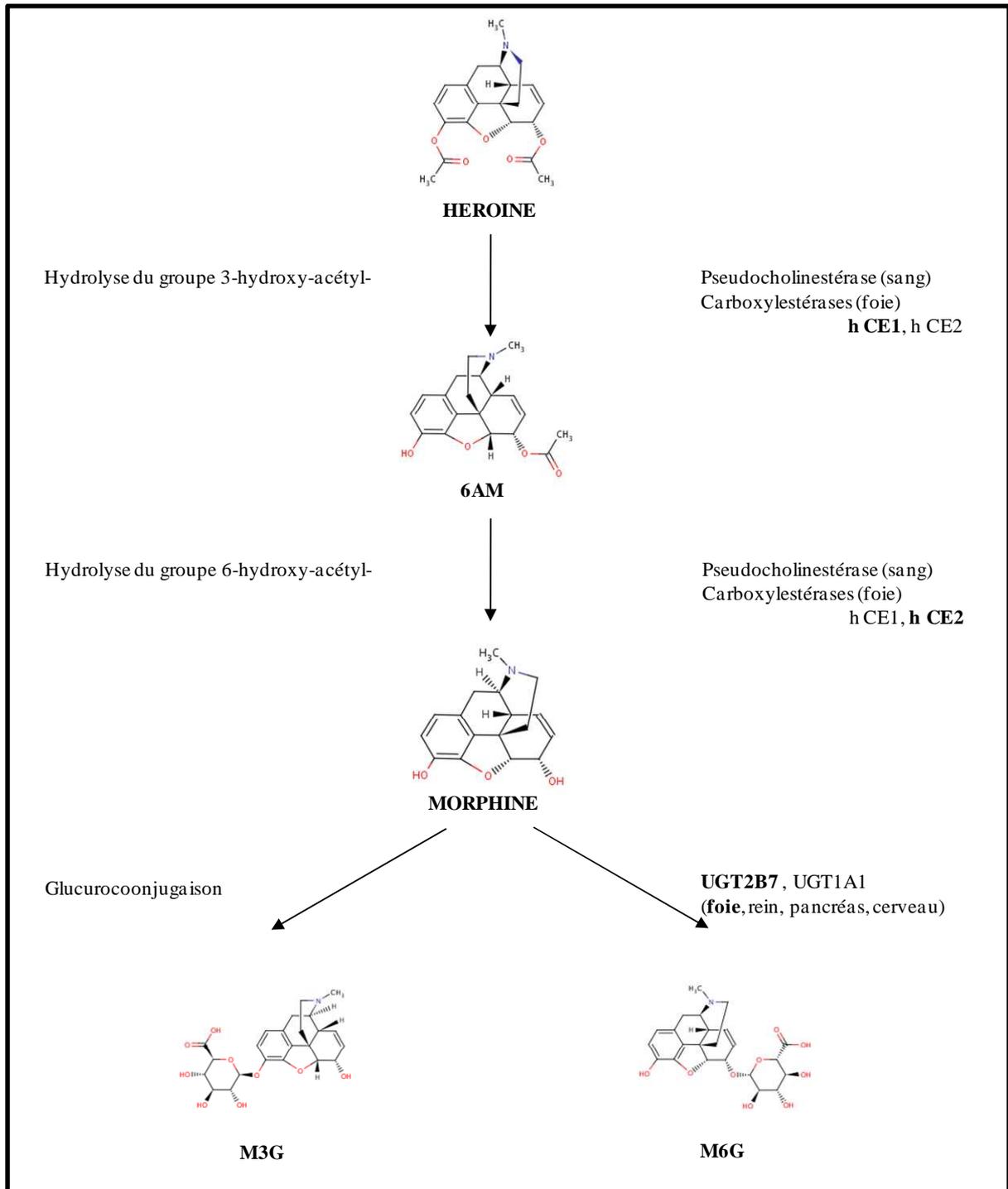


Figure 4 - Métabolisme de l'héroïne et principales enzymes impliquées dans la métabolisation

La métabolisation de l'héroïne peut être influencée non seulement par la consommation d'autres substances psychotropes licites ou illicites mais aussi par l'existence de diverses pathologies (principalement rénales):

- Par exemple, les mêmes carboxylestérases hépatiques sont impliquées dans le métabolisme de l'héroïne et de la cocaïne. En effet, la carboxylestérase humaine 1 (h CE1) hydrolyse la liaison 3-acétyl de l'héroïne pour donner de la 6AM et dans une moindre mesure la liaison 6-acétyl de la 6AM pour donner de la morphine mais elle hydrolyse également la cocaïne en benzoylecgonine et est responsable de la formation de cocaéthylène en présence d'alcool. La carboxylestérase humaine 2 (h CE2) est impliquée dans la déacétylation de l'héroïne en 6AM et de la 6AM en morphine mais catalyse également la transformation de la cocaïne en méthylecgonine. Une compétition pour ces enzymes pourrait donc se produire entre l'héroïne et la cocaïne lorsqu'elles sont consommées en même temps (76-78).
- Selon l'étude de Poletini et al (79), l'alcool éthylique empêcherait l'hydrolyse de la 6AM en morphine en inhibant l'activité de la carboxylestérase et réduirait la glucuroconjugaison de la morphine avec pour conséquence une augmentation de la concentration en morphine libre dans le sang et une diminution de son élimination urinaire et biliaire.
- Des études *in vitro* ont montré qu'il existe une inhibition compétitive de la glucuroconjugaison de la morphine par les benzodiazépines (62).
- L'élimination rénale de la morphine libre et conjuguée étant importante, l'accumulation de morphine peut être considérable chez des sujets présentant des problèmes rénaux graves (62).

III.1.2 – Evolution de la concentration sanguine des principaux métabolites de l'héroïne en fonction du temps chez 11 sujets du groupe expérimental « diacétylmorphine » du projet TADAM

Cette étude fait l'objet de la Publication 4.

Le projet TADAM (80)

Le projet TADAM (projet pilote de traitement assisté par diacétylmorphine DAM - héroïne pharmaceutique) avait pour but d'évaluer l'efficacité et la faisabilité d'un traitement assisté par DAM en Belgique en comparaison avec les traitements habituels des héroïnomanes par la méthadone. Le traitement expérimental consistait à administrer, par injection ou par inhalation, de la DAM à des personnes sévèrement dépendantes de l'héroïne sous la supervision d'une équipe médicale dans un environnement clinique strictement contrôlé, en ambulatoire, et avec une offre de suivi psychosocial. Ce traitement était réservé aux personnes pour lesquelles les traitements existants se sont avérés inefficaces (81-91).

La période de recrutement des sujets de l'expérience a débuté en janvier 2011 et s'est prolongée sur une année. Chaque patient a été traité pendant 12 mois, ce qui a porté à 2 ans la durée totale du projet pilote. Septante-quatre personnes ont été randomisées dans l'étude, 36 dans le groupe expérimental (DAM) et 38 dans le groupe contrôle (méthadone).

Constitution d'un sous-groupe de sujets faisant partie du projet TADAM pour l'étude pharmacocinétique de l'héroïne

Onze sujets (neuf hommes et deux femmes) ont été recrutés sur base volontaire dans le groupe expérimental du projet TADAM indépendamment de leur état de santé et de leur consommation de médicaments ou de stupéfiants. Les caractéristiques de cette population sont reprises à la Table 1 de la Publication 4.

Protocole de l'étude

Quatre ml de sang ont été prélevés à chaque sujet avant la prise du traitement, puis 15, 45 et 90 minutes après l'inhalation de DAM. Tous les sujets consommaient la DAM par inhalation.

Les différents prélèvements ont été analysés selon la méthode décrite dans la Publication 2.

Résultats

Les courbes représentant les concentrations de 6AM, morphine, M6G et M3G en fonction du délai entre l'inhalation de DAM et le prélèvement sont présentées dans la Figure 3 de la Publication 4.

Les temps de demi-vie de la 6AM et de la morphine ont été calculés respectivement à 22.6 ± 9.2 minutes et à 140.6 ± 67.8 minutes. Il ne nous a pas été possible de calculer les temps de demi-vie de la M6G et de la M3G puisque leurs concentrations augmentaient toujours 90 minutes après l'administration de DAM.

Une analyse en composantes principales (Figure 2 de la Publication 4) et l'étude des rapports de concentrations sanguines de 6AM, morphine, M6G et M3G ont été réalisées afin d'évaluer l'influence de facteurs tels que la dose de DAM, les pathologies éventuelles, l'usage concomitant de médicaments, d'alcool et de stupéfiants sur la pharmacocinétique de la DAM. Les résultats de cette étude ont montré que la pharmacocinétique de l'héroïne n'est modifiée que chez les consommateurs de cocaïne.

PUBLICATION 4

Plasma level monitoring of the major metabolites of diacetylmorphine (heroin) by the
“chasing the dragon” route in severe heroin addicts

N. Dubois, I. Demaret, M. Ansseau, E. Rozet, P. Hubert, C. Charlier

Acta Clinica Belgica, **2013**, 68(5), 359-367

Original Article

PLASMA LEVEL MONITORING OF THE MAJOR METABOLITES OF DIACETYLMORPHINE (HEROIN) BY THE "CHASING THE DRAGON" ROUTE IN SEVERE HEROIN ADDICTS

Dubois N¹, Demaret I^{2,3}, Anseau M², Rozet E^{4,6}, Hubert Ph^{4,5}, Charlier C^{1,5}

¹Laboratory of Clinical, Forensic, Environmental and Industrial Toxicology, CHU, Liège;

²Department of Psychiatry, CHU, Liège; ³Department of Human and Social Sciences, University

of Liège; ⁴Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Pharmacy, University of Liège,

⁵CIRM, University de Liège, ⁶F.R.S.-FNRS Postdoctoral Researcher (Belgium)

Correspondence and offprint requests to: Nathalie Dubois, E-mail: nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be

ABSTRACT

The objective of the present study was to verify if severe physical health problems frequently encountered in heroin addicts and the concomitant use of alcohol and legal or illegal drugs other than heroin influenced the pharmacokinetics of the major metabolites of heroin.

We conducted a 90 minutes follow-up of the plasma concentrations of the pharmaceutical heroin, named diacetylmorphine (DAM), in patients recruited in a DAM assisted treatment centre, TADAM (Traitement Assisté par DiAcétylMorphine) aimed to compare the efficacy of heroin-assisted treatment (HAT) compared with methadone maintenance treatment (MMT) for heroin users considered as treatment resistant patients and who have severe physical and mental health problems.

Eleven patients were recruited. Blood samples were collected at baseline and 15, 45 and 90 minutes after DAM administration. All patients received DAM by the "chasing the dragon" route. Plasma samples were analyzed by a previously described ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC/MS-MS) method.

A principal component analysis (PCA) was performed and 8 metabolite concentrations ratios were calculated to evaluate the influence of various factors (DAM dose, patient pathologies, concomitant use of medications, methadone, street heroin, alcohol and cocaine) on heroin metabolite pharmacokinetics. It seemed to be not affected by the DAM dose, patient pathologies and the concomitant use of medications, methadone, street heroin and alcohol. Cocaine use was the only parameter which showed differences in heroin pharmacokinetics.

Key words: heroin metabolites, pharmacokinetics, inhalation, polydrug use

INTRODUCTION

In the European Union, between 1.3 and 1.4 million persons were considered as problematic opioid users in 2008 corresponding to 3.6-4.4 cases per 1000 population aged 15-64 years. (1). In Belgium, the use of heroin seemed to remain stable in 2005. The prevalence of heroin use was less than 1% but mortality varied from 5 to 35 per thousand person-years in opiate addicts (2). In order to reduce and possibly eliminate illicit heroin consumption and making patients more socially integrated, different substitution treatments were tried. Methadone maintenance treatment (MMT) is the first line treatment for opiate addicts in Belgium (1). However, among patients who followed MMT, many can be considered as treatment-resistant, sometimes because they don't respond positively to heroin replacement by methadone, sometimes because they present a genetic profile very different from others (3). It was suggested that for these patients, a treatment with pharmaceutical heroin could also be used as substitution treatment therapy (4). Since 1994, six countries experimented heroin-assisted treatment (HAT): Switzerland (4), the Netherlands (5), Spain (6), Germany (7), Canada (8) and the United Kingdom (9). It was shown that medical prescription of pharmaceutical heroin (diacetylmorphine or DAM) to chronic heroin addicts who have not responded favourably to MMT is effective in terms of physical and mental health, illicit heroin use and criminality and, in the same time, the feasibility and the safety of HAT were demonstrated (10-12). In Belgium, a project subsidized by the Federal Government, called TADAM (Traitement Assisté par

DiAcétylMorphine), began in January 2011 in the city of Liege, where the number of heroin addicts is important (12). It is a randomised controlled study which evaluates the efficacy of MMT compared with HAT for patients who have been consuming heroin compulsively for many years, for whom MMT has failed and who present severe physical and mental health problems. When included, the patients received DAM prescribed by physicians one to three times a day in an outpatient centre where they can inject the product themselves or use the product by inhalation using the "chasing the dragon" technique: heroin is heated gently on aluminium foil with a lighter controlled by the patient. The heroin vapours generated by heating are inhaled into the lungs, using a straw in the mouth. The fumes appear to take the shape of the undulating tail of a dragon (13, 14).

After penetration into the lungs, heroin is absorbed almost instantly. Heroin is considered as a pro-drug that acts mainly by its agonistic metabolites. In plasma, heroin is rapidly hydrolysed in 6-monoacetylmorphine (6AM) and then into morphine. These reactions are catalysed by different types of esterases in blood (plasma and erythrocytes), liver and brain. Morphine is then glucuronidated by several subtypes of uridine-5'-diphosphateglucuronosyltransferase (UGT), mainly in the liver, resulting in morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G). The N-demethylation of morphine into the minor metabolite normorphine is mediated by cytochrome P450 enzymes 3A4 and 2C8 (11, 15). Heroin metabolism is presented in Figure 1. M3G has no affinity for the μ -opioid receptors and has no pharmacological activity (15), but M6G remains psychoactive.

Polydrug use including the combination of heroin with illicit drugs (cocaine and cannabis), alcohol and sometimes medicines (benzodiazepines, neuroleptics), is today very common among heroin addicts (1). Moreover, severe heroin addicts are often in poor health; they suffer from malnutrition (16) and the prevalence of hepatitis C and HIV infection is higher than in general population because injecting drug users share contaminated injecting materials and have a high risk sexual behaviour (prostitution) (17, 18). The aim of the present study is to verify if the pharmacokinetics of the major metabolites of heroin is influenced by severe physical health problems (hepatitis C, HIV, nephropathy, etc) frequently encountered in a general population of heroin addicts and by concomitant use of alcohol and legal or illegal drugs other than heroin. To achieve this objective, we conducted a 90 minutes follow-up of the plasma concentrations of the DAM metabolites in patients recruited in the TADAM centre receiving DAM by the "chasing the dragon" route. No restrictions concerning health, concomitant medication, alcohol and cocaine use were defined.

METHODS

Diacetylmorphine

Diacetylmorphine was imported from the Netherlands, where injectable and inhalable forms of DAM were registered for opioid addiction treatment in 2006. The powder inhaled by the patients is a mix of heroin and caffeine in a ratio of 3: 1.

Patients

Patient characteristics are presented in Table 1. Two female and nine male volunteers aged 29-50 years were recruited for the study. Three patients (patients 1, 7 and 8) had a haemoglobin level lower than the lower limit of reference values. Four patients (patients 1, 2, 3 and 10) had impaired hepatic function with liver amino transferases ASAT (aspartate aminotransferase) and ALAT (alanine aminotransferase) and/or serum gamma-glutamyltransferase (GGT) higher than the normal upper limit. Three patients (patients 1, 2 and 4) had a disturbed renal function: they had a creatinine clearance lower than 90 ml/min, associated with a serum creatinine concentration of 179 μ mol/L for patient 1, creatinine clearance was calculated according to the Cockcroft-Gault equation.

Concerning comorbidity and comediations, patients 1 and 2 were HIV positive and received abacavir, lamivudine, lopinavir and ritonavir as antiretroviral treatment, 4 patients were suffering from chronic hepatitis C; patients 1 and 3 were consuming high quantity of alcohol daily; 5 patients were receiving psychotropic drugs as chronic anxiety treatment; 3 received 30 mg methadone daily. They were also using other psychotropic drugs: cocaine on a regular basis for 5 of them and cannabis for 8 of them.

All patients received DAM 3 times a day (morning, midday and evening session) – except for patients 1 and 2 who received DAM 2 times a day (midday and evening session) – 7 days a week. DAM daily doses ranged between 600 and 900 mg. No dose changes had been made for a period of at least 15 days before entering the study.

Study protocol

Participation to the study was proposed to the patients on a voluntary basis and a written informed consent was obtained from all patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Liege (Belgian agreement n° B707201010144).

The study took place during midday administration for 8 patients and during evening administration for 3 patients; the DAM dose ranged between 150 and 400 mg (median: 250 mg). DAM was self-administered (inhalation) under the supervision of trained nurses; the treatment duration was 20 minutes on average. Blood samples were drawn from an intravenous catheter placed in the arm at baseline (10 minutes before the treatment inhalation) and 15, 45 and 90 minutes after the DAM administration. Between the first blood sampling and the last, the maximum delay was 2 hours. Patients had to stay in the TADAM deliverance centre all the time; they were allowed to smoke tobacco cigarettes twice. The sample at 90 minutes was not drawn for patient 1 because of venous sclerosis.

Samples analysis

Blood was collected in two 4 ml polypropylene tubes, containing 2.25 mg/ml sodium fluoride. Sodium fluoride inhibits the plasma esterase activity and contributes to stabilise analyte concentration (19). Blood samples were centrifuged immediately and plasma fractions were stored at -20°C prior to analysis which was performed the following day. The quantification of opiates and opiods in plasma was done according to a previously described method (20). Briefly, 50 μ L of deuterated

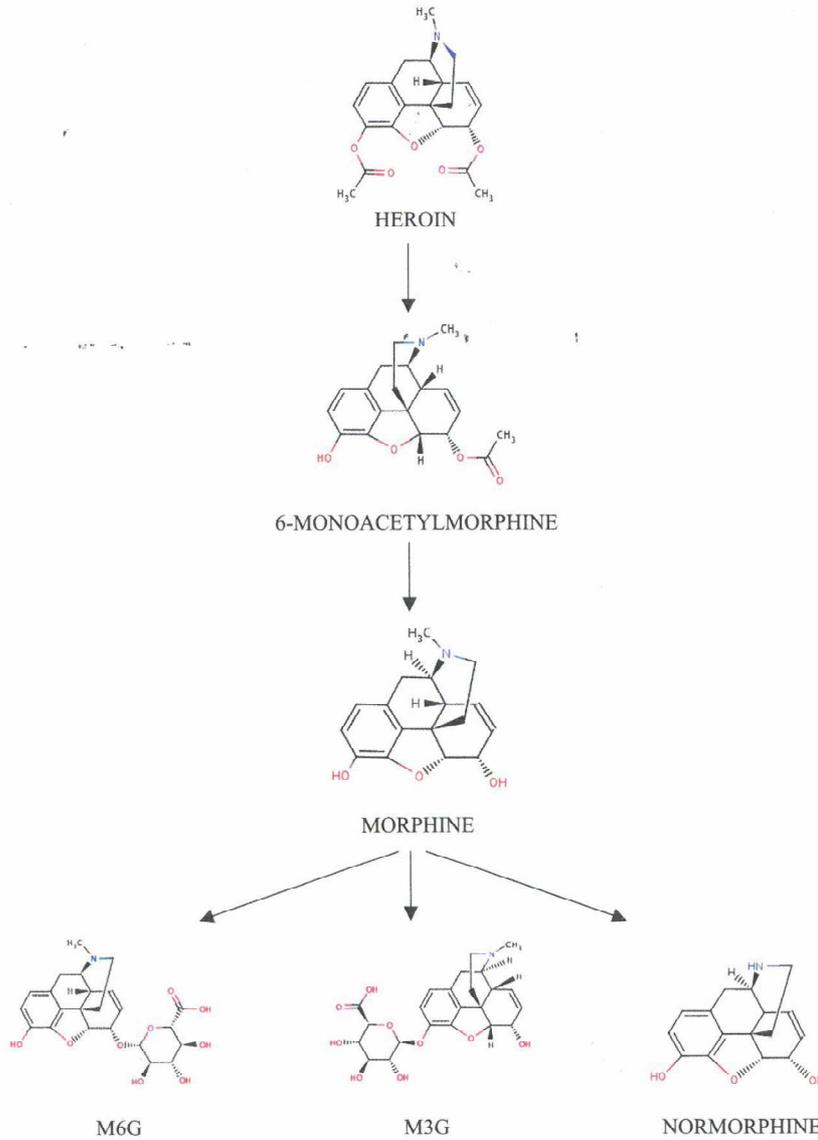


Figure 1: Heroin metabolism.

internal standards were added to 500 μL of plasma which were next acidified with 0.15N HCl. Oasis MCX (30 mg, 1mL) cartridges purchased from Waters (Zellik, Belgium) were used for solid phase extraction (SPE). The conditioning was performed with methanol, water, and 10mM citric acid and the acidified sample was loaded onto the column. Then, the cartridges were washed with 2% formic acid and dried. The elution was done

with ammonia in methanol (5/95: V/V). The eluate was evaporated to dryness and reconstituted with a mixture of 5 mM ammonium formate pH3 and methanol adjusted to pH3 with formic acid (90/10: V/V). Ten μL were injected on the ultra-high pressure liquid chromatograph (UHPLC) Acquity coupled to a tandem mass spectrometer Quattro Premier (Waters, Zellik, Belgium). The chromatographic separation was performed on

Table 1 Patient characteristics

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11	Reference Interval
Sex	M	F	M	F	M	M	M	M	M	M	M	-
Age (years)	47	50	45	44	41	35	34	35	29	41	49	-
Length (m)	1.78	1.60	1.80	1.63	1.76	1.75	1.78	1.76	1.74	1.81	1.78	-
Weight (kg)	62	68	61	58	68	67	65	68	70	83	91	-
Body mass index (kg/m ²)	19.6	26.6	18.8	21.8	22.0	21.9	20.5	22.0	23.1	25.3	28.7	20-25
Hb (g/dL)	13.2	14.9	14.6	14.4	14.6	15.9	13.1	12.5	13.3	15.0	14.5	M: 13.3-17.2 F: 11.7-15.0
ALAT (U/L)	42	41	50	15	10	10	n.a.	10	14	38	20	6-40
ASAT (U/L)	25	43	79	18	21	18	n.a.	13	20	32	27	14-40
GGT (U/L)	175	145	56	17	20	19	45	10	8	65	15	5-50
Creatinine (µmol/L)	178.6	75.7	66.0	80.1	73.0	81.8	71.3	66.9	83.6	75.7	60.7	M: 65-120 F: 50-100
Creatinine clearance (ml/min)	40	84	110	72	115	107	121	133	116	136	170	M: 100-140 F: 90-130
HIV	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
Hepatitis C	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	-
DAM daily dose (mg)	750	600	650	700	700	900	750	650	900	700	675	-
DAM dose (mg)	400	300	250	200	200	300	250	150	300	200	175	-
Methodone treatment	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	-
Cocaine use	No	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	-
Cannabis use	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	-
Alcohol abuse	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	-
HIV treatment Medication	Kivexa*	Kivexa*	No	No	No	No	No	No	No	No	No	-
	Kaletra*	Kaletra*	No	No	No	No	No	No	No	No	No	-
Psychotropic drugs	Trazodone	Trazodone	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam	No	No	No	Trazodone	No	-
	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam	Clonazepam	No	No	No	No	No	-
	Prothipendyl	Prothipendyl										-

Hb = haemoglobin; ALAT = alanine aminotransferase; ASAT = aspartate aminotransferase; GGT = gamma-glutamyltransferase; HIV = Human Immunodeficiency Virus. n.a. = not available.

an Acquity High Strength Silica HSS-T3 column (100×2.1 mm, 1.8 μm, Waters). The mobile phase consisted in 5mM ammonium formate in water (pH3) and methanol adjusted to pH3 with formic acid delivered according to a gradient mode. The tandem mass spectrometer operated in the positive electrospray mode at 1.0 kV. Two multiple reaction monitoring (MRM) sequences were studied by analyte. Illicit heroin consumption markers (6-acetylcodeine, papaverine, noscapine, meconine and 7-desmethylmeconine) were also analysed with this technique.

RESULTS

Exploratory data analysis

To understand the behaviour of the DAM metabolites and the correlation between various factors, a principal component analysis (PCA) on the correlation matrix was performed. The factors studied with the PCA were the logarithm of the concentrations of the DAM metabolites 6AM, morphine, M3G, M6G, the dose of DAM administered and time of blood sampling. The first two principal components (PCs) explained 37.5% and 24.5% of the variability, respectively. Figure 2 shows the scores plot and the loadings plot of these two PCs. When looking at the scores plot in Figure 2, we can observe that these two PCs discriminate the patients in two groups: those who have consumed cocaine and those who have not. This group generation is mainly due to the 2nd PC and the loadings that are mostly responsible of this behaviour are morphine, M3G and M6G concentrations.

Finally, the dose of DAM administered is strongly positively correlated with M3G and M6G concentrations and not correlated with 6AM concentration.

Pharmacokinetics of DAM metabolites

The plasma concentrations-time curves of 6AM, morphine, M3G, M6G and normorphine are presented in Figure 3.

Three patients (patients 1, 2 and 3) were found positive for 6AM in plasma samples collected prior to DAM administration. The highest concentration of 6AM was detected 15 minutes after the end of the inhalation, its median value was equal to 68 μg/L and ranged from 15 to 156 μg/L; the concentration decreased rapidly until 21 and 9 μg/L after 45 and 90 minutes respectively. The calculated 6AM plasma half-life was 22.6 ± 9.2 minutes on average.

Morphine was present in all collected samples. The residual median concentration of morphine at baseline was 68 μg/L, ranging from 33 to 252 μg/L; morphine reached its highest level 15 minutes after DAM administration with a median concentration of 158 μg/L. The morphine concentration decreased after 45 minutes for 8 patients. The morphine median concentrations were 138 and 117 μg/L after 45 and 90 minutes respectively. The morphine plasma half-life was calculated at 140.6 ± 67.8 minutes on average.

M6G was found positive in all collected samples. The M6G plasma concentration at baseline was 191 μg/L, ranging from 73 to 684 μg/L. The highest concentration of M6G was reached in samples taken at 45 and 90 minutes. The M6G median concentrations were 275, 295 and 251 μg/L after 15, 45 and 90 minutes respectively.

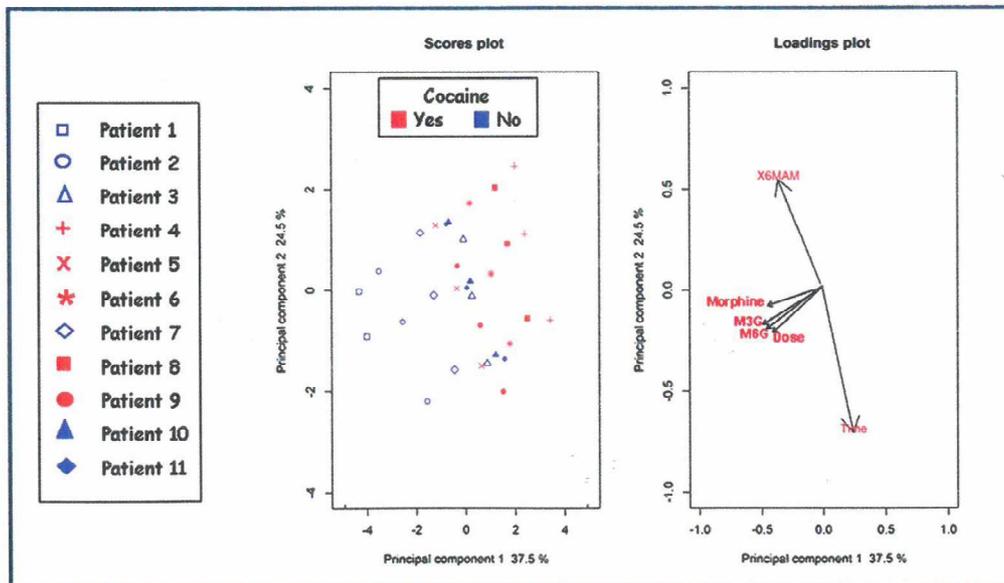


Figure 2: Scores plot and loadings plot of the two first principal components of the Principal Component Analysis of the metabolites 6AM (X6MAM), morphine, M3G, M6G, the dose of DAM administered (Dose) and the time of blood sampling (Time).

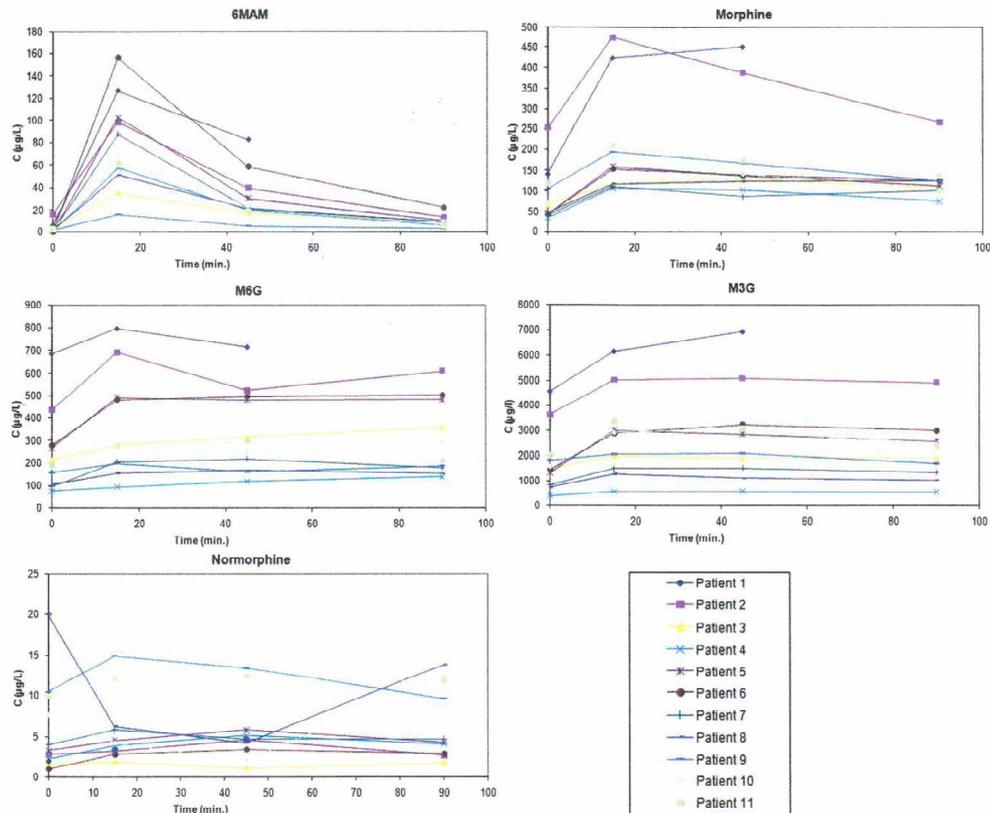


Figure 3: Plasma concentrations-time curves of 6AM, morphine, M3G, M6G and normorphine.

M3G was found positive in all collected samples. The M3G plasma concentration at baseline was 1471 µg/L, ranging from 367 to 4548 µg/L. The highest concentration of M3G was reached in samples taken at 15 and 45 minutes. The M3G median concentrations were 2882, 2841 and 2106 µg/L after 15, 45 and 90 minutes respectively.

It was impossible to calculate plasma half-life for glucuronated metabolites since their concentrations were not decreasing 90 minutes after DAM administration.

Normorphine concentrations were low (<20 µg/L) in all samples.

DAM metabolite median, minimum and maximum concentrations are presented in Table 2.

Influence of biological and clinical parameters on DAM metabolite pharmacokinetics

The influence of biological and clinical parameters on DAM metabolite pharmacokinetics was evaluated on the basis of the study of 8 metabolite concentrations ratios calculated at each sampling time. The ratios between the different metabolites

were chosen taking into account their chronology of appearance: DAM was first deacetylated in 6AM and in morphine which was then converted to M6G and M3G by glucuronidation. The 8 studied ratios are presented in Table 3. It was shown that almost all ratios were stable during the 90 minutes follow-up except for ratios which have 6AM as denominator: "MOR/6AM", "(MOR + M3G)/6AM", "(MOR + M6G)/6AM" and "(MOR + M6G + M3G)/6AM".

Patients were grouped according to several criteria: low BMI (lower than 20), haemoglobin low level (lower than 13.3 g/dl), impaired renal function (creatinine clearance lower than 90 ml/min.), disturbed hepatic function (GGT and/or ASAT and ALAT higher than the upper limit of normal), HIV and hepatitis C seropositivity, alcohol abuse, cocaine, methadone and psychotropic drug use.

The mean values for the ratios and for 6AM and morphine half-lives were compared using a t-student test and a Mann-Whitney test.

For patients with hepatic disease (patients 1, 2, 3, 9 and 10), when compared with other patients, no difference was

Table 2 Metabolite concentrations expressed in µg/L in samples collected at baseline and 15, 45 and 90 minutes after DAM administration

Time (minutes)	Baseline		+ 15		+ 45		+ 90	
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range
6AM	ND	ND-16	68	15-156	21	5-82	9	2-22
Morphine	68	33-252	158	106-473	138	87-450	117	75-266
M3G	1471	367-4548	2882	542-6140	2841	555-6923	2106	526-4905
M6G	191	73-684	275	93-795	295	120-714	251	139-608
Normorphine	4	ND-16	5	2-14	5	2-13	5	2-13

ND = Not detected.

Table 3 Heroin metabolite concentrations ratios. Values are expressed as median (range)

Time (min.)	M3G/M6G	M3G/MOR	M6G/MOR	(M3G+M6G)/MOR	MOR/6AM	(MOR+M3G)/6AM	(MOR+M6G)/6AM	(MOR+M6G+M3G)/6AM	(6AM+MOR+M6G)/M3G
Baseline	6.92 (4.95-11.34)	20.15 (11.14-33.56)	2.38 (1.54-6.49)	22.53 (13.37-40.05)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.19 (0.15-0.29)
+ 15	7.27 (5.79-12.16)	14.51 (5.13-18.93)	1.52 (0.89-3.15)	16.39 (6.02-22.08)	2.62 (0.98-12.58)	45.29 (11.36-145.56)	6.60 (3.49-25.43)	49.27 (13.00-158.42)	0.25 (0.16-0.47)
+ 45	6.85 (4.61-12.86)	15.37 (5.41-23.24)	1.69 (0.97-3.59)	17.03 (6.58-26.83)	5.88 (2.37-34.77)	98.92 (33.90-468.00)	16.97 (10.90-68.46)	114.85 (40.11-501.69)	0.22 (0.13-0.44)
+ 90	7.03 (3.78-11.06)	17.31 (7.03-23.94)	2.07 (1.25-4.30)	19.69 (8.89-27.99)	13.27 (5.69-51.21)	245.11 (115.56-746.21)	47.27 (28.73-129.33)	288.44 (142.33-824.33)	0.22 (0.15-0.42)

n.a. = not available

found for the 8 tested ratios and for 6AM and morphine half-lives. Therefore, a disturbed hepatic function or chronic hepatitis C did not affect DAM pharmacokinetics.

For patients suffering from impaired renal function (patients 1, 2 and 4), when compared with other patients, no difference was found between the 8 calculated ratios and between 6AM and morphine half-lives. Impairment of renal function did not significantly modify heroin transformation into metabolites.

Similarly, low haemoglobin levels (patients 1, 7 and 8) did not influence heroin metabolism since no difference between metabolite concentrations ratios and 6AM and morphine half-lives was observed.

For the 2 patients (patients 1 and 2) infected by HIV and treated by abacavir, lamivudine, lopinavir and ritonavir, calculated ratios were not significantly different compared to seronegative patients.

The same methodology was applied to patients consuming alcohol daily, patients treated with methadone and with psychotropic drugs showing that concomitant use of alcohol, methadone and psychotropic drugs did not change DAM metabolism.

For the group of cocaine users, several differences were found for the calculated ratios as suggested previously by the scores plot of Figure 2. After 15 minutes, the ratios "MOR/6AM", "(MOR + M3G)/6AM" and "(MOR + M6G)/6AM" were found respectively 2.0, 2.5 and 2.2 times lower in cocaine users compared to other patients. After 45 minutes, the 2 ratios "(MOR + M3G)/6AM" and "(MOR + M6G + M3G)/6AM" were found respectively 2.2 and 2.0 times lower in cocaine users. After 90 minutes, no ratio was found different in cocaine users. Mann-Whitney test for those ratios is presented in Table 4.

Finally, patient 2 was found positive for the markers of street heroin consumption (acetylcodeine, papaverine, noscapine, meconine and 7-desmethyimeconine) but metabolite concentrations ratios were not modified.

DISCUSSION

The aim of the present study was to evaluate the evolution of heroin metabolite concentrations immediately after heroin consumption in severe heroin addicts without ineligibilities concerning health, comedication, alcohol and cocaine use. To our knowledge, only one study is available on heroin metabolite pharmacokinetics by the "chasing the dragon" technique in a general population of heroin addicts (21). Moreover, the pharmacokinetics of the "chasing the dragon" consumption mode has been investigated in only few studies (21, 22) while it is the most appreciated by occidental European heroin addicts since few years (1). Heroin metabolite concentrations levels were similar to levels found in other studies (21). The design of our study did not allow us to calculate the plasma half-life for M6G and M3G since their concentrations were not decreasing enough after 90 minutes which was the time of the last collected sample. 6AM and morphine plasma half-lives were similar to those found in the Rook's studies (21, 22). Almost all studied heroin metabolite concentrations ratios were stable – except for those which have 6AM as denominator – for all patients during the 90 minutes study whatever the DAM dose, the patient pathologies and the concomitant use of medications, methadone, street heroin and alcohol. Ratios with 6AM as denominator were found significantly lower in cocaine users and PCA showed two distinct groups depending on the consumption

Table 4 Mann-Whitney test for MOR/6AM, (MOR+M3G)/6AM and (MOR+M6G)/6AM ratios 15 minutes after DAM treatment, for (MOR+M3G)/6AM and (MOR+M6G+M3G)/6AM ratios 45 minutes after DAM treatment

	Cocaine users	No cocaine users
15 minutes after DAM treatment		
MOR/6AM		
	n = 4	n = 7
Median	1.70	3.38
Range	1.25-2.29	0.98-12.58
<i>p</i>	0.0424	
(MOR+M3G)/6AM		
	n = 4	n = 7
Median	22.68	56.10
Range	11.36-30.84	19.45-145.56
<i>p</i>	0.0121	
(MOR+M6G)/6AM		
	n = 4	n = 7
Median	4.47	9.63
Range	3.49-6.35	4.05-25.43
<i>p</i>	0.0121	
45 minutes after DAM treatment		
(MOR+M3G)/6AM		
	n = 4	n = 7
Median	63.37	138.97
Range	33.90-98.92	57.55-468.00
<i>p</i>	0.0424	
(MOR+M6G+M3G)/6AM		
	n=4	n=7
Median	75.50	150.53
Range	40.11-114.85	66.08-501.69
<i>p</i>	0.0424	

of cocaine. This can be explained by the fact that cocaine and heroin metabolism are catalysed by the same liver carboxylases (23); Rook et al. found that the terminal half-life of 6AM was prolonged by 13% in cocaine addicts (21). As shown on the scores plot of Figure 2, the cocaine users had generally higher blood concentration of 6AM and lower blood concentration of morphine, M3G and M6G than non-cocaine consumers.

The ratio between psychoactive compounds (6AM, morphine, M6G) and the non-psychoactive metabolite (M3G) was stable; patients had therefore a constant quantity of circulating pharmacologically active substances during at least 4 hours, the elapsed time between morning and midday or between midday and evening administrations.

The only metabolite concentrations ratio calculated in other studies was the M3G/M6G ratio which was equal to 7.0 on average in our study and was similar to the mean ratio of 5.8 found by E. Rook on 9 pharmaceutical heroin inhalers (21).

It seems that antiretroviral therapy did not affect the pharmacokinetics of DAM, as it is the case for methadone (24), this could be expected since cytochrome P450 enzymes

are not very involved in heroin metabolism. In the same order of ideas, we did not note influence of alcohol on heroin pharmacokinetics as it was suggested in another study (25).

Conclusion

The pharmacokinetics of heroin metabolites seemed to be not affected by the DAM dose, patient pathologies and the concomitant use of medications, methadone, street heroin and alcohol. Cocaine use was the only parameter which showed differences in heroin pharmacokinetics.

Acknowledgments

The first author thanks TADAM centre nurses and patients for their kind collaboration to the study.

A research grant from the Belgium National Fund for Scientific Research (FRS-FNRS) to E. Rozet is gratefully acknowledged.

CONFLICT OF INTEREST: None.

REFERENCES

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Annual Report 2010: The State of the Drugs Problem in Europe. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2011.
- Robaey G, Mathei C, van Ranst M, Buntinx F. Substance use in Belgium: Prevalence and management. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; LXVIII: 46-49.
- Charlier C, Dessalles MC, Plomteux G. Methadone maintenance treatment: is it possible to adapt the daily doses to the metabolic activity of the patient? *The Drug Monit* 2001; 23: 1-3.
- Perneger T, Giner F, del Rio M, Mino A. Randomised trial of heroin maintenance programme for addicts who fail in conventional drug treatments. *BMJ* 1998; 317: 13-18.
- van den Brinck W, Hendriks V, Blanken P, Koeter M, van Zwielen B, van Ree J. Medical prescription of heroin to treatment resistant heroin addicts: two randomized controlled trials. *BMJ* 2003; 327: 310-316.
- March J, Oviedo-Joekes E, Perea-Milla E, Carrasco F, the PEPSA team. Controlled trial of prescribed heroin in the treatment of opioid addiction. *J Subst Abuse Treat* 2006; 31: 203-211.
- Haasen C, Verthein U, Degkwitz P, Berger J, Krausz M, Naber D. Heroin-assisted treatment for opioid dependence. *Br J Psychiatry* 2007; 191: 55-62.
- Oviedo-Joekes E, Nosyk B, Marsh D, Guh D, Brissette S, Gartry C et al. Scientific and political challenges in North America's first randomized controlled trial of heroin assisted-treatment for severe heroin addiction: rationale and design of the NAOMI study. *Clin Trials* 2009; 6: 261-271.
- Strang J, Metrebian N, Lintzeris N, Potts L, Carnwath T, Mayet S et al. Supervised injectable heroin or injectable methadone versus optimised oral methadone as treatment for chronic heroin addicts in England after persistent failure in orthodox treatment (RIOTT): a randomised trial. *Lancet* 2010; 375: 1885-1895.
- Ferri M, Davoli M, Perucci CA. Heroin maintenance for chronic heroin-dependent individuals. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 12: CD003410.
- Blanken P, van den Brinck W, Hendriks V, Huijsman I, Klous M, Rook E et al. Heroin-assisted treatment in the Netherlands: history, findings, and international context. *Eur Neuropsychopharmacol* 2010; 20(2): 5105-5158.
- Demaret I, Lemaitre A, Anseau M. L'efficacité du traitement assisté par diacétylmorphine (héroïne pharmaceutique) à l'étranger. *Rev Med Liege* 2010; 65: 681-687.
- Pui-Nin Mo B, Leong Way E. An assessment of inhalation as a mode of administration of heroin by addicts. *J Pharmacol Exp Ther* 1966; 154(1): 142-151.
- Strang J, Griffiths P, Gossop M. Heroin smoking by « chasing the dragon »: origins and history. *Addiction* 1997; 92(6): 673-683.
- Rook E, Huijtema A, van den Brinck W, van Ree J, Beijnen J. Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Curr Clin Pharmacol* 2006; 1: 109-118.
- Santolaria-Fernandez F, Gomez-Sirvent JL, Gonzalez-Reimers C, Batista-Lopez J, Jorge-Hernandez J, Rodriguez-Moreno F et al. Nutritional assessment of drug addicts. *Drug Alcohol Depend* 1995; 38: 11-18.
- Piccolo P, Borg L, Lin A, Mellia D, Ho A, Kreek MJ. Hepatitis C virus and human immunodeficiency virus-1 co-infection in former heroin addicts in methadone-maintenance treatment. *J Addict Dis* 2002; 21: 55-66.
- Mathei C, Robaey G, van Damme P, Buntinx F, Verrando R. Prevalence of hepatitis C in drug users in Flanders: determinants and geographic differences. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 127-136.

19. Rook E, Hillebrand M, Rosing H, van Ree J, Beijnen J. 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 Chromatograph B Biomed Sci Appl* 2005; 824: 213-221.
20. Dubois N, Debrus B, Hubert Ph, Charlier C. Validated quantitative simultaneous determination of cocaine, opiates and amphetamines in serum by U-HPLC coupled to tandem mass spectrometry. *Acta Clin Belg Suppl* 2010; 65(1): 75-84.
21. Rook E, Huitema A, van den Brinck W, van Ree J, Beijnen J. Population Pharmacokinetics of heroin and its major metabolites. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(4): 401-417.
22. Rook E, van Ree J, van den Brinck W, Hillebrand M, Huitema A, Hendricks V, Beijnen J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high doses of pharmaceutically prepared heroin, by intravenous or by inhalation route in opioid-dependent patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 86-96.
23. Kamendulis L, Brzezinski M, Pindel E, Bosron W, Dean R. Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 713-717.
24. Bruce R, Altice F, Gourevitch M, Friedland G. Pharmacokinetic drug interactions between opioid agonist therapy and antiretroviral medications: implications and management for clinical practice. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 4: 563-572.
25. Poletini A, Groppi A, Montagna M. The role of alcohol abuse in heroin-related deaths. Evidence for pharmacokinetic interactions between heroin and alcohol. *J Anal Toxicol* 1999; 23(7): 570-576.

III.1.3 – Evolution de la concentration sanguine des principaux métabolites de l'héroïne en fonction du temps chez 11 patients ayant subi un sevrage rapide aux opiacés sous anesthésie générale

Cette étude est rapportée dans la Publication 5.

Le sevrage rapide aux opiacés sous anesthésie générale (RODA) (92-96)

Ce protocole consiste à administrer des antagonistes aux opiacés (naloxone, naltrexone) à un sujet dépendant placé sous anesthésie générale pour induire le syndrome de sevrage.

Constitution d'un groupe de 11 patients traités par RODA pour l'étude pharmacocinétique de l'héroïne

Onze patients, 7 hommes et 4 femmes, ont été recrutés dans le Service de Psychiatrie du CHU de Liège (Prof. M. Ansseau). Tous ces patients héroïnomanes étaient inhaleurs et devaient répondre à des critères stricts : montrer une motivation suffisante pour une désintoxication et être insérés dans un réseau structuré de soins. Ils ne devaient pas présenter une polytoxicomanie (alcool, cocaïne, amphétamines) et ne devaient souffrir ni de troubles psychopathologiques graves, ni d'une pathologie pour laquelle une anesthésie générale était contre-indiquée.

Protocole de l'étude

Huit ml de sang ont été prélevés à chaque sujet lors de son admission dans le Service de Psychiatrie, à l'induction de l'anesthésie puis 0.5, 1, 2, 4 et 6 heures après l'induction. Des échantillons supplémentaires ont été prélevés le lendemain de l'intervention tôt le matin en salle de réveil et les deux jours suivants dans le Service de Psychiatrie.

Les différents prélèvements ont été analysés selon la méthode décrite dans la Publication 1.

Chaque sujet était interrogé sur le moment de sa dernière consommation d'héroïne.

Résultats

Il est généralement admis dans les modèles pharmacocinétiques que l'on retrouve un composé dans le sang pendant 5 fois son temps de demi-vie, c'est-à-dire environ 2 heures pour la 6AM, environ 20 heures pour la morphine et environ 24 heures pour la morphine-6-glucuronide et la morphine-3-glucuronide. Les courbes que nous avons tracées pour chaque patient représentant les concentrations de morphine, de M6G et de M3G en fonction du délai entre la dernière consommation d'héroïne et le prélèvement (Figure 5) montrent, qu'en fait, ces métabolites de l'héroïne persistent dans le sang plus longtemps que ce qui est prédit mathématiquement. En effet, la morphine reste détectable jusqu'à 24 heures après la dernière consommation. En ce qui concerne les dérivés glucuroconjugués de la morphine, des délais de 2 (M6G) et 4 (M3G) jours sont observés.

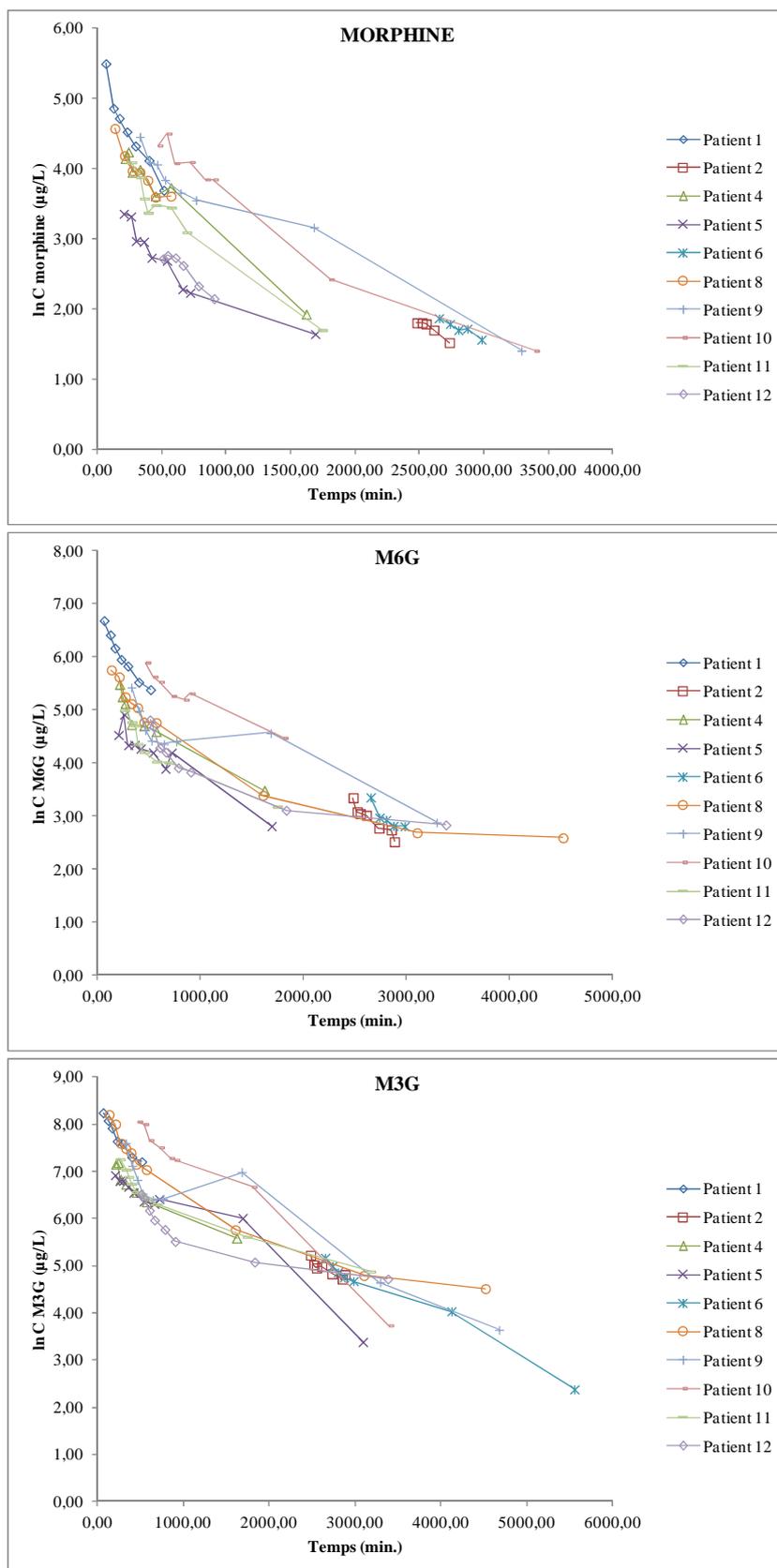


Figure 5 – Courbes « concentration en fonction du temps » pour les principaux métabolites de l'héroïne

III.2 – Estimation du délai entre la consommation d'héroïne et le prélèvement

biologique

Connaître le moment de la consommation d'héroïne permet d'apprécier l'influence de la drogue au moment des faits. Cette approche est particulièrement intéressante dans les affaires médico-légales.

Lorsque l'on dispose des concentrations sanguines des différents métabolites de l'héroïne au moment du prélèvement biologique, un modèle a été établi pour estimer le délai qui sépare le prélèvement du moment de la consommation.

Pour établir le calcul du délai, un modèle linéaire généralisé (GLMM General Linear Mixed Model) a été appliqué aux données obtenues pour les 11 patients RODA (Annexe 9) pour définir trois équations reliant le délai entre la dernière consommation et le prélèvement (Δt) au logarithme népérien des concentrations en morphine, M6G et M3G exprimées en $\mu\text{g/L}$.

Les équations calculées par le modèle sont les suivantes :

$$\text{Pour la morphine : } \Delta t = 73.8 - 27.6 (\ln C_{\text{morphine}}) + 2.66 (\ln C_{\text{morphine}})^2$$

$$\text{Pour la M6G : } \Delta t = 97.9 - 23.8 (\ln C_{\text{M6G}}) + 1.18 (\ln C_{\text{M6G}})^2$$

$$\text{Pour la M3G : } \Delta t = 172.2 - 35.8 (\ln C_{\text{M3G}}) + 1.77 (\ln C_{\text{M3G}})^2$$

III.2.1 – Approche qualitative

L'approche qualitative consiste à prendre en considération la présence de 6AM, de morphine, de M6G et de M3G dans l'échantillon à une concentration supérieure à 5 $\mu\text{g/L}$ pour la 6AM et à 10 $\mu\text{g/L}$ pour la morphine, la M6G et la M3G.

- Si la 6AM, la morphine, la M6G et la M3G sont toutes présentes dans l'échantillon, on considère que le délai entre la consommation et le prélèvement est inférieur à 2 heures, ce qui correspond à 5 fois le temps de demi-vie de la 6AM (Publication 4) ;
- Si la morphine, la M6G et la M3G sont simultanément présentes dans l'échantillon, nous pouvons considérer que le délai est inférieur à 24 heures ;
- Si la M6G et la M3G coexistent dans l'échantillon, le délai entre la consommation d'héroïne et le prélèvement est compris entre 24 et 49 heures ;
- Enfin, si seule la M3G est retrouvée dans l'échantillon, le moment de la dernière consommation est estimé à plus de 49 heures et à moins de 99 heures.

III.2.2 – Approche quantitative

1. Première étape du modèle applicable si la 6AM est présente dans l'échantillon à une concentration supérieure à 5 µg/L

Dans ce cas, on estime le délai entre la consommation et le prélèvement biologique à moins de 2 heures.

2. Deuxième étape du modèle applicable si la 6AM est absente de l'échantillon ou si elle est présente à une concentration inférieure à 5 µg/L

Parmi les 3 équations, on choisit celle qui est d'application au cas traité en fonction des métabolites de l'héroïne encore présents dans l'échantillon sanguin analysé. Ainsi, si la morphine est présente dans l'échantillon en même temps que la M6G et la M3G, on utilisera l'équation tenant compte de la concentration en morphine pour calculer le Δt . Puis, si seules la M6G et la M3G sont retrouvées dans le sang, le Δt est calculé au moyen de l'équation basée sur la concentration de M6G. Enfin, si on ne retrouve que de la M3G dans l'échantillon, c'est évidemment l'équation impliquant la concentration en M3G qui est utilisée pour calculer le Δt .

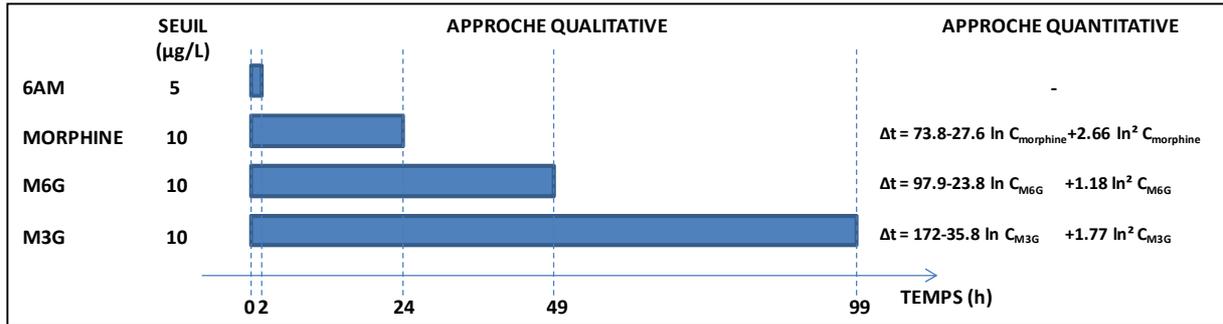


Figure 6 – Algorithme pour l'estimation du délai entre la consommation d'héroïne et le prélèvement

Cette méthode a été appliquée à un ensemble de sujets héroïnomanes : 11 patients du groupe expérimental TADAM ([Paragraphe III.1.2](#)), 7 patients ambulatoires traités par méthadone, et 1 patient ayant subi un RODA non repris dans le groupe de sujets utilisés pour établir les équations présentées dans le [Paragraphe III.2.1](#).

Les résultats obtenus pour l'estimation du délai entre la consommation d'héroïne et le prélèvement chez ces patients sont présentés dans l'Annexe 10 et dans la [Publication 5](#).

Pour les 11 patients du groupe expérimental TADAM, sur un total de 32 prélèvements effectués, la concentration en 6AM était supérieure au seuil de positivité de 5 µg/L dans 29 cas. Comme expliqué plus haut, c'est donc la première étape du modèle qui a été appliquée (délai inférieur à 2 heures). Les 3 autres prélèvements contenaient une concentration en morphine supérieure au seuil de positivité de 10 µg/L. Les calculs de délai ont donc été établis au moyen de l'équation basée sur la concentration en morphine. L'estimation du délai entre la consommation et le prélèvement de sang a fourni un écart moyen de 1,2 h par rapport au délai réel.

Pour les 7 patients traités par méthadone (un prélèvement par patient) et le patient ayant subi un sevrage rapide (8 prélèvements étalés dans le temps), un seul échantillon contenait une concentration en 6AM supérieure à 5 µg/L. L'application de notre modèle nous a permis de

conclure que le patient avait consommé de l'héroïne moins de deux heures avant le prélèvement.

Pour tous les autres prélèvements, c'est logiquement la seconde étape du modèle qui a été appliquée comme suit :

- 1- sur base de l'équation « morphine » pour 4 patients « méthadone » et pour les 6 premiers prélèvements du patient « RODA » ;
- 2- sur base de l'équation « M6G » pour 1 patient « méthadone » et pour le 7^{ème} prélèvement du patient « RODA » ;
- 3- sur base de l'équation « M3G » pour 1 patient « méthadone » et pour le dernier prélèvement du patient « RODA ».

L'estimation des délais entre le prélèvement et la consommation est ainsi appréciée par rapport au délai annoncé par les patients. Si dans le groupe « méthadone », ces estimations sont très proches des délais annoncés pour 5 patients sur 7 (écart de -0.4 à +1.7 h), on peut se poser la question de la réalité du délai avoué par les deux patients pour lesquels les résultats semblent s'écarter du modèle. Pour le patient « RODA », le modèle fournit des données très cohérentes pour les 7 premiers prélèvements (écart de -3.6 à +1.5 h). Le délai calculé pour le dernier prélèvement est anormalement élevé et pourrait s'expliquer par la variabilité analytique du dosage de la M3G à une concentration très proche de la limite de quantification.

PUBLICATION 5

Estimation of the time interval between the administration of heroin and the sampling of
blood in chronic inhalers

N. Dubois, C. Hallet, L. Seidel, I. Demaret, D. Luppens, M. Ansseau, E. Rozet, A. Albert,
P. Hubert, C. Charlier

Journal of Analytical Toxicology, **2015**, 1-6.

Estimation of the Time Interval between the Administration of Heroin and the Sampling of Blood in Chronic InhalersNathalie Dubois^{1,2*}, Claude Hallet³, Laurence Seidel⁴, Isabelle Demaret⁵, David Luppens⁵, Marc Anseau⁵, Eric Rozet⁶, Adelin Albert⁴, Philippe Hubert^{2,6} and Corinne Charlier^{1,2}¹Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale, de l'Environnement et en Entreprise, Centre Hospitalier Universitaire, Liège, Belgium, ²Centre Interfacultaire de Recherche du Médicament, Université de Liège, Liège, Belgium, ³Service Anesthésie-Réanimation, Centre Hospitalier Universitaire, Liège, Belgium, ⁴Service des Informations Médico-Economiques (SIME)—Biostatistique, Centre Hospitalier Universitaire, Liège, Belgium, ⁵Service de Psychiatrie, Centre Hospitalier Universitaire, Liège, Belgium, and ⁶Service de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, Université de Liège, Liège, Belgium

* Author to whom correspondence should be addressed. Service de Toxicologie Clinique, Médico-légale, de l'Environnement et en Entreprise, CHU Sart Tilman B35, Tour II, +5, B-4000 Liège, Belgium. Email: nathalie.dubois@chu.ulg.ac.be

To develop a model for estimating the time delay between last heroin consumption and blood sampling in chronic drug users. Eleven patients, all heroin inhalers undergoing detoxification, were included in the study. Several plasma samples were collected during the detoxification procedure and analyzed for the heroin metabolites 6-acetylmorphine (6AM), morphine (MOR), morphine-6-glucuronide (M6G) and morphine-3-glucuronide (M3G), according to a UHPLC/MSMS method. The general linear mixed model was applied to time-related concentrations and a pragmatic four-step delay estimation approach was proposed based on the simultaneous presence of metabolites in plasma. Validation of the model was carried out using the jackknife technique on the 11 patients, and on a group of 7 test patients. Quadratic equations were derived for all metabolites except 6AM. The interval delay estimation was 2–4 days when only M3G present in plasma, 1–2 days when M6G and M3G were both present, 0–1 day when MOR, M6G and M3G were present and <2 h for all metabolites present. The 'jackknife' correlation between declared and actual estimated delays was 0.90. The overall precision of the delay estimates was 8–9 h. The delay between last heroin consumption and blood sampling in chronic drug users can be satisfactorily predicted from plasma heroin metabolites.

Introduction

According to the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), the proportion of adult opiate users in 2010 ranged between 0.3 and 0.5% of the global population, corresponding to ~13–21 million individuals (1). Opioid dependence clearly remains a major public health and social problem. Consumption of opioids is also known to be the largest contributor to illicit drug-related mortality. Two of the major causes of death among opioid users are overdose and suicide (2, 3). Further, the use of the intravenous route of administration increases the risk of sepsis, hepatitis and HIV infections, medical conditions which markedly impact the mortality rate among heroin addicts (4). In addition, drug seeking and drug dealing expose consumers to a higher risk of violence and homicide, while the sedative effects of drugs raise the risk of becoming a victim of violence (5, 6). The population of opioid consumers also presents an increased risk of death from cancer and cardiovascular disease (3).

Clinical and forensic toxicologists are confronted daily with proving heroin consumption, a delicate and challenging task. Indeed, heroin and its first metabolite, 6-acetylmorphine (6AM), have a very short half-life time. Moreover the presence

of morphine alone does not indicate which opiate was consumed, because heroin, codeine, morphine and other morphine derivatives share common metabolic pathways leading to morphine (MOR), morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G) (7). An alternative approach to demonstrate heroin consumption in individuals may consist in detecting opiate alkaloid impurities in biological samples collected from these subjects. As an example, acetylcodeine is an impurity of the illicit heroin manufacturing process that has been investigated in several studies. It is also possible to detect some constituents of the opium poppy—codeine, noscapine, papaverine or their metabolites.

Once consumption of heroin is established, another major concern for forensic toxicologists is to estimate the delay between the index episode of opiate consumption and the time of blood sampling. This delay could be helpful to assess the influence of drugs on the subject's behavior at the time when facts leading to sampling occurred. Delay estimation can be based on the pharmacokinetics of opiates, as illustrated in Figure 1, which displays the metabolism of heroin, codeine and noscapine.

The main objective of this study was to establish to what extent the concentrations of heroin metabolites and opiate alkaloid impurities can be used to estimate the delay between heroin consumption and blood sampling. Mathematical equations for the time course of MOR, M6G and M3G concentrations after inhalation were derived from time-related data collected in 11 patients undergoing rapid opiate detoxification under anesthesia (RODA). These were then used to estimate the time of drug consumption. The reliability of the equations in predicting the delay was assessed on the same RODA patients using a jackknife method and on a small test group of independent samples.

Material and methods**RODA protocol**

RODA is a technique using opioid antagonists (naloxone and naltrexone) to induce withdrawal while the patient is anesthetized. Anesthesia is intended to reduce the subjective experience of acute symptoms of withdrawal, namely irritability, anxiety, apprehension, muscular and abdominal pains, chills, nausea, diarrhea, generalized weakness and insomnia. Although frequently used, this procedure is subject to significant controversy, mostly regarding exposure of patients to potentially life-threatening risks (8–12). Patients who benefit from this protocol must

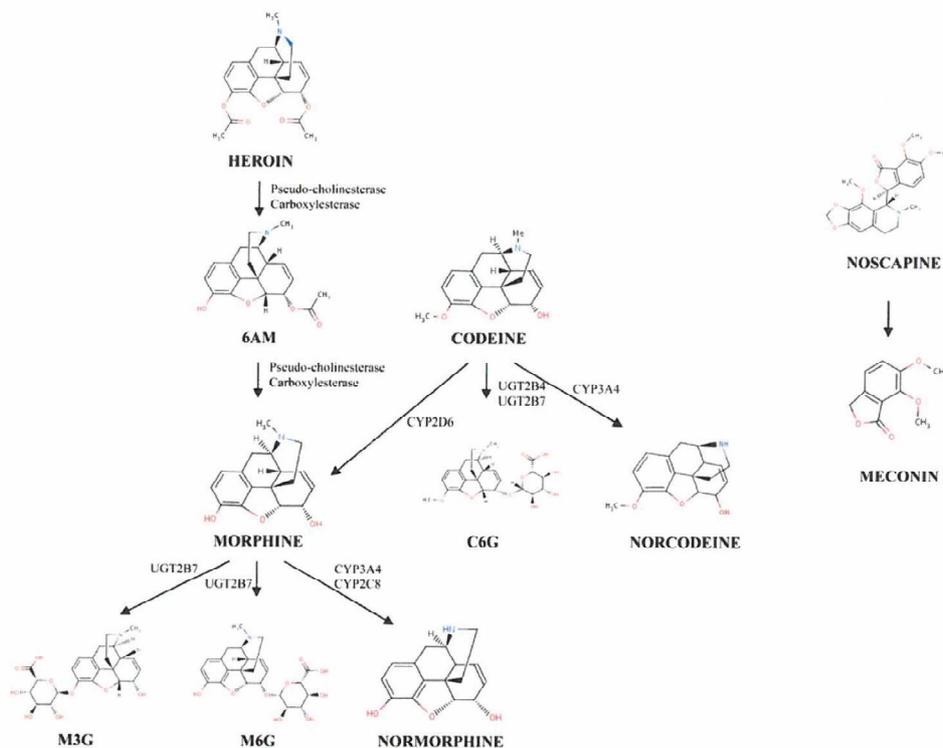


Figure 1. Heroin, codeine and noscapine metabolism. 6AM, 6-acetylmorphine; M3G, morphine-3-glucuronide; M6G, morphine-6-glucuronide; C6G, codeine-6-glucuronide; UGT, uridine diphosphate glucuronyltransferase; CYP, cytochrome P450.

meet several inclusion criteria. These include documented opiate dependency, age greater than 18 years and proof of sufficient motivation to undergo detoxification. Exclusion criteria include severe psychopathology associated with dependence, polydrug use, pregnancy and disease contraindicating anesthesia. Prior to the procedure, the patient's eligibility is evaluated by a psychiatrist and an anesthesiologist. Laboratory investigations include tests of hematological, renal and hepatic functions, HIV, hepatitis B and C seropositivity and a toxicological screening. On the day of the procedure, patients receive an adapted premedication including ranitidine, alizapride, clonidine, midazolam and scopolamine. General anesthesia is initiated with midazolam and propofol, maintained at a bispectral index of ± 20 with propofol. All patients are intubated by the orotracheal route. Two milligrams of naloxone are then infused over 30 min to precipitate withdrawal. Naloxone infusion is followed by gradual administration of 200 mg naltrexone via the orogastric tube. High doses of clonidine are used to blunt the hemodynamic consequences of withdrawal, while somatostatin is administered to treat digestive symptoms. After 7–8 h of general anesthesia, patients are extubated and receive standard post-anesthetic care in the

intensive care unit (ICU). Twelve hours after the end of the procedure, patients receive 50 mg naltrexone orally and are transferred to the psychiatry unit for 48–72 h to consolidate the detoxification process (13).

RODA patients

Eleven patients, seven men and four women, undergoing RODA were recruited in the Department of Psychiatry of the University Hospital (CHU) of Liège (Belgium) between June 2010 and February 2014. All patients had normal renal function and no signs of liver damage. All inhaled heroin regularly using the 'chasing the dragon' technique (14). They used between 0.3 and 2 g of heroin at their last consumption, corresponding to ~45–300 mg of pure heroin, based on the usual purity of this substance in the Greater Liège area (15). They were tested for barbiturates, benzodiazepines, antidepressants, antipsychotics, amphetamines, cannabis, cocaine, opiates and alcohol. Three individuals were controlled positive for cannabis, six were treated with methadone, four with a benzodiazepine and one with an antidepressant. Each patient was asked to indicate as precisely as possible the time of his/her last heroin consumption. The demographic

Table I
Characteristics of the RODA Patients Included in the Study (N = 11)

RODA patient	Gender	Age (years)	Dose of heroin (g)	Time since last drug consumption (h)		Number of blood samples
				First sample	Last sample	
1	F	35	0.5	1.1	8.6	7
2	M	31	0.3	41.3	48.0	7
3	M	44	0.3	3.6	27.0	7
4	M	35	0.5	3.4	51.5	10
5	F	40	0.5	44.2	98.5	8
6	M	25	2.0	2.3	75.3	10
7	F	35	0.3	5.5	77.9	9
8	M	36	2.0	7.8	56.5	8
9	M	46	1.5	4.4	53.0	9
10	F	56	2.0	8.5	56.3	8
11	M	40	1.0	6.8	28.0	7

characteristics, the dose of heroin, the delay between declared time since last drug consumption and first as well as last blood sample and the number of samples collected are given for each patient in Table I. Two 4 mL blood samples were drawn into propylene tubes containing 2.25 mg/mL sodium fluoride at patient admission (Day 0), at anesthesia induction and 0.5, 1, 2, 4 and 6 h afterward. Additional samples were drawn on the early morning of Day 1 in ICU and on the two following days (Days 2 and 3) in the psychiatry unit whenever possible.

Test patients

Seven heroin addicts (labeled A–G) treated with methadone in an outpatient clinic accepted to give a spot sample as well as the time interval since their last heroin consumption. All patients inhaled heroin and used between 0.3 and 1 g of heroin during their last consumption. They were tested negative for cocaine and amphetamines. One subject reported occasional use of cannabis and long-term alcohol abuse. One patient was treated with bromazepam and another with quetiapine. Characteristics of these patients are presented in Table II.

Study protocol

Participation to the study was on a voluntary basis and a written informed consent was obtained from all patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Liège (Belgian agreement no. B70720108831).

Analytical methods

Blood samples were centrifuged immediately and plasma fractions were stored at -20°C prior to analysis. The quantification of opiates in plasma was performed according to a previously described method (16). Briefly, 50 μL of deuterated internal standards were added to 500 μL of plasma which were next acidified with 0.15 N HCl. Oasis MCX (30 mg, 1 mL) cartridges purchased from Waters (Zellik, Belgium) were used for solid phase extraction (SPE). The conditioning was performed with methanol, water and 10 mM citric acid and the acidified sample was loaded onto the column. Then, the cartridges were washed with 2% formic acid and dried. The elution was done with ammonia in methanol (5/95, v/v). The eluate was evaporated to dryness and reconstituted with a mixture of 5 mM ammonium formate, pH 3 and formic acid 0.1% in methanol (90/10, v/v).

Table II
Characteristics of the Test Patients (N = 7) and Prediction of the Delay Between Last Drug Consumption and Blood Sample by the 4-Step Pragmatic Method

Variable	Test patient						
	A	B	C	D	E	F	G
Gender	M	M	M	F	M	M	M
Age (years)	42	42	31	36	53	27	39
Last heroin dose (g)	1.0	0.4	1.0	1.0	1.0	1.0	0.3
Declared delay since last consumption (h)	20.2	1.9	63.8	2.6	20.0	1.0	7.3
6AM ($\mu\text{g/L}$)	<5	<5	<5	<5	<5	14	<5
MOR ($\mu\text{g/L}$)	<10	86	<10	160	12	248	37
M6G ($\mu\text{g/L}$)	15	155	<10	366	<10	253	148
M3G ($\mu\text{g/L}$)	160	785	14	1,827	466	1,036	821
Interval estimate of delay (h) ^a	24–48	2–24	48–96	2–24	2–24	<2	2–24
Actual estimate of delay (h) ^a	41.8	3.6	90.0	2.2	21.6	<2	8.8
Difference between estimated and declared delay (h)	+21.6	+1.7	+26.2	-0.4	+1.6	NA	+1.5

NA, not applicable.

^aBy the four-step pragmatic approach.

Ten μL were injected into the ultra-high pressure liquid chromatograph (UPLC) Acquity coupled with a tandem mass spectrometer Quattro Premier (Waters, Zellik, Belgium). The chromatographic separation was performed on an Acquity High Strength Silica HSS-T3 column ($100 \times 2.1 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$; Waters). The mobile phase consisted of 5 mM ammonium formate in water (pH 3) and formic acid 0.1% in methanol delivered according to a gradient mode. The tandem mass spectrometer operated in the positive electrospray mode at 1.0 kV. Two multiple reaction monitoring (MRM) sequences were studied by analytes. Heroin metabolites (6AM, MOR, M6G, M3G and normorphine) and opium alkaloids and their metabolites [codeine, codeine-6-glucuronide (C6G), norcodeine, papaverine, noscapine and meconin] were quantified in each sample.

Statistical analysis

The general linear mixed model (GLMM) approach, with accounts for time-related data within patients, was applied to the group of 11 RODA patients to derive the mathematical equations relating time delay (Δt) between last drug consumption and blood sampling to circulating MOR, M6G and M3G concentrations, respectively. A log-transform was applied to the results of each assay, in order to normalize the distribution. GLMM analysis was not applied to alkaloids and their metabolites because of the high number of negative results (norcodeine, papaverine and noscapine), the poor correlation between Δt and analyte concentrations or the large inter-patient variability (meconin). The validation of the mathematical equations was assessed on the RODA patients by the jackknife technique, in which each patient is subsequently left out of the dataset, the GLMM equations recalculated and the time delay of the left-out patient estimated by the new equations. The jackknife approach provides a more realistic assessment of the performance of the model than the resubstitution approach which uses the equations derived from the 11 patients. The differences between the 'declared' time delays (Δt) and those 'predicted' by the equations (using either a resubstitution or jackknife approach) observed within and between patients were analyzed by one-way ANOVA to estimate within patients, between patients and total variability (i.e., precision of the predictions in terms of standard deviations). The correlation

coefficient was also calculated to measure the correlation between declared and predicted delays. Results were considered significant at the 5% critical level ($P < 0.05$). All calculations were performed with SAS (version 6.2 for Windows) and S-PLUS (version 8.1) statistical packages.

Pragmatic approach

Given the GLMM equations, a pragmatic four-step approach was proposed based on the following heroin pharmacokinetic considerations: 6AM is the first heroin metabolite to disappear from samples, followed by MOR, M6G and finally M3G. In the first step, the coexistence in the sample of the four metabolites at a concentration higher than a fixed threshold is taken into consideration. The thresholds are based on the limit of quantification (LOQ) of each substance and correspond, respectively, to 5 LOQ for 6AM (1 µg/L), 2.5 LOQ for MOR (4 µg/L) and 1 LOQ for M6G and M3G (10 µg/L). Delay estimation based on a 6AM threshold was derived from 6AM pharmacokinetics only. Thus, in the first step, when 6AM, MOR, M6G and M3G are simultaneously present in the sample, the delay Δt was considered to be < 2 h. This corresponds to five times the half-life of 6AM (17). In the second step, when MOR is detected together with M6G and M3G, the equation involving MOR concentration is used to determine Δt . When only M6G and M3G are present in the sample (third step), the delay Δt is estimated by the equation based on M6G concentration. Finally, in the fourth step, when only M3G is found higher

than the threshold, the delay Δt will be predicted by the equation based on M3G concentration. The performance of the four-step approach was assessed on the 11 RODA patients and on the 7 test patients.

Results

Prediction equations

Individual plasma concentrations of MOR, M6G and M3G according to declared time of last drug consumption are displayed in Figure 2. Three RODA patients were still positive for 6AM on hospital admission; all had concentrations higher than the LOQ for MOR, M6G and M3G. A total of 90 observations were available from the 11 patients for each analyte. GLMM analysis applied to these data yielded the following equations:

$$\begin{aligned} \text{Morphine: Delay (h)} &= 73.8 - 27.6 (\ln \text{MOR}) + 2.66 (\ln \text{MOR})^2 \\ \text{M6G: Delay (h)} &= 97.9 - 23.8 (\ln \text{M6G}) + 1.18 (\ln \text{M6G})^2 \\ \text{M3G: Delay (h)} &= 172.2 - 35.8 (\ln \text{M3G}) + 1.77 (\ln \text{M3G})^2 \end{aligned}$$

Quadratic equations for MOR, M6G and M3G provided a significantly better fit to the data than linear equations (see Fig. 2). Correlations between declared delays and delays predicted from these equations within and between patients were equal to 0.91 for MOR, 0.88 for M6G and 0.94 for M3G. The same

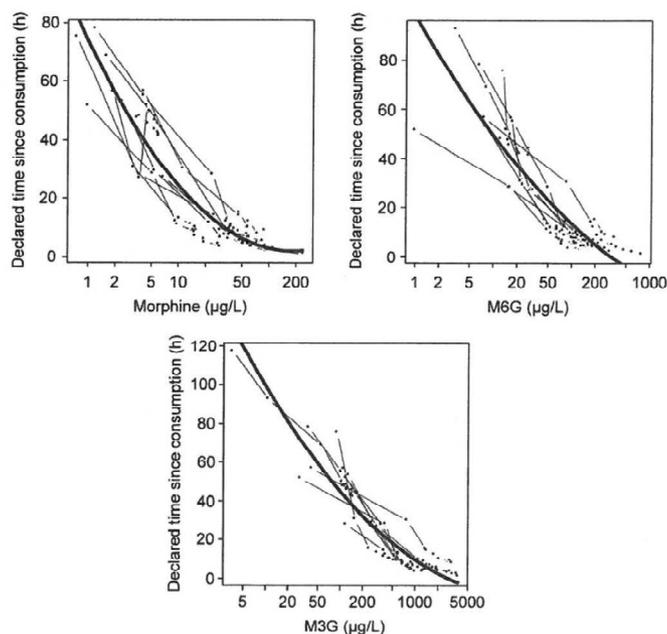


Figure 2. Relationship between declared time since last drug consumption and plasma concentrations of heroin metabolites (MOR, M6G and M3G) in 11 RODA patients. The solid curve represents the quadratic function obtained by GLMM analysis.

correlations based on the jackknife method were only slightly lower, respectively, 0.89, 0.77 and 0.92, indicating a close association between observed delays and those predicted from plasma analyte concentrations. This demonstrates the good reliability of the GLMM equations.

Pragmatic approach

As described before, the pragmatic four-step approach would consider the delay between last consumption and sampling to be <2 h when 6AM, MOR, M6G and M3G concentrations are all higher than their fixed thresholds (step 1). When MOR, M6G and M3G concentrations are simultaneously present in plasma, plugging a MOR value of 10 µg/L into the first equation yields a delay <24 h (step 2). When M6G and M3G concentrations are simultaneously higher than their fixed thresholds, plugging an M6G value of 10 µg/L into the second equation yields a delay <49 h (step 3). When only M3G is present, plugging an M3G value of 10 µg/L into the third equation yields a delay <99 h (step 4). Hence as a first crude (interval) estimation, the delay between last drug consumption will be in the range of 49–99 h (2–4 days) when only M3G is present in plasma, 24–49 h (1–2 days) when both M6G and M3G are present, 2–24 h (0–1 day) when MOR, M6G and M3G are present and <2 h when 6AM, MOR, M6G and M3G are all present. More accurate delay estimation can be obtained by using the appropriate equation in the corresponding intervals. This approach was applied to the 11 RODA patients, yielding a correlation coefficient of 0.93 using the usual approach and 0.90 for the jackknife method (see Figure 3). When analyzing the differences between declared and predicted (using the pragmatic approach) delays by one-way ANOVA (variance components), the prediction errors in terms of SDs obtained by the 'resubstitution-jackknife' methods were 6–7 h within patients, 5–6 h between patients and 8–9 h

globally. The pragmatic method was finally applied to the seven test patients (see Table II). Subject F was in step 1 (<2 h), subjects B, D and G were in step 2 (0–1 day), subject A in step 3 (1–2 days) and subject C in step 4 (2–4 days). The sample of subject E contained MOR and M3G but no M6G, in contradiction with heroin pharmacokinetics; nonetheless the delay calculated with the 'morphine' equation was equal to 21.6 h, close to the declared value of 20 h.

Discussion

In their daily practice, clinical and forensic toxicologists need to appraise as precisely as possible the delay between opiate consumption and time of blood sampling, in order to assess the influence of drugs on the clinical or forensic picture. In this study, we elaborated a set of mathematical equations predicting this delay from blood heroin metabolite concentrations in chronic heroin users. Using the positivity of 6AM, MOR, M6G and M3G, a simple method was constructed to obtain an estimate of the delay since last consumption.

In traditional pharmacokinetic models, it is generally accepted that a product is no longer present in the circulation after 5 half-lives. With respect to heroin, this study showed that its metabolites actually persist much longer in the blood. This specific feature can be used to predict the delay between last heroin consumption and blood sampling. The half-lives observed here were similar to those calculated in other pharmacokinetic studies indicating that the medications administered to RODA patients would appear not to influence the half-lives of heroin metabolites.

The difference between estimated and observed delays, which can be large, in particular for long delays, may be explained by the fact that the model building and evaluation were based on declared delays by the heroin addicts themselves. This patient group is known to have difficulties in estimating the time of their last consumption. The overall precision of the predictions obtained by variance components analysis was estimated to be 8–9 h (i.e., less than one half-day); this can be considered to be quite satisfactory. The opium alkaloids (codeine, noscapine, papaverine and their metabolites) were not used for model building because of the large variability of their concentration in volunteers; this observation is logical because the levels of alkaloids present in the heroin powder depend on the way it was prepared (18). The heroin quantity inhaled by the patients was not taken into account in the model, because these data will almost always be missing in real cases. Moreover, Rook *et al.* (19) showed that the quantity of inhaled heroin did not seem to influence the half-lives of 6AM, MOR, M6G or M3G.

The model developed in this study only works for chronic heroin users. This is because it was developed based on data from patients who had consumed heroin several times a week before the detoxification protocol. Thus, the equations involving MOR, M6G and M3G concentrations did take into account residual metabolite concentration from previous consumption. Estimation of the delay between heroin consumption and blood collection has to be made cautiously for patients who consume cocaine and/or ethanol. Both heroin and cocaine are metabolized by carboxylesterase meaning that heroin metabolism could be inhibited in case of concomitant use of cocaine. As concerns alcohol, study of heroin overdose victims appears to indicate that hydrolysis of 6AM into MOR is delayed by alcohol use (20).

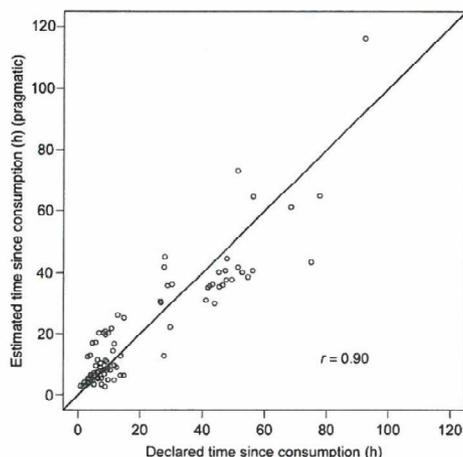


Figure 3. Correlation between declared times since last consumption and 'jackknife' predicted times based on the pragmatic approach depending on the simultaneous presence of heroin metabolites in plasma.

To further validate the model developed here, we applied it to data published by Rook *et al.* (21). We derived MOR, M6G and M3G plasma levels from the time-related concentration curves displayed in their article. For MOR, a concentration of 142 µg/L was obtained until 5 h after heroin inhalation; our model estimated a delay of 2.3 h for this value. For M6G, a concentration of 231 µg/L was obtained until 10 h after heroin administration; the delay estimated by our model for this concentration was equal to 3.3 h. For M3G, a concentration of 923 µg/L was obtained 8–17 h after consumption and the estimated delay by our model was 10.3 h. It can be concluded that delays predicted by our model were close to those specified in the article. We were not able to apply the model to other pharmacokinetics studies, either because the subjects had to be tested negative for heroin metabolites before entering the study (22–24), or because the time when samples were collected was too short (25, 26).

We recognize that the mathematical equations obtained by GLMM were based on a limited number of subjects ($N=11$). Nonetheless, for each subject 7–10 results were available, yielding a total of 90 observations for the statistical analysis. The jack-knife method in which GLMM analysis was repeated 11 times showed that equations remained quite stable when leaving-out each patient successively. We also ran the program by combining both RODA and test patients (total $N=18$ subjects) and found that the equations only changed insignificantly.

Conclusion

A common problem in clinical or forensic toxicology is determining the delay between two factual events. For example, this may be the delay between drug consumption and blood sampling. In many situations, this delay can be estimated by the knowledge of pharmacokinetic parameters. However, when it comes to opiates, the blood can contain many products and metabolites. It is possible to improve the delay estimation by interpolating the cross correlation function between product concentrations in blood. Here, we propose a novel algorithm which works satisfactorily and was validated using an independent sample of heroin consumers.

References

- UNODC (2012) World Drug Report, United Nations publication. Sales no. E.12.XL.1.
- Darke, S., Duflou, J., Torok, M. (2010) Comparative toxicology of intentional and accidental heroin overdose. *Journal of Forensic Sciences*, **55**, 1015–1018.
- Bjornaas, M.A., Bekken, A.S., Ojlert, A., Haldorsen, T., Jacobsen, D., Rostrup, M. *et al.* (2008) A 20-year prospective study of mortality and causes of death among hospitalized opioid addicts in Oslo. *BMC Psychiatry*, **8**, 1–8.
- Jones, A.W., Holmgren, A., Ahlner, J. (2012) Concentrations of free-morphine in peripheral blood after recent use of heroin in overdose deaths and in apprehended drivers. *Forensic Science International*, **215**, 18–24.
- Darke, S. (2010) The toxicology of homicide offenders and victims: a review. *Drug and Alcohol Review*, **29**, 202–215.
- Clark, H.W., Masson, C.L., Delucchi, K.L., Hall, S.M., Sees, K.L. (2001) Violent traumatic events and drug abuse severity. *Journal of Substance Abuse Treatment*, **20**, 121–127.
- Stefanidou, M., Athanasis, S., Spiliopoulou, C., Dona, A., Maravelias, C. (2010) Biomarkers of opiate use. *International Journal of Clinical Practice*, **64**, 1712–1718.
- Gowing, L., Ali, R., White, J.M. (2006) *Opioid Antagonists Under Heavy Sedation or Anesthesia for Opioid Withdrawal (Cochrane Review)*, Issue 2. The Cochrane Library: Oxford, UK.
- Fishbain, D.A., Rosomoff, H.L., Cutler, R. (1993) Opiate detoxification protocols. A clinical manual. *Annals of Clinical Psychiatry*, **5**, 53–65.
- van den Brinck, W., Haasen, C. (2006) Evidence-based treatment of opioid-dependent patients. *Canadian Journal of Psychiatry*, **51**, 635–646.
- De Jong, C.A., Laheij, R.J., Krabbe, P.F. (2005) General anaesthesia does not improve outcome in opioid antagonist detoxification treatment: a randomized controlled trial. *Addiction*, **100**, 206–215.
- Collins, E.D., Kleber, H.D., Whittington, R.A., Heitler, N.E. (2005) Anesthesia-assisted vs buprenorphine- or clonidine-assisted heroin detoxification and naltrexone induction. *Journal of the American Medical Association*, **294**, 903–913.
- Pinto, E., Reggers, J., Delhez, M., Fuchs, S., Venneman, I., Lamy, M. *et al.* (2001) Le sevrage ultra-rapide des toxicomanes aux opiacés sous anesthésie générale: résultats préliminaires du protocole liégeois. *Revue Médicale de Liège*, **56**, 572–576.
- Strang, J., Griffiths, P., Gossop, M. (1997) Heroin smoking by 'chasing the dragon': origins and history. *Addiction*, **92**, 673–683.
- Denooz, R., Dubois, N., Charlier, C. (2005) Deux ans d'analyse de saisies d'héroïne en région liégeoise. *Rev Med Liège*, **60**, 724–728.
- Dubois, N., Counerotte, S., Goffin, E., Pirotte, B., Charlier, C. (2014) Validation analytique d'une méthode chromatographique destinée à rechercher et à identifier les opiacés naturels ou (semi) synthétiques. *Annales de Biologie Clinique*, **72**, 197–206.
- Dubois, N., Demaret, I., Ansscau, M., Rozet, E., Hubert, P., Charlier, C. (2013) Plasma level monitoring of the major metabolites of diacetylmorphine (heroin) by the 'chasing the dragon' route in severe heroin addicts. *Acta Clinica Belgica*, **68**, 359–367.
- Guénat, O., Esseiva, P. (2005) *Le Proflage de l'héroïne et de la Cocaine*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes: Lausanne.
- Rook, E., van Ree, J., van den Brinck, W., Hillebrand, M., Huitema, A., Hendricks, V. *et al.* (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high doses of pharmaceutically prepared heroin, by intravenous or by inhalation route in opioid-dependent patients. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, **98**, 86–96.
- Rook, E., Huitema, A., van den Brinck, W., van Ree, J., Beijnen, J. (2006) Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Current Clinical Pharmacology*, **1**, 109–118.
- Rook, E., Huitema, A., van den Brinck, W., van Ree, J., Beijnen, J. (2006) Population pharmacokinetics of heroin and its major metabolites. *Clinical Pharmacokinetics*, **45**, 401–417.
- Skopp, G., Ganssmann, B., Cone, E., Aderjan, R. (1997) Plasma concentrations of heroin and morphine-related metabolites after intranasal and intramuscular administration. *Journal of Analytical Toxicology*, **21**, 105–111.
- Jenkins, A., Keenan, R., Henningfield, J., Cone, E. (1994) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin. *Journal of Analytical Toxicology*, **18**, 317–330.
- Girardin, F., Rentsch, K., Schwab, M.A., Maggiorini, M., Pauli-Magnus, C., Kullak-Ublick, G. *et al.* (2003) Pharmacokinetics of high doses of intramuscular and oral heroin in narcotic addicts. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **74**, 341–352.
- Comer, S., Collins, D., MacArthur, R., Fischman, M. (1999) Comparison of intravenous and intranasal heroin self-administration by morphine-maintained humans. *Psychopharmacology*, **143**, 327–338.
- Rentsch, K., Kullak-Ublick, G., Reichel, C., Meier, P., Fattinger, K. (2001) Arterial and venous pharmacokinetics of intravenous heroin in subjects who are addicted to narcotics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **70**, 237–246.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



La relation entre toxicomanie et délinquance est l'objet de nombreuses études et controverses.

Deux types de positions se confrontent :

- pour certains, l'usage de drogues doit rester interdit car il est intrinsèquement criminogène ;
- pour d'autres, la délinquance est expliquée par la nécessité qu'a le toxicomane de se procurer, à coût élevé, une substance illicite.

La vérité, comme souvent, est sans doute située entre ces deux options, mais il reste vrai que les héroïnomanes sont très souvent impliqués dans des dossiers criminels que ce soit en tant que victimes ou en tant qu'auteurs. Quand un dossier impliquant des héroïnomanes est à l'instruction, les magistrats ont des questions précises pour les toxicologues. Y a-t-il eu consommation d'héroïne par le sujet et à quel moment par rapport aux faits ? Le sujet avait-il consommé d'autres substances qui auraient pu influencer son comportement ? Les quantités de toxiques retrouvées dans les échantillons biologiques peuvent-elles expliquer l'éventuel décès du sujet ?

La réponse à ces différentes questions passe par plusieurs phases. Dans la **première phase**, nous avons établi la composition de l'héroïne de rue sur le marché local, afin de déterminer les biomarqueurs à rechercher dans les échantillons biologiques pour identifier les consommateurs d'héroïne.

Par l'analyse des poudres confiées au laboratoire de Toxicologie du CHU de Liège, nous avons pu préciser que le taux moyen en héroïne est de 17%. Pour la papavérine et la noscapine, les taux moyens sont respectivement de 0.9 et 9%. Les produits de coupe retrouvés sont dans 98% des cas du paracétamol (taux moyen : 27%) et de la caféine (taux moyen : 18%). Ces résultats sont en accord avec l'étude SINTES (Système d'Information National sur

les Toxiques et les Substances) de l'OFDT (Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies) réalisée entre mars 2007 et juin 2008 (97).

Dans une **deuxième phase**, nous avons développé les techniques analytiques nécessaires à l'identification et au dosage des biomarqueurs de la consommation d'héroïne. En même temps, ces méthodes doivent être capables d'objectiver la présence de drogues illicites autres que l'héroïne.

La première méthode décrite (Publication 1) utilise la chromatographie liquide ultra-haute pression couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC/MSMS) et permet de séparer 25 opiacés et leurs 14 analogues deutérés en 19 minutes. La préparation de l'échantillon biologique est simple et relativement rapide puisqu'elle consiste en une seule extraction en phase solide. La colonne chromatographique utilisée dans cette technique (Acquity[®] HSS-T3, Waters) permet la séparation de la morphine libre et de ses dérivés glucuroconjugués – morphine-6-glucuronide (M6G) et morphine-3-glucuronide (M3G); ceci est particulièrement intéressant puisque seules la morphine et la M6G sont pharmacologiquement actives.

Cette méthode a été validée selon les critères de la FDA pour 21 des 25 opiacés recherchés. Cette technique UHPLC/MSMS est donc bien adaptée au repérage des héroïnomanes mais il faut toutefois savoir que la 6-acétylmorphine est le seul biomarqueur spécifique de la consommation d'héroïne. Malheureusement, elle n'est retrouvée dans le sang d'un héroïnomanne que quelques heures après la consommation. Les autres biomarqueurs (codéine, morphine, dérivés glucuronconjugués) sont présents beaucoup plus longtemps après la prise mais sont communs à la consommation d'héroïne, de codéine et de morphine. Toutefois, lorsque l'on trouve dans le sang de la morphine et de la codéine simultanément, un rapport de concentrations morphine/codéine supérieur à 1 est en faveur d'une consommation d'héroïne, tandis que le même rapport inférieur à 1 est en faveur d'une consommation de codéine.

La deuxième et la troisième méthodes d'analyse décrites (Publications 2 et 3) permettent d'identifier et de doser les autres substances illicites susceptibles d'être consommées simultanément à l'héroïne et pouvant en affecter la pharmacocinétique.

La deuxième méthode est identique à la méthode décrite dans la Publication 1 en termes de préparation d'échantillons et de méthode UHPLC. Seule la programmation du spectromètre de masse change afin d'ajouter à l'identification et au dosage des opiacés ceux des amphétamines et de la cocaïne.

La troisième technique, également basée sur de l'UHPLC couplée à de la spectrométrie de masse en tandem, permet d'affirmer la consommation de cannabis. L'échantillon de sang subit une extraction liquide/liquide et la séparation chromatographique du tétrahydrocannabinol (THC) et de ses 2 principaux métabolites est réalisée sur une colonne Acquity[®] BEH C18 classique. La phase mobile est constituée d'un tampon bicarbonate d'ammonium pH 10 et de méthanol.

La **troisième phase** du travail correspond à l'élaboration d'un modèle à partir duquel il sera possible d'estimer le délai entre le moment du prélèvement biologique et celui de la consommation d'héroïne. Nous avons tout d'abord procédé à une approche qualitative, mais nous avons rapidement tenté d'améliorer la précision du délai estimé en établissant un modèle mathématique. Ce modèle mathématique a été construit en considérant la cinétique de l'héroïne et de ses métabolites dans une population de sujets de l'étude TADAM et du protocole RODA (Publications 4 et 5).

Après consommation d'héroïne, la 6-acétylmorphine est présente dans le sang pendant 2 heures, alors que la morphine, la M6G et la M3G restent détectables respectivement pendant 1, 2 et 4 jours.

Grâce aux résultats biologiques obtenus chez les patients en sevrage rapide (RODA) pour lesquels des échantillons ont encore été prélevés jusqu'à trois jours après l'arrêt de la

consommation, nous avons établi trois équations permettant d'estimer le délai entre le moment du prélèvement et celui de la consommation.

La première équation s'applique lorsque la morphine, la M6G et la M3G sont présentes simultanément.

La deuxième équation doit être utilisée lorsque ne persistent dans l'échantillon biologique que de la M6G et de la M3G.

Enfin, lorsque seule la M3G est retrouvée à l'analyse, c'est la troisième équation qui est d'application.

La prédiction du délai est satisfaisante puisque l'erreur calculée pour l'estimation du délai entre la dernière consommation d'héroïne et le prélèvement de sang est le plus souvent inférieure à 3 heures chez le groupe de sujets utilisés pour tester le modèle.

On peut formuler quelques réserves à l'utilisation de ces équations puisqu'elles peuvent être théoriquement influencées par la consommation simultanée d'alcool et/ou de cocaïne qui modifie la pharmacocinétique de l'héroïne.

Notre modèle mathématique ayant été construit sur base de prélèvements réalisés chez des consommateurs chroniques, il serait intéressant de voir si les équations s'appliquent à des prélèvements de consommateurs occasionnels, par exemple en administrant de l'héroïne à des sujets non consommateurs et en procédant ensuite à des prises de sang à intervalles réguliers. Malgré l'intérêt scientifique évident de cette approche, on voit mal un Comité d'Ethique donner son accord... Une alternative pourrait être l'utilisation d'une espèce animale la plus proche possible de l'Homme, du moins en termes de métabolisation des opiacés.

L'intérêt de ce travail peut être illustré par des cas médico-légaux pour lesquels des échantillons biologiques ont été déposés au Laboratoire de Toxicologie du CHU de Liège à des fins d'expertise.

Le premier est le cas d'une jeune femme de 27 ans, héroïnomane notoire, retrouvée sans vie par son compagnon. Le médecin légiste requis sur les lieux du décès n'a pu mettre en évidence aucune lésion qui aurait pu expliquer l'issue fatale. Le magistrat chargé d'instruire le dossier a demandé une expertise toxicologique pour vérifier si le décès peut être attribué à la consommation de drogues licites ou illicites.

Les analyses chromatographiques réalisées sur l'échantillon de sang démontrent que le sujet était, au moment de son décès, sous l'influence d'une benzodiazépine, le diazépam, d'un antidépresseur, la trazodone, et d'un analgésique morphinique, le tramadol, tous trois retrouvés à des taux thérapeutiques. La présence de 6AM retrouvée à l'état de traces (<5 µg/L), de morphine (91 µg/L), de M6G (37 µg/L) et de M3G (304 µg/L), de codéine libre (12 µg/L) et de méconine (9 µg/L) établit la consommation d'héroïne. L'application de l'équation basée sur la concentration de morphine permet d'estimer le moment de la dernière consommation d'héroïne à 3.4 h avant le décès, ce qui est cohérent avec les faits. Le compagnon de la victime a expliqué qu'il a quitté son amie environ 6 heures avant le moment où il l'a découverte sans vie à son retour.

Le deuxième cas est celui d'un homme de 46 ans retrouvé mort le lendemain d'une fête entre collègues au cours de laquelle il aurait consommé des quantités importantes d'alcool. Il n'était pas connu comme toxicomane. Le magistrat chargé d'instruire le dossier a demandé une expertise toxicologique afin de savoir si une consommation de stupéfiants (résultat positif au dépistage urinaire réalisé par le médecin légiste) et d'alcool peut expliquer le décès.

Les analyses chromatographiques réalisées sur les échantillons biologiques confirment que le sujet était, au moment de son décès, sous l'influence d'alcool (1.5 g/L) et d'opiacés. La prise d'héroïne a pu être démontrée grâce à la présence de morphine et de codéine sous formes libre et glucuroconjuguée dans le sang (rapport entre les concentrations de morphine et de codéine supérieur à 1) et grâce à la présence de 6AM dans les urines. L'application de l'équation

basée sur la concentration de morphine (199 µg/L) (bien qu'il s'agisse d'un consommateur occasionnel et que nous sommes donc plus réservés quant à l'application du modèle mathématique) permet d'estimer le moment de la consommation d'héroïne à 2.2 h avant le décès. La morphine est un puissant agent déprimeur du système respiratoire, d'autant plus en cas de consommation concomitante d'alcool et cette association a pu être rapidement fatale chez un individu habituellement non consommateur.

Le cas suivant est celui d'un homme de 27 ans appréhendé vers 22h30 par la police après une soirée arrosée. Il est découvert mort dans sa cellule le lendemain matin. L'autopsie révèle que le sujet est décédé très vite après le début de son incarcération (heure du décès estimée vers minuit trente par le médecin légiste). L'analyse toxicologique d'un échantillon de sang permet de mettre en évidence de la 6AM à la concentration de 10.5 µg/L, de la morphine libre à la concentration de 94 µg/L ainsi que ses deux métabolites conjugués, la M6G et la M3G, respectivement présents aux concentrations de 19 et de 101 µg/L. Le sujet était également sous l'influence d'une alcoolémie importante (2.4 g/L) et de deux benzodiazépines (diazépam et clonazépam) retrouvées à des taux thérapeutiques. La présence de 6AM, seul biomarqueur spécifique d'une consommation d'héroïne, retrouvée à une concentration supérieure à 5 µg/L permet d'estimer le moment de la dernière consommation d'héroïne à moins de 2 heures avant le décès, en accord avec les constatations du médecin légiste.

Le dernier cas présenté est celui d'un polytoxicomane de 35 ans blessé par balle lors d'une rixe un jeudi soir vers 22 heures. L'objectif de l'expertise toxicologique était, cette fois, d'évaluer l'état d'imprégnation du sujet au moment des faits. L'analyse chromatographique d'un échantillon de sang prélevé à cette fin le vendredi vers 14 heures montre que l'individu était sous l'influence de cocaïne (benzoylecgonine, principal métabolite de la cocaïne, présent à la concentration de 917 µg/L). De la morphine-6-glucuronide et de la morphine-3-glucuronide ont également été retrouvées dans le prélèvement respectivement à des

concentrations de 76 µg/L et de 499 µg/L. L'identification de l'opiacé consommé par le sujet, l'héroïne, a pu être réalisée grâce à l'analyse d'un prélèvement urinaire dans lequel de la 6AM a pu être mise en évidence. L'application du modèle mathématique élaboré dans ce travail à la concentration sanguine de M6G permet d'estimer le moment de la dernière consommation d'héroïne à 17 heures avant le prélèvement. Plus tard, au cours de l'enquête, l'individu avouera avoir consommé de l'héroïne le jeudi en début de soirée.

En conclusion, même si l'imprécision dans l'estimation du délai entre consommation et prélèvement biologique demeure importante, le modèle mathématique proposé dans ce travail permet malgré tout d'apporter une réponse intéressante et utile à cette difficile question du moment de la consommation.

Les équations utilisées pour estimer le délai écoulé entre la consommation d'héroïne et le prélèvement biologique ont été établies en fonction de la dernière consommation déclarée par les sujets de l'étude. Etant donné la possible imprécision de cette déclaration, il serait utile de renouveler l'expérimentation dans des conditions où le moment de la dernière administration d'héroïne serait connu parfaitement.

Ce travail pourrait également être utilement complété par l'étude des fenêtres de détection des métabolites de l'héroïne dans l'urine, qui pourrait apporter un élément de confirmation aux résultats fournis par l'analyse sanguine.

L'héroïne est probablement l'archétype même des produits associés à la toxicomanie. Même si le pourcentage de consommateurs est peu élevé par rapport aux chiffres que l'on peut évoquer pour d'autres psychotropes, le nombre d'héroïnomanes dont les faits et gestes se retrouvent dans des dossiers judiciaires est important et justifie qu'un magistrat s'interroge sur des questions de délai entre la consommation et les faits, et donc, d'influence du produit sur le comportement au moment des faits. Notre travail a tenté d'apporter quelques éléments de réponse pouvant aider à l'interprétation des résultats analytiques que le laboratoire de

Toxicologie peut proposer lorsqu'il dispose de prélèvements biologiques. Il est incomplet, imparfait et doit être lu comme une des pièces du puzzle qui, une fois, assemblées, permettent d'apporter un éclairage au moins partiel dans un dossier judiciaire !

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



1. <http://www.emcdda.europa.eu/topics/opioids>, consulté le 04/01/2015.
2. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute on Drug Abuse, Research Report Series. Heroin, NIH Publication Number 15-0165, 2014.
3. L. Gowing, R. Ali, J.M. White, Opioid antagonists with minimal sedation for opioid withdrawal, *The Cochrane Library*, 2009, Issue 4.
4. United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 2013, Vienne, United Nations, 2013.
5. Observatoire européen des drogues et des toxicomanies, Rapport européen sur les drogues. Tendances et évolutions, 2013, Luxembourg, Office des publications de l'Union Européenne, 2013.
6. I. Demaret, P. Herné, A. Lemaître, M. Ansseau, Feasibility assessment of heroin-assisted treatment in Liège, Belgium, *Acta Psychiatr Belg*, 111:1 (2011) 3-8.
7. S. Darke, J. Duflou, M. Torok, Comparative toxicology of intentional and accidental heroin overdose, *J Forensic Sci*, 55(4) (2010) 1015-1018.
8. D.E. Arnold-Reed, P. O'Neil, C.D.J. Holman, M.K. Bulsara, C. Rodriguez, G. Gawthorne, R.J. Tait, G.K. Hulse, A comparison of mental health hospital admissions in a cohort of heroin users prior to and after rapid opiate detoxification and oral naltrexone maintenance, *Am J Drug Alcohol Abuse*, 33 (2007) 655-664.
9. G. Robaey, C. Matheï, M. Van Ranst, F. Buntinx, Substance use in Belgium: prevalence and management, *Acta Gastroenterol Belg*, LXVIII (2005) 46-49.
10. W. Hall, C. Doran, L. Degenhardt, D. Shepard, Illicit opiate abuse (chapter 48) in *Disease control priorities in developing countries 2nd edition*, 907-931, Washington, 2006.
11. National Collaborating Centre for Mental Health, Drug misuse: opioid detoxification, ed. *The British Psychological Society*, Leicester (UK), 2008.

12. M. Bjornaas, A. Bekken, A. Ojlert, T. Haldorsen, D. Jacobsen, M. Rostrup, O. Ekeberg, A 20-year prospective study of mortality and causes of death among hospitalized opioid addicts in Oslo, *BMC Psychiatry*, 8:8 (2008) 1-8.
13. H.W. Clark, C. Masson, K. Delucchi, S. Hall, K. Sees, Violent traumatic events and drug abuse severity, *J Subst Abuse Treat*, 20 (2001) 121-127.
14. S. Darke, The toxicology of homicide offenders and victims : a review, *Drug Alcohol Rev*, 29 (2010) 202-215.
15. S. Darke, J. Duflou, S. Kaye, Comparative toxicology of fatal heroin overdose cases and morphine positive homicide victims, *Addiction*, 102 (2007) 1793-1797.
16. M. Augsburger, C. Staub, Forensic Toxicology, a growing scientific discipline, *Rev Med Suisse*, 4:164 (2008) 1605-1608.
17. C. Duverneuil, I. Etting, B. Mathieu, F. Paraire, G. Lorin de la Grandmaison, C. Raimbault, M. Durigon, P. de Mazangourt, J.C. Alvarez, Intérêt des analyses toxicologiques lors d'une recherche des causes de décès (résultats de 358 analyses), *Ann Toxicol Anal*, 17:3 (2005) 187-193.
18. A.L. Lacroix, R. Bouvet, S. Lepage, A. Baert, M. Abondo, A. Feuillu, J.P. Anger, M.A. Le Gueut, I. Morel, Intérêt des analyses toxicologiques pour déterminer les causes de la mort : bilan de quatre années d'expertise judiciaire, *Ann Toxicol Anal*, 22:3 (2010) 141-147.
19. M.S. Hadidi, M.I. Ibrahim, I.M. Abdallat, K.A. Hadidi, Current trends in drug abuse associated fatalities, Jordan 2000-2004, *Forensic Sci Int*, 186:1-3 (2009) 44-47
20. M. Botineau, Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, éd. TEC & DOC, Paris, 2010, 314-329.
21. J. Bruneton, Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales 3^{ème} édition. éd. TEC & DOC, Paris, 1999, 925-948.

22. J. Bruneton, Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, éd. TEC & DOC, Paris, 1996, 369-373.
23. A. Masclef, Atlas des plantes de France, Librairie des sciences naturelles, éd. P. Klincksieck, Paris, 1891.
24. O. Guéniat, P. Esseiva, Le profilage de l'héroïne et de la cocaïne. Une méthodologie moderne de lutte contre le trafic illicite, éd. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 2005.
25. M. Windy, S. Skalli, N. Rhalem, R. Soulaymi, Intoxication par le pavot à opium, http://www.capm.ma/conduites/CAPM_IT_CAT_Pavot.pdf, consulté le 29/01/2015.
26. B. Debrus, J. Broséus, D. Guillarme, P. Lebrun, P. Hubert, J.-L. Veuthey, P. Esseiva, S. Rudaz, Innovative methodology to transfer conventional GC-MS heroin profiling to UHPLC-MS/MS, *Annal Bioanal Chem*, 399:8 (2000) 2719-2730.
27. R. Denooz, N. Dubois, C. Charlier, Deux ans d'analyse de saisies d'héroïne en région liégeoise, *Rev Med Liege*, 60:9 (2005) 724-728.
28. P. Esseiva, L. Dujourdy, F. Anglada, F. Taroni, P. Margot, A methodology for illicit heroin seizures comparison in a drug intelligence perspective using large databases, *Forensic Sci Int*, 132 (2003) 139-152.
29. I.S. Lurie, S.G. Toske, Applicability of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for heroin profiling, *J Chromatogr A*, 1188 (2008) 322-326
30. L.R. Odell, J. Skopec, A. McCluskey, A "cold synthesis" of heroin and implications in heroin signature analysis. Utility of trifluoroacetic/acetic anhydride in the acetylation of morphine, *Forensic Sci Int*, 164 (2006) 221-229.
31. J.M. van Ree, M.A. Gerrits, L.J. Vanderschuren, Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine, *Pharmacol Rev*, 51:2 (1999) 341-396.

32. A. Seidenberg, U. Honegger, Méthadone, heroine, et autres opioïdes. La prescription des opioïdes en milieu ambulatoire, éd. Médecine & Hygiène, Paris, 2001.
33. A.J. Goodman, B. Le Bourdonnec, R.E. Dolle, Mu opioid receptor antagonists: recent developments, *Chem Med Chem*, 2 (2007) 1552-1570.
34. S.H. Snyder, G.W. Pasternak, Historical review : opioid receptors, *Trends Pharmacol Sci*, 24:4 (2003) 198-205.
35. J.M. White, R.J. Irvine, Mechanisms of fatal opioid overdose, *Addiction*, 94:7 (1999) 961-972.
36. R. Brenneisen, F. Hasler, D. Würsch, Acetylcodeine as a urinary marker to differentiate the use of street heroin and pharmaceutical heroin, *J Anal Toxicol*, 26 (2002) 561-566.
37. N. McLachlan-Troup, G.W. Taylor, B.C. Trathen, Diamorphine treatment for opiate dependence: putative markers of concomitant heroin misuse, *Addiction Biology*, 6 (2001) 223-231.
38. S.R. Morley, A.R. Forrest, J.H. Galloway, Validation of meconin as a marker for illicit opiate use, *J Anal Toxicol*, 31 (2007) 105-108.
39. S. Paterson, N. Lintzeris, T.B. Mitchell, R. Cordero, L. Nestor, J. Strang, Validation of techniques to detect illicit heroin use in patients prescribed pharmaceutical heroin for the management of opioid dependence, *Addiction*, 100 (2005) 1832-1839.
40. S. Paterson, R. Cordero, Comparison of the various opiate alkaloid contaminants and their metabolites found in illicit heroin with 6-monoacetyl morphine as indicators of heroin ingestion, *J Anal Toxicol*, 30 (2006) 267-273.
41. E.J. Rook, M.J. Hillebrand, H. Rosing, J.M. van Ree, J.H. Beijnen, 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*, 824 (2005) 213-221.
42. E.J. Rook, A.D. Huitema, W. van den Brinck, M.J. Hillebrand, J.M. van Ree, J.H. Beijnen, Screening for illicit heroin use in patients in a heroin-assisted treatment program, *J Anal Toxicol*, 30 (2006) 390-394.
43. M. Stefanidou, S. Athanasis, C. Spiliopoulou, A. Dona, C. Maravelias, Biomarkers of opiate use, *Int J Clin Pract*, 64:12 (2010) 1712-1718.
44. J. Trafkowski, B. Madea, F. Musshoff, The significance of putative urinary markers of illicit heroin use after consumption of poppy seed products, *Ther Drug Monit*, 28:4 (2006) 552-556.
45. Y.J. He, J. Brockmöller, H. Schmidt, I. Roots, J. Kirchheiner, CYP2D6 ultrarapid metabolism and morphine/codeine ratios in blood: was it codeine or heroin? *J Anal Toxicol*, 32 (2008) 178-182.
46. A.W. Jones, A. Holmgren, Concentration ratios of free-morphine to free-codeine in femoral blood in heroin-related poisoning deaths, *Leg Med*, 13 (2011) 171-173.
47. S.V. Konstantinova, P.T. Normann, M. Arnestad, R. Karinen, A.S. Christophersen, J. Morland, Morphine to codeine concentration ratio in blood and urine as a marker of illicit heroin use in forensic autopsy samples, *Forensic Sci Int*, 217 (2012) 216-221.
48. R. Kronstrand, A.W. Jones, Concentration ratios of codeine-to-morphine in plasma after a single oral dose (100 mg) of codeine phosphate, *J Anal Toxicol*, 25 (2001) 486-487.
49. J.C. Arsenault, Beginner's Guide to SPE (Solid-Phase Extraction), Waters Corporation, Etats-Unis, 2012.
50. F. Rouessac, A. Rouessac, D. Cruché, C. Duverger-Arfulso, A. Martel, Analyse chimique. Méthodes et techniques, éd. Sciences sup. Dunod, 7^{ème} édition, 2009.

51. E.S. Grumbach, J.C. Arsenault, D.R. McCabe, *Beginners Guide to UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography)*, Waters Corporation, Etats-Unis, 2009
52. M.P. Balogh, *The Mass Spectrometry Primer*, Waters Corporation, Etats-Unis, 2009.
53. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Guidance for industry, bioanalytical method validation*, 2001.
54. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, I. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part I. *J. Pharm Biomed Anal*, 36 (2004) 579-586.
55. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, I. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part II. *J. Pharm Biomed Anal* 45 (2007) 70-81.
56. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, I. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part III. *J. Pharm Biomed Anal* 45 (2007) 82-96.
57. E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*, 1158 (2007) 111-125.
58. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal Chem*, 75 (2003) 3019-3030.

59. I. Demaret, P. Herné, A. Lemaître, M. Ansseau, Feasibility assessment of heroin-assisted treatment in Liège, Belgium, *Acta Psychiatr Belg*, 111:1 (2011) 3-8
60. J. Strang, P. Griffiths, M. Gossop, Heroin smoking by “chasing the dragon”: origins and history, *Addiction*, 92:6 (1997) 673-683.
61. B. P.-N. Mo, E.L. Way, An assessment of inhalation as a mode of administration of heroin by addicts, *J Pharmacol Exp Ther*, 154:1 (1966) 142-151
62. E.J. Rook, A.D. Huitema, W. van den Brinck, J.M. van Ree, J.H. Beijnen, Population pharmacokinetics of heroin and its major metabolites, *Clin Pharmacokinet* 45:4 (2006) 401-417.
63. E.J. Rook, A.D. Huitema, W. van den Brinck, J.M. van Ree, J.H. Beijnen, Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites : review of the literature, *Curr Clin Pharmacol*, 1 (2006) 109-118.
64. E.J. Rook, J.M. van Ree, W. van den Brinck, M.J. Hillebrand, A.D. Huitema, V.M. Hendriks, J.H. Beijnen, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high doses of pharmaceutically prepared heroin, by intravenous or by inhalation route in opioid-dependent patients, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 98 (2006) 86-96.
65. V.M. Hendriks, W. van den Brinck, P. Blanken, I.J. Bosman, J.M. van Ree, Heroin self-administration by means of “chasing the dragon”: pharmacodynamics and bioavailability of inhaled heroin, *Eur Neuropsychopharmacol*, 11 (2001) 241-252.
66. F. Girardin, K.M. Rentsch, M-A. Schwab, M. Maggiorini, C. Pauli-Magnus, G.A. Kullack-Ublick, P.J. Meier, K. Fattinger, Pharmacokinetics of high doses of intramuscular and oral heroin in narcotic addicts, *Clin Pharmacol Ther* (2003) 341-352.

67. M. Rentsch, G.A. Kullak-Ublick, C. Reichel, P.J. Meier, K. Fattinger, Arterial and venous pharmacokinetics of intravenous heroin in subjects who are addicted to narcotics, *Clin Pharmacol Ther*, 73:3 (2001) 237-246.
68. M.G. Klous, G.M. Bronner, B. Nuijen, J.M. van Ree, J.H. Beijnen, Pharmaceutical heroin for inhalation: thermal analysis and recovery experiments after volatilization, *J Pharm Biomed Anal*, 39 (2005) 944-950.
69. C.E. Inturrisi, M.B. Max, K.M. Foley, M. Schultz, S-U. Shin, R.W. Houde, The pharmacokinetics of heroin in patients with chronic pain, *N Engl J Med*, 310:19 (1984) 1213-1217.
70. A.J. Jenkins, R.M. Keenan, J.E. Henningfield, E.J. Cone, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin, *J Anal Toxicol* 18 (1994) 317-330.
71. M. Dorian, A.M. Betbeder, Pharmacocinétique de l'héroïne. Conséquences toxicologiques, *Bull Soc Pharm Bordeaux*, 128 (1989) 87-105.
72. O. Lockridge, N. Mottershaw-Jackson, H.W. Eckerson, B.N. La Du, Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase, *J Pharmacol Exp Ther*, 215:1 (1980) 1-8.
73. M.G. Klous, A.D. Huitema, E.J. Rook, M.J. Hillebrand, V.M. Hendriks, W. van den Brinck, J.H. Beijnen, J.M. van Ree, Pharmacokinetic comparison of two methods of heroin smoking: "chasing the dragon" versus the use of a heating device, *Eur Neuropsychopharmacol*, 15 (2005) 263-269.
74. H. Maurer, C. Sauer, D. Theobald, Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine and codeine, *Ther Drug Monit*, 28:3 (2006) 447-453.

75. M.R. Meyer, H.R. Maurer, Absorption, distribution, metabolism and excretion pharmacogenomics of drugs of abuse, *Pharmacogenomics*, 12:2 (2011) 215-233.
76. A. Poletini, V. Poloni, A. Groppi, C. Stramesi, C. Vignali, L. Politi, M. Montagna, The role of cocaine in heroin-related deaths. Hypothesis on the interaction between heroin and cocaine, *Forensic Sci Int*, 153 (2005) 23-28.
77. M.R. Redinbo, S. Bencharit, P.M. Potter, Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery, *Biochem Soc Trans*, 31 (2003) 620-624.
78. L.M. Kamendulis, M.R. Brzezinski, E.V. Pindel, W.F. Bosron, R.A. Dean, Metabolism of cocaine and heroin is catalized by the same liver carboxylesterases, *J Pharmacol Toxicol Methods*, 279:2 (1996) 713-717.
79. A. Poletini, A. Groppi, M. Montagna, The role of alcohol abuse in heroin-related deaths. Evidence of pharmacokinetic interactions between heroin and alcohol, *J Anal Toxicol*, 23:7 (1999) 570-576.
80. I. Demaret, E. Quertemont, G. Litran, C. Magoga, C. Deblire, N. Dubois, J. de Roubaix, C. Charlier, A. Lemaître, M. Ansseau, Efficacy of heroin-assisted treatment in Belgium : a randomised controlled trial, *European Addiction Research*, 2015, sous presse
81. P. Blanken, V.M. Hendriks, J.M. van Ree, W. van den Brinck, Outcome of long-term heroin-assisted treatment offered to chronic, treatment-resistant heroin addicts in the Netherlands, *Addiction*, 105 (2009) 300-308.
82. P. Blanken, W. van den Brinck, V. M. Hendricks, I.A. Huijsman, M.G. Klous, E.J. Rook, J.S. Wakelin, C. Barendrecht, J.H. Beijnen, J.M. van Ree, Heroin-assisted treatment in the Netherlands, history, findings, and international context, *Eur Neuropsychopharmacol*, 20:2 (2010) 5105-5158.

83. B. Fischer, E. Oviedo-Joekes, P. Blanken, C. Haasen, J. Rehm, M.T. Schechter, J. Strang, W. van den Brinck, Heroin-assisted treatment (HAT) a decade later: a brief update on science and politics, *Journal of Urban Health: Bull N Y Acad Med*, 84(4) (2007) 552-562.
84. C. Haasen, U. Verthein, P. Degwitz, J. Berger, M. Krausz, D. Naber, Heroin-assisted treatment for opioid dependence, *Br J Psychiatry*, 191 (2007) 55-62.
85. N. Lintzeris, Prescription of heroin for the management of heroin dependence, *CNS Drugs*, 23(6) (2009) 463-476.
86. J.C. March, E. Oviedo-Joekes, E. Perea-Milla, F. Carrasco, the PEPSA team, Controlled trial of prescribed heroin in the treatment of opioid addiction, *J Subst Abuse Treat*, 31 (2006) 203-211.
87. E. Oviedo-Joekes, B. Nosyk, D.C. Marsh, D. Guh, S. Brissette, C. Gartry, M. Krausz, A. Anis, M.T. Schechter, Scientific and political challenges in North America's first randomized controlled trial of heroin-assisted treatment for severe heroin addiction: rationale and design of the NAOMI study, *Clinical Trials*, 6 (2009) 261-271.
88. E. Oviedo-Joekes, J.C March, M. Romero, E. Perea-Milla, The Andalusian trial on heroin-assisted treatment: a 2 year follow-up, *Drug Alcohol Rev*, 29 (2010) 75-80.
89. T.V. Perneger, F. Giner, M. del Rio, A. Mino, Randomised trial of heroin maintenance programme for addicts who fail in conventional drug treatments, *BMJ*, 317 (1998) 13-28.
90. J. Rehm, P. Gschwend, T. Steffen, F. Gutzwiller, A. Dobler-Mikola, A. Uchtenhagen, Feasibility, safety, and efficacy of injectable heroin prescription for refractory opioid addicts: a follow-up study, *The Lancet*, 358 (2001) 1417-1420.

91. W. van den Brinck, V.M. Hendriks, P. Blanken, M.W. Koeter, B.J. van Zwieten, J.M. van Ree, Medical prescription of heroin to treatment resistant heroin addicts: two randomized controlled trials, *BMJ*, 327 (2003) 310-318.
92. E. Pinto, J. Reggers, M. Delhez, S. Fuchs, I. Venneman, M. Lamy, M. Anseau, Le sevrage ultra-rapide des toxicomanes aux opiacés sous anesthésie générale: résultats préliminaires du protocole liégeois, *Rev Med Liege*, 56:8 (2001) 572-576.
93. C.A. De Jong, R.J. Laheij, P.F. Krabbe, General anaesthesia does not improve outcome in opioid antagonist detoxification treatment: a randomized controlled trial, *Addiction*, 100 (2005) 206-215.
94. B. Favrat, G. Zimmerman, D. Zullino, S. Krenz, F. Dorogy, J. Muller, A. Zwahlen, B. Broers, J. Bresson, Opioid antagonist detoxification under anaesthesia versus traditional clonidine detoxification combined with an additional week of psychosocial support: a randomized clinical trial, *Drug Alcohol Depend*, 81 (2006) 109-116.
95. G. Gerra, A. Zaimovic, P. Rustichelli, B. Fontanesi, U. Zambelli, M. Timpano, C. Bocchi, R. Delsignore, Rapid opiate detoxification in outpatient treatment. Relationship with naltrexone compliance, *J Subst Abuse Treat*, 18 (2000) 185-191.
96. G. Gerra, S. Ceresini, A. Esposito, A. Zaimovic, G. Moi, M. Bussandri, M. Raggi, E. Molina, Neuroendocrine and behavioural responses to opioid receptor-antagonist during heroin detoxification: relationship with personality traits, *Int Clin Psychopharmacol*, 18:5 (2003) 261-269.
97. E. Lahaie, Enquête SINTES 2009 sur la composition des produits de synthèse, Saint-Denis, Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies, 2011.

ANNEXES



- Annexe 1 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Fonction de réponse
- Annexe 2 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Justesse
- Annexe 3 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Fidélité
- Annexe 4 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Incertitude de mesure
- Annexe 5 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Profils d'exactitude
- Annexe 6 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Linéarité
- Annexe 7 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Stabilité
- Annexe 8 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Effet matrice
- Annexe 9 Identification et dosage des opiacés dans le sang : validation analytique
Patients « RODA » : Concentrations en 6AM, morphine, M6G et M3G
obtenues dans les différents prélèvements
- Annexe 10 Application du modèle à différents sujets

Annexe 1

Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique

Fonction de réponse

Molécules	Type de régression	Equation	R ²
6-acétylcodéine	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.02446x-0.0042$	0.9982
6AM	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.01196x-0.0037$	0.9983
6-β-naltrexol	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.01637x+0.0147$	0.9983
Buprénorphine	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.1204x-0.0091$	0.9978
Codéine	Quadratique pondérée (1/x)	$y=0.00000069x^2+0.009245x+0.006188$	0.9975
C6G	Quadratique	$y=0.00000848x^2+0.007220x+0.009284$	0.9982
Dihydrocodéine	Quadratique pondérée (1/x)	$y=-0.00000261x^2+0.01173x+0.05600$	0.9970
EDDP	Quadratique	$y=0.00000130x^2+0.01659x-0.05211$	0.9955
Ethylmorphine	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.1743x+0.1215$	0.9928
Hydrocodone	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.008237x-0.02241$	0.9960
Hydromorphone	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.009646x-0.005756$	0.9984
Méconine	Quadratique pondérée (1/x)	$y=0.00000046x^2+0.001231x-0.002831$	0.9939
M3G	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.003822x+0.01179$	0.9977
M6G	Quadratique pondérée (1/x)	$y=-0.00000025x^2+0.003988x+0.02082$	0.9978
Méthadone	Quadratique pondérée (1/x)	$y=0.00000115x^2+0.008772x+0.01602$	0.9990
Morphine	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.005665x-0.0007834$	0.9914
Naloxone	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.003220x-0.003209$	0.9927
Naltrexone	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.01579x-0.005533$	0.9942
Norbuprénorphine	Quadratique	$y=0.00000954x^2+0.01966x+0.005576$	0.9946
Norcodéine	Quadratique pondérée (1/x)	$y=-0.00000841x^2+0.00495x+0.001229$	0.9943
Normorphine	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.06464x-0.02522$	0.9990
Noscapine	Quadratique pondérée (1/x)	$y=0.0005442x^2+0.06405x-0.0002082$	0.9988
Oxycodone	Quadratique pondérée (1/x)	$y=0.0000028x^2+0.003876x+0.0007769$	0.9978
Papavérine	Quadratique pondérée (1/x)	$y=0.0006877x^2+0.1172x-0.02696$	0.9950
Pholcodine	Linéaire pondérée (1/x)	$y=0.1957x+0.2285$	0.9907

Annexe 2**Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique***Justesse exprimée par le biais relatif en %*

Groupe 1							
C cible (µg/l)	5	10	20	75	300	600	1200
Codéine	-21.3	-7.3	-7.9	3.6	-6.5	2.5	1.5
Dihydrocodéine	-66.2	-26.4	-13.1	5.5	-9.5	-3.4	3.7
EDDP	-	18.7	-13.3	6.0	5.9	7.0	6.7
Hydrocodone	1.0	5.0	3.6	2.7	-5.2	5.0	6.4
Méthadone	-28.6	-4.7	-2.5	12.2	-3.1	5.7	5.3
M6G	-43.0	-10.0	-5.7	5.1	-2.5	8.3	11.5
M3G	-27.5	-5.8	2.0	13.8	-3.3	7.5	6.9
Méconine	-	41.7	50.4	12.3	5.6	12.4	12.4
Groupe 2							
C cible (µg/l)	1.25	2.5	5	19.75	75	150	300
C6G	-	-	-16.7	23.1	13.8	19.9	8.2
Groupe 3							
C cible (µg/l)	1	2	4	15	60	120	240
6AM	-5.4	6.0	-1.3	8.2	-2.5	7.8	10.6
Ethylmorphine	-	5.0	17.5	28.9	7.2	14.1	-
Hydromorphone	-5.2	-4.1	-13.1	1.8	-8.2	2.1	2.4
Morphine	-14.1	-0.09	3.2	8.3	-6.6	6.2	4.7
Norcodéine	-33.7	-5.7	4.4	13.8	-2.5	4.8	-13.4
Normorphine	-	-14.3	6.7	16.0	4.4	7.4	-
Oxycodone	23.3	6.1	-6.7	7.3	-4.1	9.1	8.1
Pholcodine	-	2.6	18.4	-	17.5	18.7	3.5
Groupe 4							
C cible (µg/l)	0.5	1	2	7.5	30	60	120
6-acétylcodéine	-	4.4	10.0	16.0	8.3	16.2	7.6
Buprénorphine	-	-17.6	-14.1	10.2	-6.0	3.0	-1.0
Naloxone	-	1.1	0.55	13.6	2.5	2.9	-4.1
6-β-naltrexol	-	0.0	-5.6	10.5	-8.9	-1.4	-
Naltrexone	-	5.5	-5.8	8.8	-2.7	3.6	8.3
Norbuprénorphine	-	-	10.0	22.3	13.3	12.8	2.3
Noscapine	-	11.6	3.0	13.9	2.7	7.4	-1.3
Papavérine	-	16.6	4.0	10.9	0.80	6.5	-2.0

Annexe 3**Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique****Fidélité****3.1. Répétabilité exprimée par le CV en %**

Groupe 1							
C cible (µg/l)	5	10	20	75	300	600	1200
Codéine	14.4	8.5	4.8	4.9	6.7	5.2	4.7
Dihydrocodéine	15.7	6.8	8.3	4.2	6.2	6.3	1.5
EDDP	-	9.7	3.0	8.3	15.3	1.1	6.4
Hydrocodone	16.2	20.4	6.6	9.2	9.5	9.7	7.1
Méthadone	12.1	4.5	2.5	3.3	5.1	6.4	3.6
M6G	13.3	8.4	4.8	4.6	6.7	5.6	5.4
M3G	18.4	13.2	3.4	5.5	5.2	6.0	4.0
Méconine	-	20.3	14.0	15.1	9.8	8.3	10.0
Groupe 2							
C cible (µg/l)	1.25	2.5	5	19.75	75	150	300
C6G	-	-	84.8	13.5	7.0	8.6	7.7
Groupe 3							
C cible (µg/l)	1	2	4	15	60	120	240
6AM	13.0	15.2	4.9	7.8	7.3	6.3	3.6
Ethylmorphine	-	12.8	11.6	8.6	11.3	8.5	-
Hydromorphone	13.4	9.1	3.6	4.1	5.9	6.5	3.3
Morphine	24.8	19.9	9.1	6.6	4.2	7.1	3.5
Norcodéine	17.8	23.7	20.1	13.3	3.9	7.7	6.1
Normorphine	-	8.4	5.9	1.6	8.2	6.6	-
Oxycodone	14.1	12.5	7.5	7.9	7.7	6.0	4.9
Pholcodine	-	16.5	5.5	-	11.1	7.7	2.6
Groupe 4							
C cible (µg/l)	0.5	1	2	7.5	30	60	120
6-acétylcodéine	-	16.0	8.5	2.0	6.8	6.6	7.0
Buprénorphine	-	20.7	6.5	10.6	12.0	11.3	7.4
Naloxone	-	14.5	9.7	5.8	5.0	4.8	3.8
6-β-naltrexol	-	11.1	6.9	7.0	6.5	7.7	-
Naltrexone	-	7.8	5.3	2.1	6.3	2.7	3.6
Norbuprénorphine	-	-	17.5	2.7	8.9	9.8	6.5
Noscapine	-	9.4	9.1	5.2	8.6	6.5	5.1
Papavérine	-	5.8	3.7	4.3	8.6	5.8	4.4

3.2. Précision intermédiaire exprimée par le CV en %

Groupe 1							
C cible (µg/l)	5	10	20	75	300	600	1200
Codéine	37.2	8.5	6.0	7.2	6.7	6.5	4.7
Dihydrocodéine	29.8	17.0	14.9	4.2	12.9	10.1	1.5
EDDP	-	29.7	12.1	13.7	15.3	15.8	11.6
Hydrocodone	23.2	20.4	6.6	14.5	12.2	9.8	13.2
Méthadone	46.5	8.2	7.1	8.7	5.6	8.8	4.9
M6G	52.4	17.5	15.6	9.0	9.7	8.9	5.4
M3G	44.0	13.3	3.4	11.5	8.5	9.5	6.8
Méconine	-	45.9	53.8	25.2	19.1	19.2	10.0
Groupe 2							
C cible (µg/l)	1.25	2.5	5	19.75	75	150	300
C6G	-	-	187.4	30.7	12.2	13.3	7.7
Groupe 3							
C cible (µg/l)	1	2	4	15	60	120	240
6AM	48.1	15.2	11.1	8.6	9.6	9.9	6.5
Ethylmorphine	-	20.5	19.5	19.9	15.2	20.3	-
Hydromorphine	26.6	17.4	6.3	5.6	10.6	9.2	5.2
Morphine	28.0	32.4	9.1	6.6	11.4	11.6	5.3
Norcodéine	33.1	38.9	20.1	14.9	10.3	11.2	6.1
Normorphine	-	19.8	17.1	3.7	12.0	9.0	-
Oxycodone	23.8	16.0	15.2	17.4	13.0	8.1	12.6
Pholcodine	-	21.6	6.3	-	15.5	15.1	2.6
Groupe 4							
C cible (µg/l)	0.5	1	2	7.5	30	60	120
6-acétylcodéine	-	20.5	18.5	19.9	13.6	13.5	9.8
Buprénorphine	-	20.7	6.5	10.6	14.1	15.4	8.4
Naloxone	-	16.7	19.5	12.4	11.1	11.3	8.1
6-β-naltrexol	-	12.6	13.7	10.2	8.1	10.0	-
Naltrexone	-	13.6	17.9	3.1	6.3	2.7	5.1
Norbuprénorphine	-	-	17.5	19.9	8.9	10.8	6.7
Noscapine	-	13.2	12.2	10.3	8.6	11.1	6.9
Papavérine	-	11.5	8.4	6.8	8.7	11.1	8.0

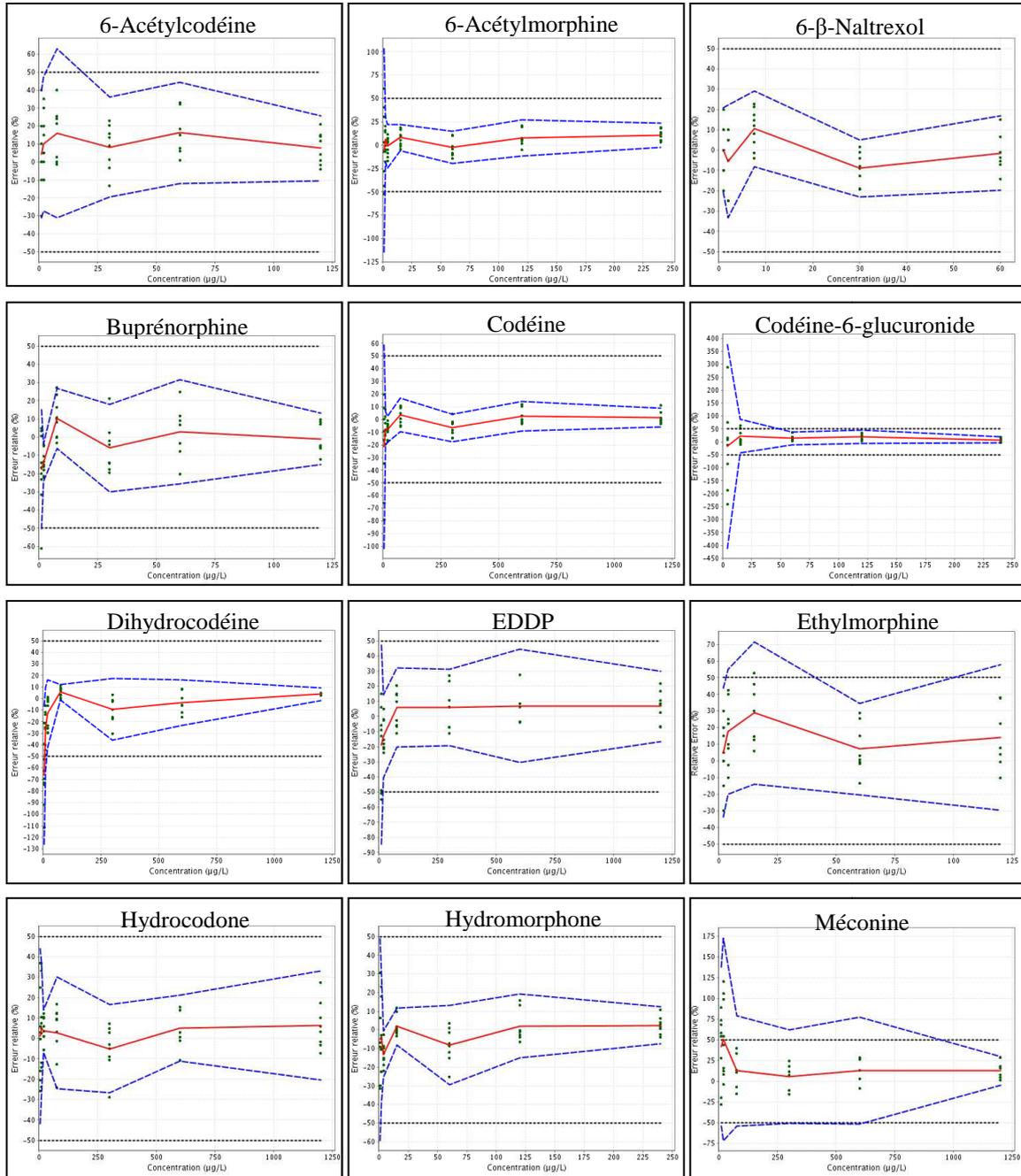
Annexe 4**Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique***Incertitude de mesure étendue relative en %*

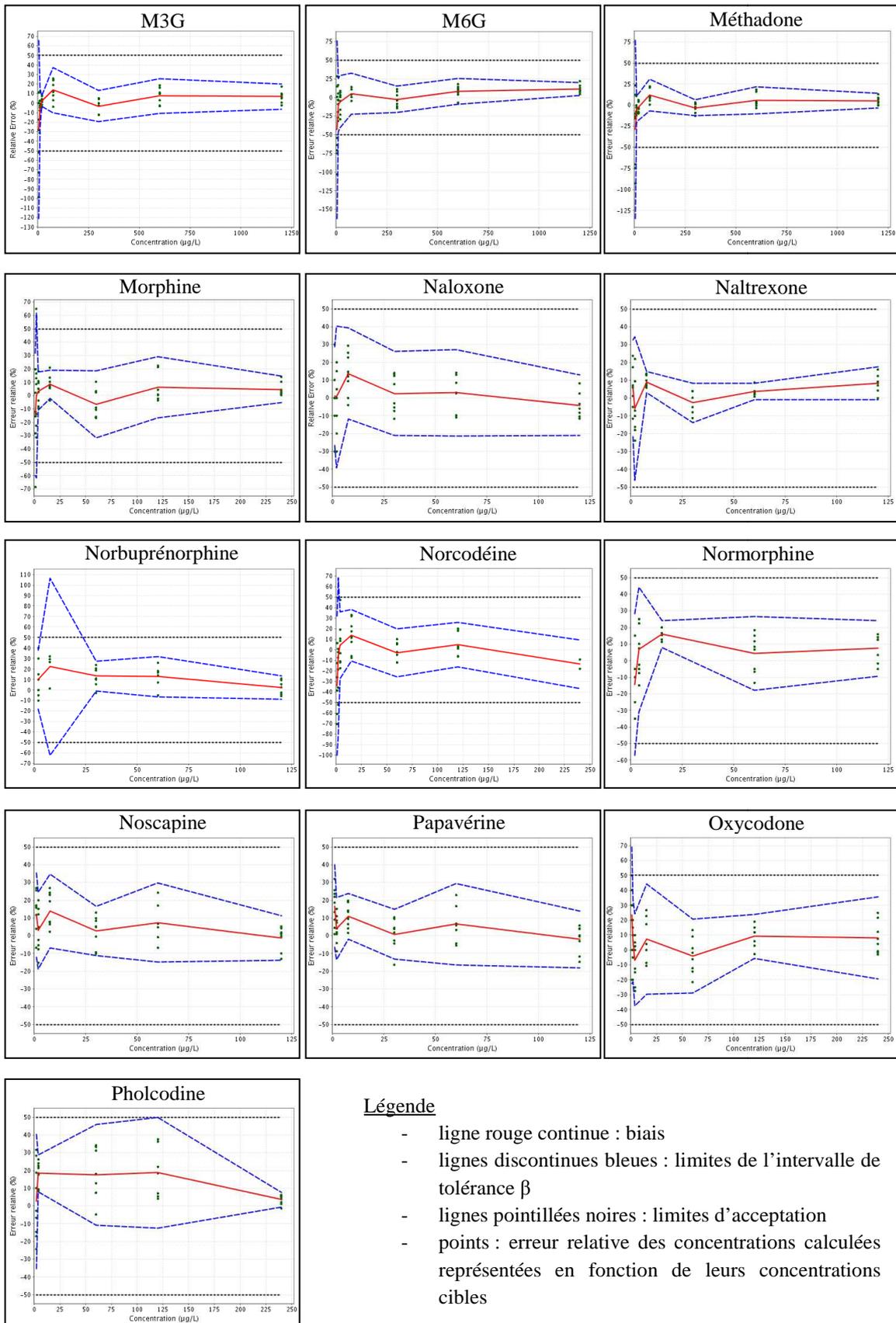
Groupe 1							
C cible (µg/l)	5	10	20	75	300	600	1200
Codéine	84.8	18.0	13.1	15.9	14.3	14.4	10.0
Dihydrocodéine	67.1	38.7	33.6	8.9	29.2	22.7	3.6
EDDP	-	67.9	27.7	30.6	32.8	36.5	26.2
Hydrocodone	51.6	43.0	14.0	32.5	26.9	20.9	29.9
Méthadone	106.8	18.5	16.3	19.9	12.0	19.4	10.8
M6G	120.3	39.6	35.8	21.3	21.4	19.9	11.5
M3G	100.1	28.1	7.2	26.0	19.0	21.2	15.2
Méconine	-	104.3	123.5	59.1	45.3	46.1	21.5
Groupe 2							
C cible (µg/l)	1.25	2.5	5	19.75	75	150	300
C6G	-	-	425.8	69.7	27.4	29.8	16.3
Groupe 3							
C cible (µg/l)	1	2	4	15	60	120	240
6AM	110.3	32.0	25.2	18.5	21.1	22.2	14.6
Ethylmorphine	-	45.8	43.6	45.4	33.6	46.3	-
Hydromorphone	60.2	39.3	14.2	12.4	24.0	20.4	11.6
Morphine	60.2	72.4	19.3	14.0	26.2	26.1	11.8
Norcodéine	74.7	87.0	42.3	32.1	23.6	24.9	15.0
Normorphine	-	45.1	39.1	8.5	26.6	20.1	-
Oxycodone	53.3	34.9	34.4	39.7	28.7	18.0	28.8
Pholcodine	-	47.4	13.6	34.4	-	34.2	5.6
Groupe 4							
C cible (µg/l)	0.5	1	2	7.5	30	60	120
6-acétylcodéine	-	44.8	40.9	45.9	30.7	30.6	21.8
Buprénorphine	-	43.6	13.7	22.3	30.7	34.2	18.2
Naloxone	-	36.0	44.1	28.0	25.3	25.7	18.4
6-β-naltrexol	-	27.2	31.0	22.7	17.6	22.1	-
Naltrexone	-	30.7	41.1	7.0	13.7	5.8	11.3
Norbuprénorphine	-	-	37.2	48.6	18.9	23.7	14.3
Noscapine	-	29.3	26.9	23.3	18.2	25.1	15.3
Papavérine	-	25.9	19.0	15.3	18.4	25.2	18.1

Annexe 5

Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique

Profils d'exactitude





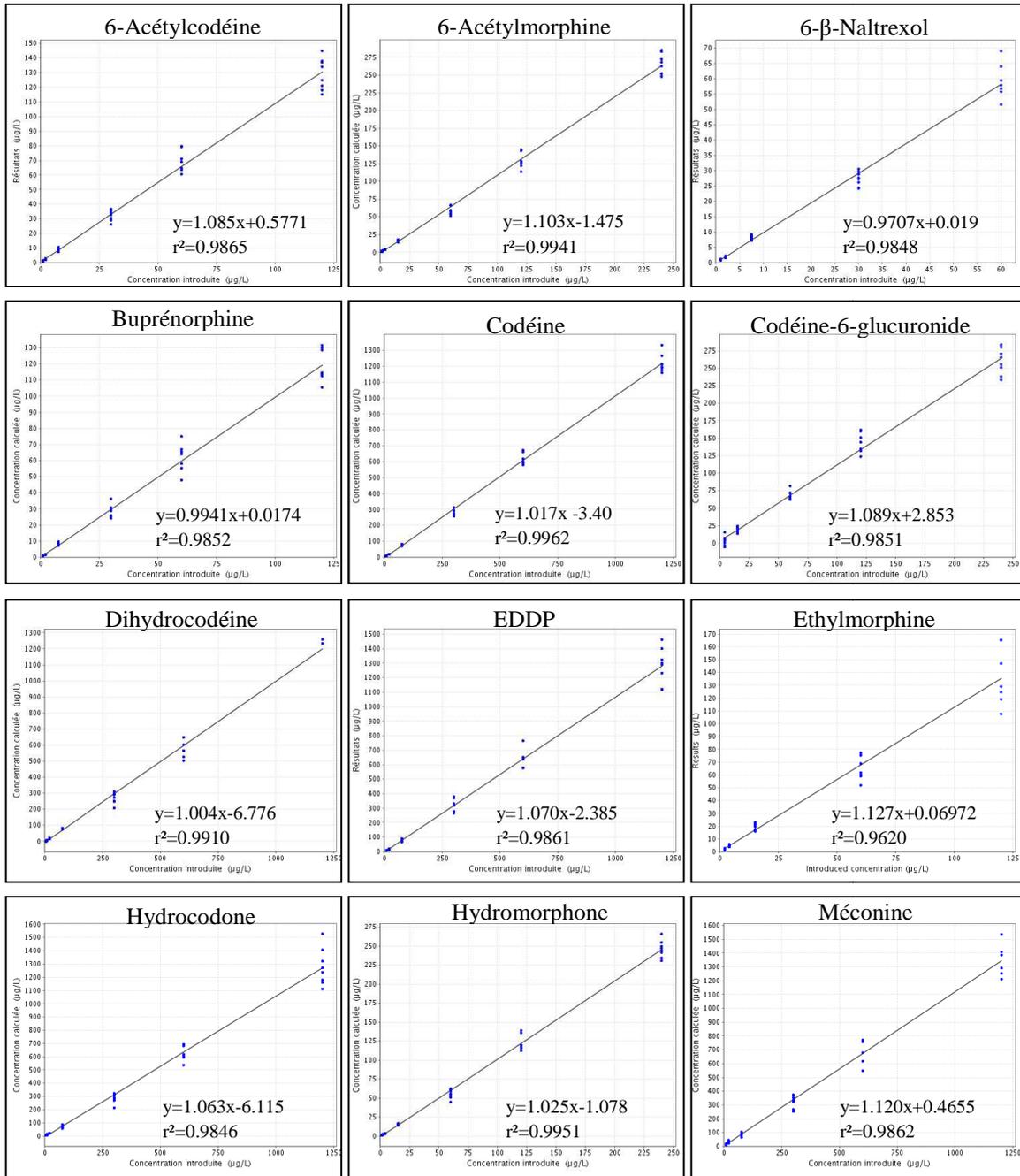
Légende

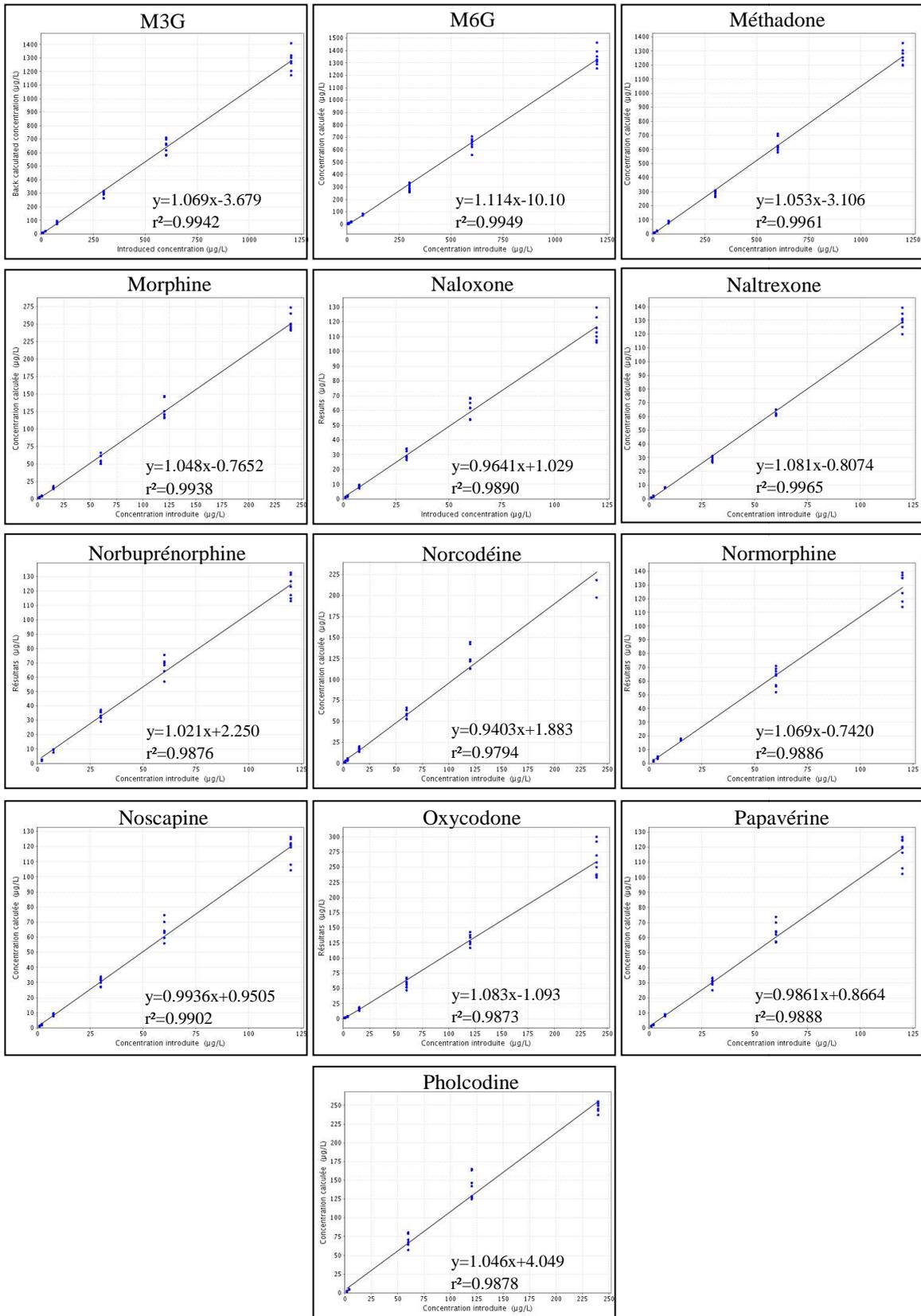
- ligne rouge continue : biais
- lignes discontinues bleues : limites de l'intervalle de tolérance β
- lignes pointillées noires : limites d'acceptation
- points : erreur relative des concentrations calculées représentées en fonction de leurs concentrations cibles

Annexe 6

Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique

Linéarité



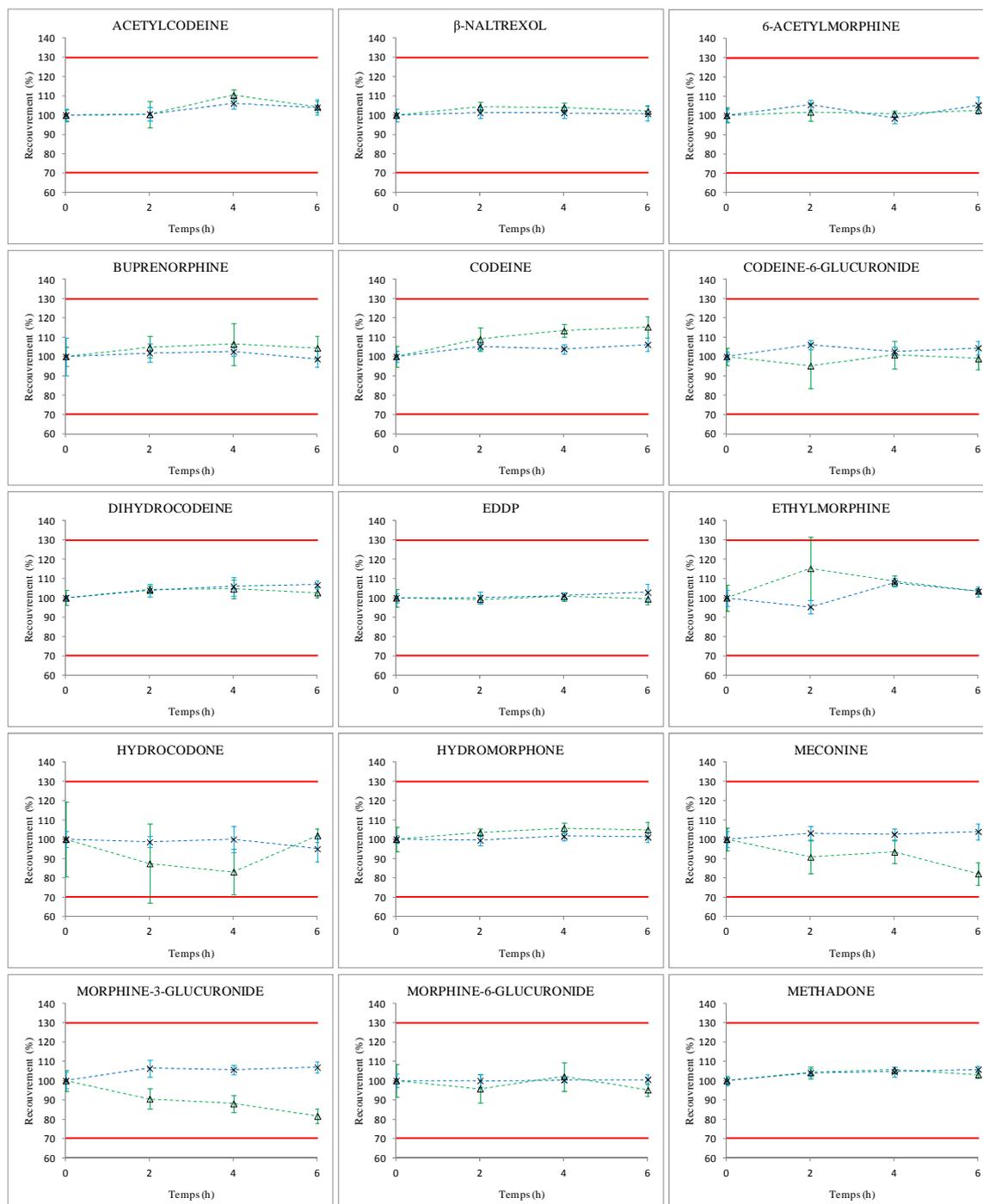


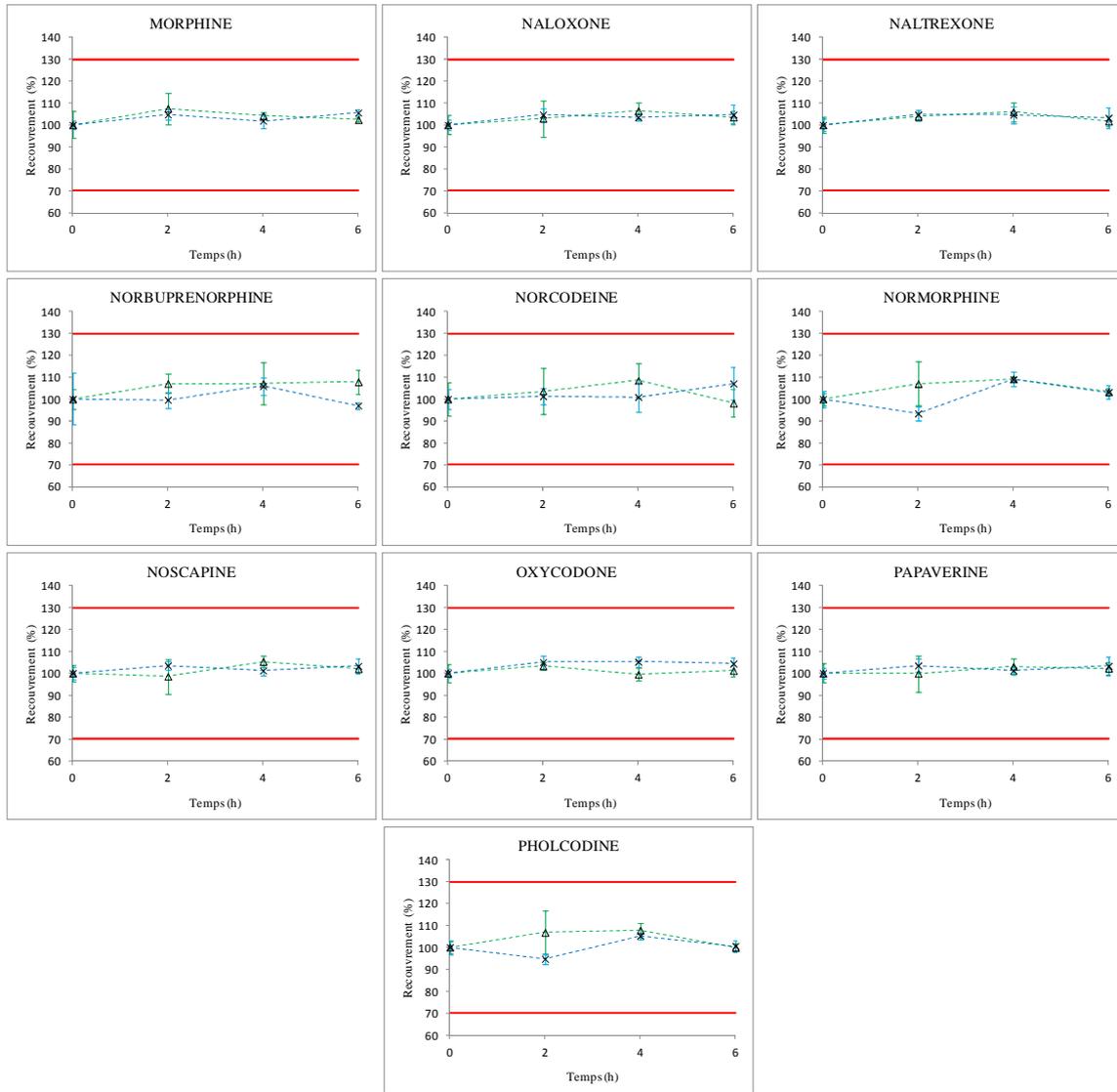
Annexe 7

Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique

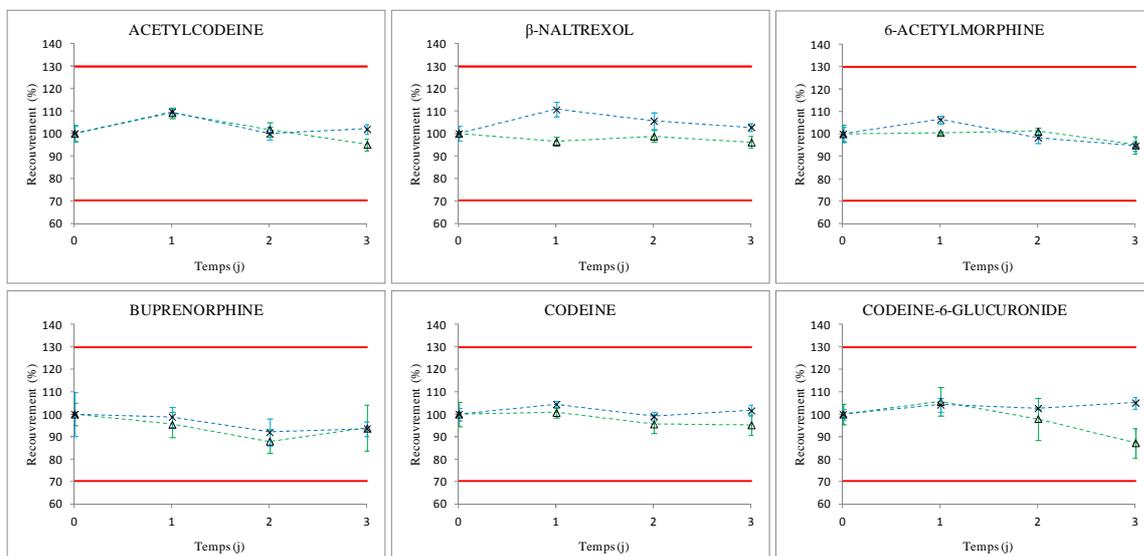
Stabilité

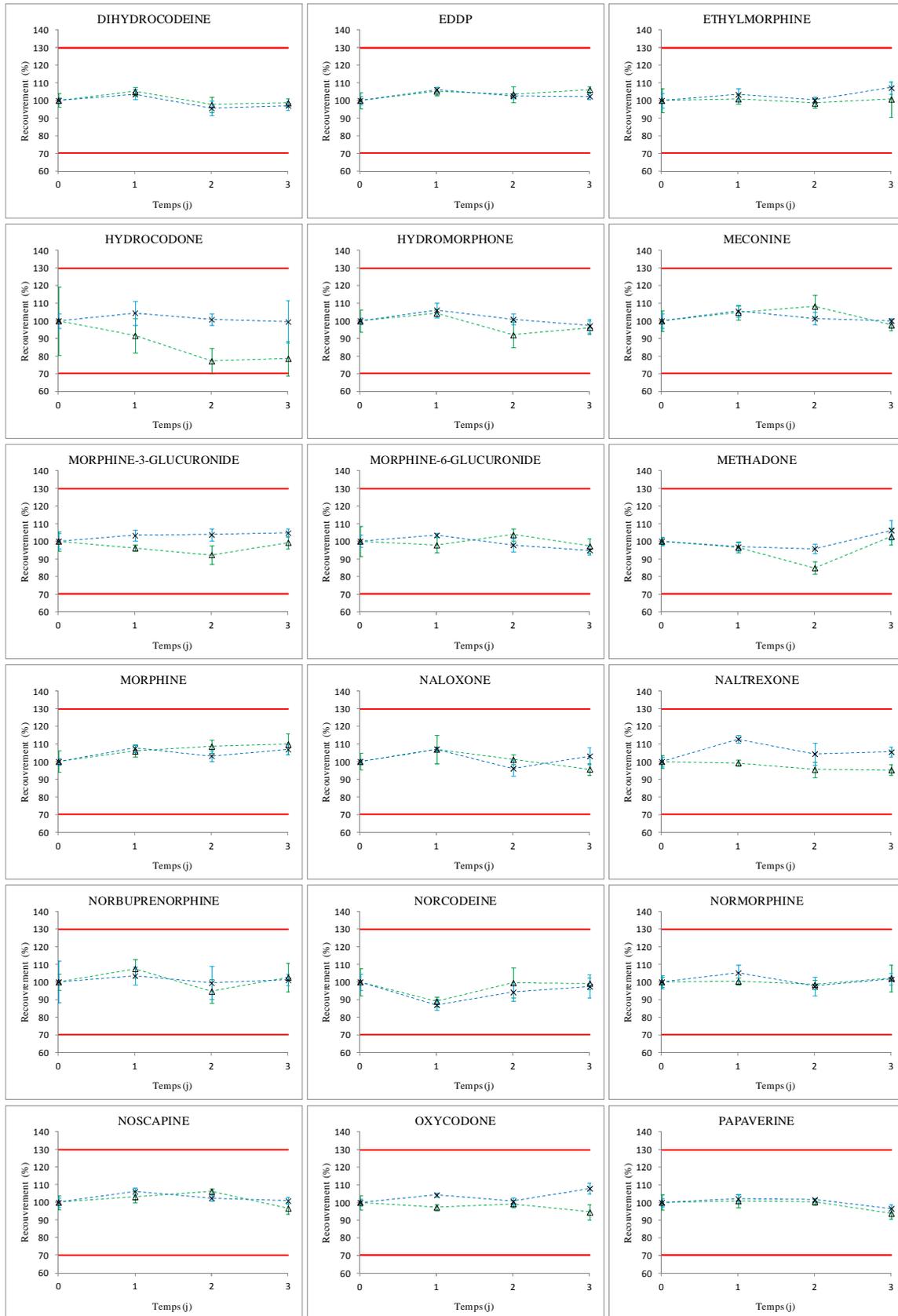
7.1. Température ambiante pour 2 niveaux de concentrations

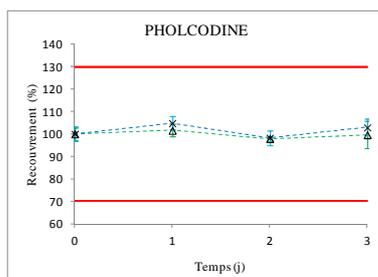




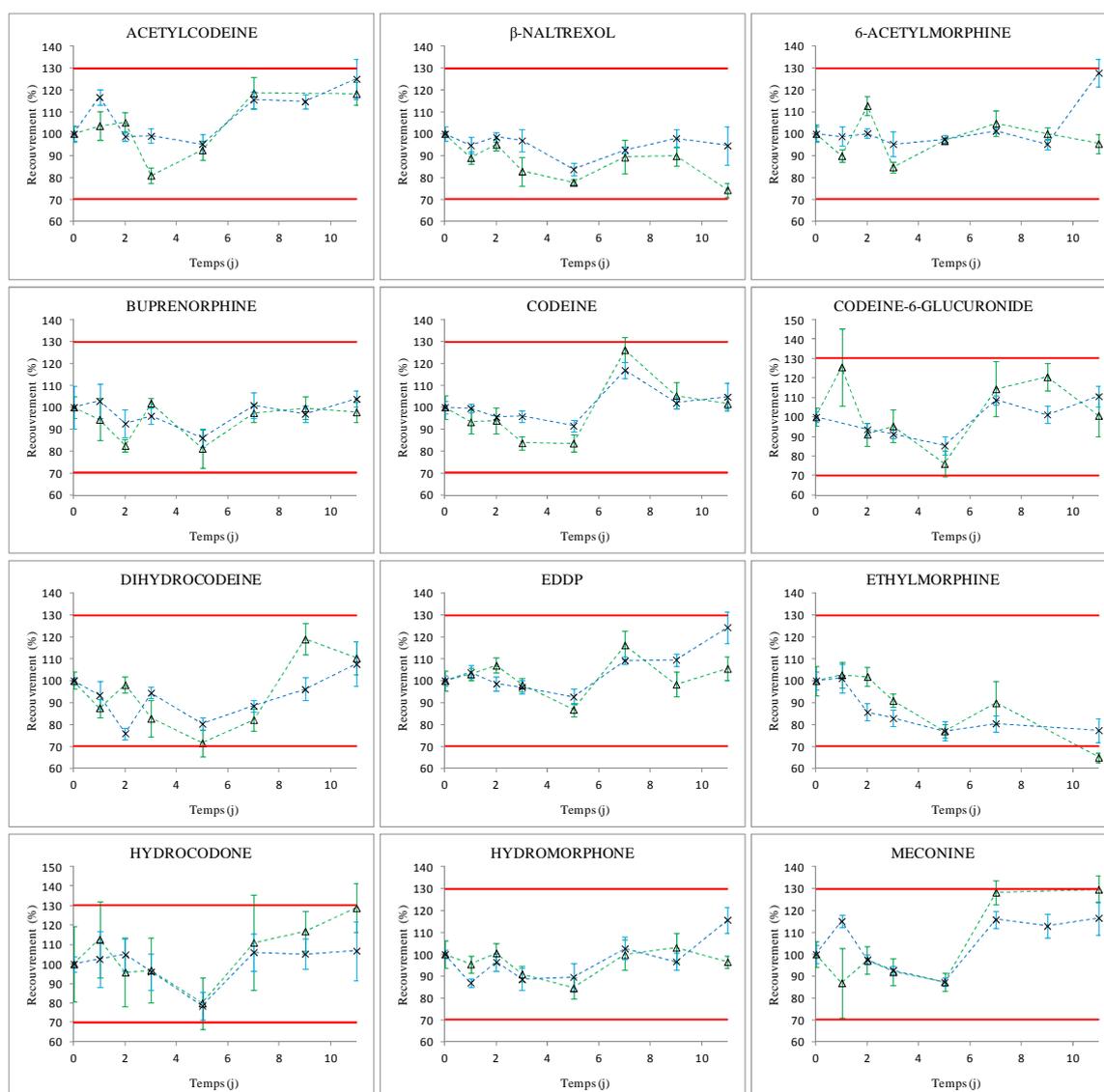
7.2. Température de réfrigération pour 2 niveaux de concentrations

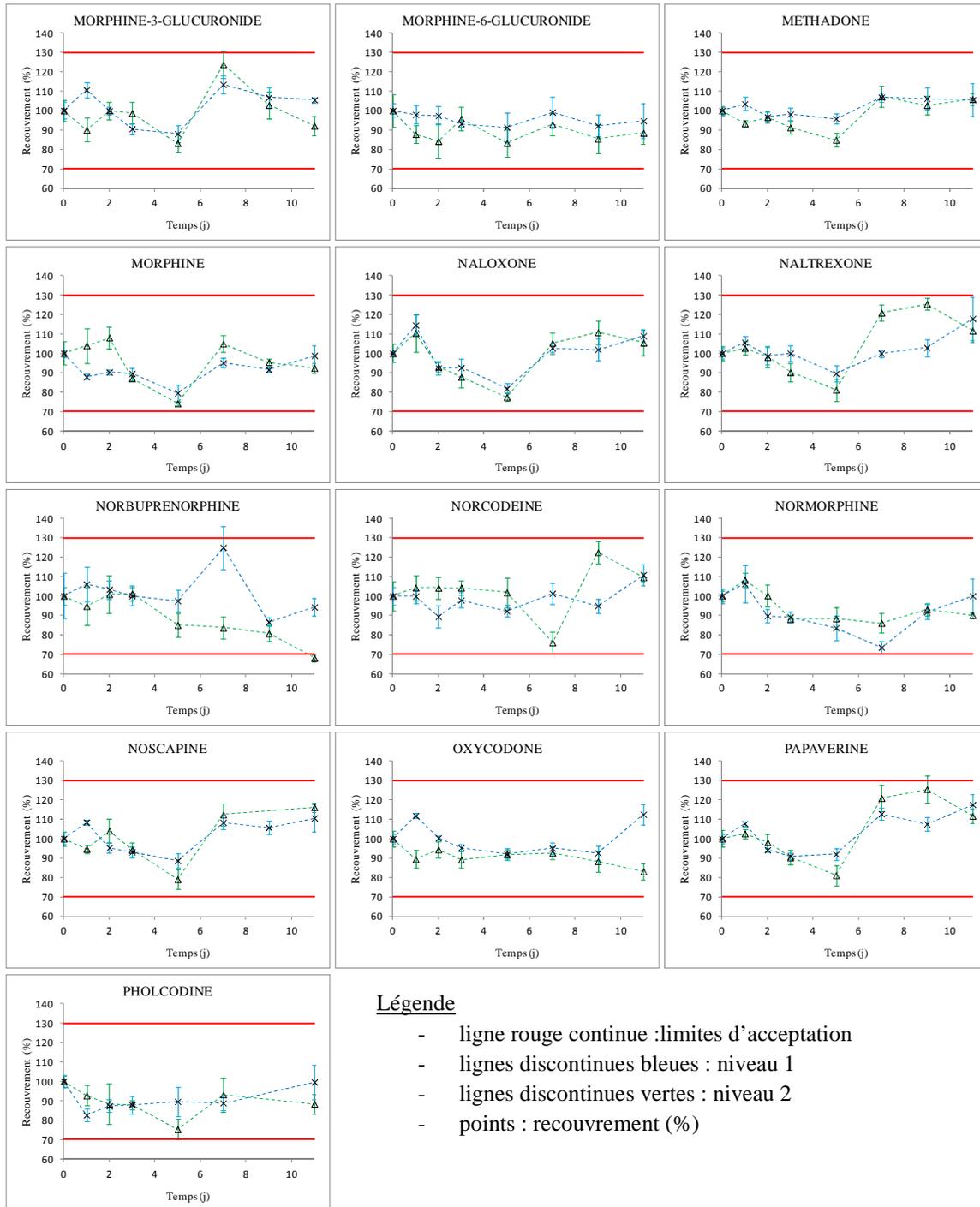






7.3. Température de congélation pour 2 niveaux de concentrations





Légende

- ligne rouge continue :limites d'acceptation
- lignes discontinues bleues : niveau 1
- lignes discontinues vertes : niveau 2
- points : recouvrement (%)

Annexe 8**Identification et dosage des opiacés seuls dans le sang : validation analytique***Effet matrice*

Molécules	Effet matrice moyen (%)	CV (%)
6-acétylcodéine	34.5	10.7
6AM	102.0	3.6
6- β -naltrexol	98.8	6.2
Buprénorphine	96.7	6.0
Codéine	102.6	2.9
C6G	45.4	23.9
Dihydrocodéine	98.8	11.4
EDDP	96.9	2.9
Ethylmorphine	76.1	23.6
Hydrocodone	106.2	4.8
Hydromorphone	98.6	5.2
Méconine	40.1	25.2
M3G	93.3	5.9
M6G	102.5	4.6
Méthadone	98.1	1.5
Morphine	99.2	11.2
Naloxone	110.8	6.7
Naltrexone	103.4	4.0
Norbuprénorphine	114.1	12.0
Norcodéine	104.4	10.6
Normorphine	105.7	15.0
Noscapine	35.9	12.7
Oxycodone	105.0	3.6
Papavérine	37.5	7.9
Pholcodine	246.7	9.2

Annexe 9**Patients « RODA » : Concentrations en 6AM, morphine, M6G et M3G obtenues dans les différents prélèvements**

Sample	Δt (min.)	Δt (h)	6AM	MOR	M6G	M3G	COD	C6G	MECO	NMOR	NCOD	PAPAV	NOSCA	ACOD
PATIENT 1														
1	65,00	1,08	8,70	244	797,9	3786	64,7	741	2876	13,5	7,6	11,9	<1	4,5
2	125,00	2,08	1,08	129,2	609,5	3210	42,5	602	1945	5	5,8	6,6	<1	<2
3	170,00	2,83	<1	112,1	476,2	2737	32,1	526	1566	6,4	4,7	4,3	<1	<2
4	230,00	3,83	<1	92,5	384,5	2075	26,4	382	980	5,4	4,6	3,7	<1	<2
5	295,00	4,92	<1	75,5	339	1971	25,4	353	823	5,5	<4	2,7	<1	<2
6	400,00	6,67	<1	61,5	250,1	1480	17,4	244	528	5,3	<4	1,9	<1	<2
7	515,00	8,58	<1	40,2	217,4	1344	13,7	267	300	4	<4	1,3	<1	<2
PATIENT 2														
1	2480,00	41,33	<1	6,1	28,4	185,3	<5	<19,75	9,8	<2	<4	<1	<1	<2
2	2520,00	42,00	<1	6,1	21,8	151,2	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
3	2550,00	42,50	<1	6	21	141,4	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
4	2610,00	43,50	<1	5,5	20,4	146,1	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
5	2730,00	45,50	<1	4,6	16	124,9	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
6	2850,00	47,50	<1	<4	15,5	112	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
7	2880,00	48,00	<1	<4	12,4	122,9	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
PATIENT 3														
1	215,00	3,58	<1	63,1	240,2	1273,3	67	606,5	492,7	7,6	15,4	4,1	<1	<2
2	240,00	4,00	<1	69,4	190,7	1315,8	56,4	501,8	381,7	10,1	9,8	3,9	<1	<2
3	270,00	4,50	<1	52	167,8	925,6	44,8	407,8	267,1	7,1	8	2,6	<1	<2
4	330,00	5,50	<1	54,1	112,7	831,7	44,6	389	233,1	5,7	12,2	2,6	<1	<2
5	450,00	7,50	<1	37,1	110	701,1	32,7	300,1	134,1	5,2	8,6	1,8	<1	<2
6	570,00	9,50	<1	41,8	98,9	572,6	31,3	319,5	91,4	4,7	8,4	1,7	<1	<2
7	1620,00	27,00	<1	6,9	32,6	265,7	<5	48,4	<5	<2	<4	<1	<1	<2
PATIENT 4														
1	205	3,42	<1	28,8	92,6	1010,2	12,2	66,4	294,0	N/A	<4	2,0	<1	<2
2	260	4,33	<1	27,7	135,8	890,7	10,0	57,7	238,3	N/A	<4	2,1	<1	<2
3	300	5,00	<1	19,5	76,3	897,8	9,5	43,6	169,8	4,1	<4	1,5	<1	<2
4	360	6,00	<1	19,3	76,8	790,1	9,6	44,1	138,2	4,9	<4	1,5	<1	<2
5	420	7,00	<1	15,4	71,5	697,5	8,2	32,5	97,8	4,0	<4	1,4	<1	<2
6	540	9,00	<1	14,8	66,6	578,7	7,0	23,2	59,4	4,5	<4	1,3	<1	<2
7	660	11,00	<1	9,8	49,0	551,2	6,0	22,1	41,2	4,5	<4	1,2	<1	<2
8	720	12,00	<1	9,3	66,4	607,8	6,2	28,4	30,1	3,6	<4	1,1	<1	<2
9	1690	28,17	<1	5,2	16,6	406,9	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
10	3090	51,50	<1	<4	<10	29,5	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
PATIENT 5														
1	2650	44,17	<1	6,5	28,6	175,4	5,1	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
2	2735	45,58	<1	6,0	19,5	147,1	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
3	2800	46,67	<1	5,5	18,7	129,2	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
4	2870	47,83	<1	5,6	16,7	115,9	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
5	2980	49,67	<1	4,8	16,6	107,1	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
6	4120	68,67	<1	<4	<10	56,4	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
7	5550	92,50	<1	<4	<10	10,8	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2
8	7020	117,00	<1	<4	<10	<10	<5	<19,75	<5	<2	<4	<1	<1	<2

Annexe 10**Application du modèle à différents sujets*****Patients du groupe expérimental du projet TADAM***

Patient n°	Δt réel (h)	C _{6AM} ($\mu\text{g/L}$)	C _{morphine} ($\mu\text{g/L}$)	C _{M6G} ($\mu\text{g/L}$)	C _{M3G} ($\mu\text{g/L}$)	Δt estimé (h)	Ecart (h)
1	0.25	126	423	795	6140	< 2,00	n/a
	0.75	82	450	714	6923	< 2,00	n/a
	1.50	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	0.25	98	473	690	5014	< 2,00	n/a
	0.75	39	387	523	5074	< 2,00	n/a
	1.50	13	266	608	4905	< 2,00	n/a
3	0.25	35	118	280	1999	< 2,00	n/a
	0.75	16	129	314	1886	< 2,00	n/a
	1.50	9.4	108	356	1889	< 2,00	n/a
4	0.25	57	106	93	542	< 2,00	n/a
	0.75	19	103	120	555	< 2,00	n/a
	1.50	5.2	75	139	526	< 2,00	n/a
5	0.25	102	158	490	2990	< 2,00	n/a
	0.75	30	137	479	2841	< 2,00	n/a
	1.50	9.6	112	481	2555	< 2,00	n/a
6	0.25	156	152	480	2882	< 2,00	n/a
	0.75	58	138	496	3211	< 2,00	n/a
	1.50	22	124	502	2971	< 2,00	n/a
7	0.25	87	109	204	1473	< 2,00	n/a
	0.75	21	87	219	1499	< 2,00	n/a
	1.50	8.3	101	180	1333	< 2,00	n/a
8	0.25	51	116	155	1262	< 2,00	n/a
	0.75	21	123	167	1101	< 2,00	n/a
	1.50	7.8	124	154	1026	< 2,00	n/a
9	0.25	15	194	198	2048	< 2,00	n/a
	0.75	<5	167	162	2079	2.20	1.4
	1.50	<5	123	187	1668	2.60	1.1
10	0.25	68	179	271	2910	< 2,00	n/a
	0.75	23	141	246	3045	< 2,00	n/a
	1.50	8.7	102	291	2448	< 2,00	n/a
11	0.25	61	210	275	3339	< 2,00	n/a
	0.75	18	174	295	3060	< 2,00	n/a
	1.50	<5	136	210	2323	2.41	0.9

Patients ambulatoires traités à la méthadone

Patient n°	Δt déclaré (h)	C _{6AM} ($\mu\text{g/L}$)	C _{morphine} ($\mu\text{g/L}$)	C _{M6G} ($\mu\text{g/L}$)	C _{M3G} ($\mu\text{g/L}$)	Δt estimé (h)	Ecart (h)
A	20.2	<5	<10	15	160	41.8	+21.6
B	1.9	<5	86	155	785	3.6	+1.7
C	63.8	<5	<10	<10	14	90.0	+26.2
D	2.6	<5	160	366	1827	2.2	-0.4
E	20.0	<5	12	<10	466	21.6	+1.6
F	1.0	14	248	253	1036	<2.00	n/a
G	7.3	<5	37	148	821	8.8	+1.5

Patient RODA

Prélèvement n°	Δt déclaré (h)	C _{6AM} ($\mu\text{g/L}$)	C _{morphine} ($\mu\text{g/L}$)	C _{M6G} ($\mu\text{g/L}$)	C _{M3G} ($\mu\text{g/L}$)	Δt estimé (h)	Ecart (h)
1	10.0	<5	38	106	1148	8.6	-1.4
2	11.0	<5	35	105	1124	9.3	-1.7
3	12.0	<5	29	90	806	11.0	-1.0
4	13.0	<5	28	106	735	11.4	-1.6
5	15.0	<5	28	90	562	11.4	-3.6
6	17.0	<5	22	61	469	13.9	-3.1
7	32.0	<5	<10	25	223	33.5	1.5
8	58.5	<5	<10	<10	12	94.2	35.7